

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



## **Dissertação de Mestrado**

**Desenvolvimento de Método para a Determinação de  
Halogênios e Enxofre em Ovo Integral Desidratado e suas  
Frações**

**Ísis Gonçalves Toralles**

Pelotas, 2015

**Ísis Gonçalves Toralles**

**Desenvolvimento de Método para a Determinação de  
Halogênios e Enxofre em Ovo Integral Desidratado e suas  
Frações**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

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

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

T676d Toralles, Isis Gonçalves

Desenvolvimento de método para a determinação de halogênios e enxofre em ovo integral desidratado e suas frações / Isis Gonçalves Toralles ; Márcia Foster Mesko, orientadora. — Pelotas, 2015.

113 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Preparo de amostras. 2. Combustão iniciada por micro-ondas. 3. Halogênios. 4. Enxofre. 5. Ovos integrais. I. Mesko, Márcia Foster, orient. II. Título.

CDD : 636.593

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada "Desenvolvimento de método para a determinação de halogênios e enxofre em ovo integral desidratado e suas frações", de autoria de Ísis Gonçalves Toralles.

**Banca examinadora:**

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

  
.....  
Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

  
.....  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rochele Sogari Picoloto

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio) da Universidade Federal de Pelotas, pela possibilidade da execução deste trabalho.

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Márcia Foster Mesko**, pela orientação e incentivo, pelas oportunidades que permitiram o meu crescimento profissional e pessoal e pela amizade construída.

Ao Prof. Dr. **Claudio Martin Pereira de Pereira**, pela amizade construída, pela participação na banca examinadora e pelas contribuições para esta dissertação.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. **Rochele Sogari Picoloto**, pela participação na banca examinadora e pelas sugestões que contribuíram para esta dissertação.

Ao Prof. Dr. **Érico M. M. Flores**, coordenador do Laboratório de Análises Químicas, Industriais e Ambientais (LAQIA), da UFSM, por oportunizar a execução deste e de outros experimentos.

Aos integrantes do LAQIA (UFSM), em especial a **Clarissa M. M. Santos**, a **Flávia M. Dalla Nora** e a **Sandra M. Cruz** pela disposição e colaboração constante durante toda a execução deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Carla A. Hartwig**, **Vanize C. Costa**, **Rodrigo M. Pereira**, **Marcelo G. Crizel**, **Diogo L. R. Novo**, **Felipe S. Rondan**, **Dirce Tainá T. Oliveira**, **Alessandra C. Teotonio**, pela amizade, companheirismo, incentivo e auxílio prestado. Em especial, gostaria de agradecer ao **Gilberto S. Coelho Jr.**, pela amizade e por toda dedicação prestada durante as atividades práticas que contribuíram de forma determinante para a execução deste trabalho.

A ex-integrante **Thaís Mazzetti**, pela amizade e ajuda incondicional durante a execução deste trabalho.

Ao secretário do PPGBBio **Christian M. Geisler**, pela disposição demonstradas nas questões da pós-graduação.

As laboratoristas **Romi E. N. Santos**, **Rosane S. Mello**, **Regina Maria Francisca C. P. Silva** e **Vanessa G. Machado** por toda colaboração.

As minhas queridas amigas **Vivi** e **Rochele** por todo apoio e carinho. Em especial, gostaria de agradecer minha querida amiga **Carol** que, além de todo apoio e carinho, foi fundamental na reta final do meu trabalho.

Agradeço ainda aos meus pais **Ricardo** e **Fernanda**, minha irmã **Ândrea** e ao meu avô **Jonathas** por todo amor, carinho e apoio.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>18</b>
<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>18</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
<b>Absorção, Metabolismo e Biodisponibilidade de Halogênios e</b>	
<b>Enxofre no Organismo Humano .....</b>	<b>20</b>
<b>Ovos - Generalidades .....</b>	<b>24</b>
<b>Preparo de Amostras.....</b>	<b>27</b>
Preparo de Amostras para a Posterior Determinação de Halogênios e	
Enxofre .....	28
Preparo de Amostras Utilizando Soluções Alcalinas .....	29
Técnicas de Combustão .....	31
Bomba de Combustão .....	33
Frasco de Combustão de Schöniger.....	36
Combustão Iniciada por Micro-ondas .....	38
<b>Técnicas para a Determinação de Halogênios e de Enxofre .....</b>	<b>42</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
<b>Instrumentação .....</b>	<b>49</b>
<b>Reagentes e soluções.....</b>	<b>51</b>
<b>Descontaminação dos Materiais Diversos.....</b>	<b>53</b>
<b>Amostras .....</b>	<b>53</b>
<b>Caracterização Físico-química das Amostras .....</b>	<b>54</b>
<b>Avaliação de Parâmetros Relacionados ao Procedimento de</b>	
<b>Decomposição por MIC .....</b>	<b>55</b>

	<i>viii</i>
Determinação da Massa Máxima de Amostra .....	55
Determinação do Intervalo de Tempo da Combustão.....	55
Procedimento para Decomposição por MIC e Avaliação da Solução Absorvedora .....	56
<b>Extração Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado .....</b>	<b>58</b>
<b>Determinações por IC, ICP-MS ou ICP OES.....</b>	<b>59</b>
<b>Determinação de Cl pelo Método Oficial Recomendado pela AOAC.....</b>	<b>61</b>
<b>Determinação do Teor de Carbono Residual.....</b>	<b>62</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>63</b>
<b>Caracterização Físico-Química das Amostras .....</b>	<b>64</b>
<b>Decomposição por Combustão Iniciada por Micro-ondas (MIC).....</b>	<b>65</b>
Determinação do Intervalo de Tempo da Combustão.....	74
Avaliação da Solução Absorvedora .....	75
<b>Extração Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado .....</b>	<b>80</b>
<b>    Comparação entre os Diferentes Procedimentos de Preparo de     Amostras .....</b>	<b>83</b>
<b>    Branco e Limites de Detecção .....</b>	<b>83</b>
<b>    Determinação de Br, Cl, F, I e S em Ovo Integral Desidratado e suas     Frações (Clara e Gema) de Diferentes Origens.....</b>	<b>92</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>97</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>99</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Esquema ilustrativo do processo metabólico do iodo no organismo..	21
<b>Figura 2</b> -	Bomba de combustão de aço utilizada na decomposição de amostra.....	34
<b>Figura 3</b> -	Frasco de combustão de Schöniger com seus principais componentes (A) e sequência básica do procedimento de decomposição utilizando o sistema (B) (adaptado de Flores <i>et al.</i> , 2007).....	37
<b>Figura 4</b> -	Dispositivo comercial (A) e não comercial (B) de quartzo utilizado na MIC como suporte para as amostras.....	39
<b>Figura 5</b> -	Forno de micro-ondas comercial Multiwave 3000® (A) e rotor equipado com 8 frascos (B).....	49
<b>Figura 6</b> -	Tubo no formato cilíndrico (100 ml) utilizado na centrifugação das amostras.....	54
<b>Figura 7</b> -	Adaptação do sistema para a visualização do processo de combustão (cortesia de PIREs, 2014).....	56
<b>Figura 8</b> -	Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de ovo integral e suas frações desidratadas para subsequente determinação de halogênios e S por IC, ICP-MS ou ICP OES.....	59
<b>Figura 9</b> -	Imagem ilustrativa da perda de gordura durante o preparo do comprimido de ovo integral desidratado (350 mg), por prensagem (tempo de prensagem: 30 s).....	66
<b>Figura 10</b> -	Invólucro contendo 350 mg de ovo integral desidratado e 100 µl NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (6 mol l <sup>-1</sup> ).....	67

- Figura 11** - Pressão máxima atingida no sistema e variação da pressão em função da massa de amostra decomposta por MIC (pressão inicial de oxigênio - 20 bar, n=3)..... 68
- Figura 12** - Aspecto da solução absorvedora e do suporte de quartzo após a decomposição de diferentes massas de ovo em pó por MIC com pressão inicial de 20 bar de O<sub>2</sub>: 100 mg (A) e (B); 200 mg (C) e (D); 300 mg (E) e (F) e 350 mg (G) e (H)..... 69
- Figura 13** - Aspecto da solução absorvedora e do suporte de quartzo após a decomposição de 350 mg de ovo em pó, com a adição de 50 µl (A) e (B) ou 100 µl de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 6 mol l<sup>-1</sup> (C) e (D), com pressão de O<sub>2</sub> de 20 bar..... 71
- Figura 14** - Aspecto da solução absorvedora (A) e do suporte de quartzo (B) após a decomposição de 400 mg de ovo integral por MIC, com 100 µl de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 6 mol l<sup>-1</sup> e pressão de O<sub>2</sub> 20 bar..... 72
- Figura 15** - Aspecto da solução absorvedora (A) e do suporte de quartzo (B) após decomposição de 450 mg de clara em pó por MIC..... 72
- Figura 16** - Aspecto da solução absorvedora (A) e do suporte de quartzo (B) após decomposição de 450 mg de gema em pó por MIC..... 73
- Figura 17** - Recuperações para Cl<sup>-</sup>, Fe<sup>3+</sup> e S<sup>2-</sup> por IC (A) e para Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup> por ICP-MS (B), em amostras de ovo integral desidratada decompostas por MIC com 5 min de refluxo, utilizando NH<sub>4</sub>OH (10 a 75 mmol l<sup>-1</sup>) e água como solução absorvedora (massa 350 mg, n = 3)..... 77
- Figura 18** - Aspecto das soluções obtidas após 350 mg de ovo integral desidratado terem sido preparados por extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado, utilizando HTMA 0,11 mol l<sup>-1</sup> (A) e NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup> (B)..... 81

- Figura 19** - Cromatograma referente a determinação de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  por IC sem diluir (A) e diluindo 5 vezes (B) a amostra, após decomposição de 350 mg de amostra + 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ )..... 87
- Figura 20** - Cromatograma obtido para a determinação de F por IC, após decomposição de 350 mg de amostra + 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ) (A) e ampliação da imagem A, referente aos picos de  $\text{F}^-$  e do interferente (B)..... 88
- Figura 21** - Cromatograma obtido para a determinação de  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{I}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  por IC, após decomposição 350 mg de amostra + 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ) e adição de uma solução multielementar conhecida ( $\text{F}^-$  e  $\text{Br}^-$ : 0,5 mg  $\text{l}^{-1}$ ;  $\text{I}^-$ : 2 mg  $\text{l}^{-1}$ )..... 90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Trabalhos publicados que envolvem a determinação de halogênios e enxofre em ovos por diferentes técnicas analíticas...	11
<b>Tabela 2</b> - Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas.....	57
<b>Tabela 3</b> - Programa de irradiação utilizado na extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.....	58
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros operacionais para a determinação de Cl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> e SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> por IC, Br e I por ICP-MS e C, Cl e S por ICP OES.....	60
<b>Tabela 5</b> - Determinação dos teores de umidade, cinzas, proteína bruta e gordura em amostras desidratadas de ovo integral e suas frações (clara e gema) (resultados expressos em % ± desvio-padrão, n=3).....	64
<b>Tabela 6</b> - Determinação de Br, Cl, F, I e S no RM NIST 8435 ( <i>Whole milk powder</i> ), por IC ou ICP-MS, após decomposição por MIC, utilizando NH <sub>4</sub> OH 50 mmol l <sup>-1</sup> , como solução absorvedora (resultados expressos em mg kg <sup>-1</sup> ± desvio padrão, n=3).....	80
<b>Tabela 7</b> - Limites de detecção obtidos por ICP-MS, IC, ICP OES e AOAC após os diferentes preparos de amostras.....	85
<b>Tabela 8</b> - Concentração de Br, Cl, F, I e S nas diferentes marcas de ovo integral e suas frações (resultados expressos em mg kg <sup>-1</sup> ± desvio padrão, n=3).....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AAS - espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*
- AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*
- CFA-C - soluções de aminas terciárias solúveis em água
- CRM - material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
- FMIC - combustão iniciada por micro-ondas focalizada, do inglês *focused microwave induced combustion*
- GC - cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*
- HTMA - hidróxido de tetrametilamônio
- IC - cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*
- ICCIDD - Conselho Internacional do Controle de Desordens de Deficiência de Iodo, do inglês *International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders*
- 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*
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- ISE - eletrodo de íon seletivo, do inglês *ion-selective electrode*
- LD - limite de detecção
- MIC - combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*
- INAA - análise instrumental por ativação neutrônica, do inglês *instrumental neutron activation analysis*
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- NIST - *National Institute of Standards and Technology*
- OMS - Organização Mundial da Saúde
- 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*

SRM - material de referência padrão, do inglês *standard reference material*

TISAB - solução de ajuste de força iônica, do inglês *total ionic strength adjustment buffer*

WHO - *World Health Organization*

## RESUMO

Título: Desenvolvimento de método para a determinação de halogênios e enxofre em ovo integral desidratado e suas frações

Autora: Ísis Gonçalves Toralles

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

Métodos envolvendo a extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, bem como a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foram aplicados para o preparo de amostras de ovos integrais e suas frações para a posterior determinação de Br, Cl, F, I e S por cromatografia de íons (IC), por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Soluções de hidróxido de amônio (NH<sub>4</sub>OH), hidróxido de tetrametilamônio (HTMA) e água foram avaliadas com o intuito de selecionar as soluções mais adequadas para cada estudo. Os métodos baseados na extração alcalina não foram adequados, visto que as concentrações de Br e I nas soluções obtidas resultaram em extrações incompletas e não homogêneas com desvios padrão relativos (RSDs) de até 71%, bem como valores bastante elevados para Br e I nos brancos. Além disso, não foi possível determinar as concentrações de F, Cl e S por IC após os procedimentos de extração, devido ao elevado teor de carbono presente em solução. Usando a MIC foi possível decompor massas de até 350 mg de ovo integral e suas frações. Para tanto, foi necessário utilizar uma solução de nitrato de amônio como solução de ignição, sendo esta adicionada ao invólucro contendo a amostra. Como solução absorvedora para Br, Cl, F, I e S foi escolhido NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup>. Nestas condições foram obtidas recuperações entre 98 e 103% e concordâncias superiores a 94% com os valores de referência do material de referência (RM) NIST 8435. Com base nesses estudos foi possível desenvolver um método adequado para a determinação de Br, Cl, F, I e S em ovos integrais desidratados e suas frações, envolvendo a decomposição das amostras por MIC e posterior determinação dos analitos por IC, ICP-MS, ou ICP OES. O método desenvolvido possibilitou observar que, principalmente, as concentrações de Cl e S variaram de modo considerável, dependendo da fração e amostra analisada. Contudo, esse comportamento não foi observado para o F, visto que suas concentrações encontraram-se abaixo do limite de detecção (LD), o qual foi de 44,1 mg kg<sup>-1</sup>. Concordâncias entre 100 e 103% foram obtidas para Cl, quando comparado os valores obtidos pelo método MIC-IC com os do método oficial (AOAC).

Palavras-chave: preparo de amostras; combustão iniciada por micro-ondas; halogênios; enxofre; ovo integral; clara e gema de ovo

## ABSTRACT

Title: Development of method for halogens and sulfur determination in whole powder egg and its fractions

Author: Ísis Gonçalves Toralles

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

Methods involving microwave-assisted extraction using alkaline solutions, as well as microwave induced combustion (MIC) were applied for sample preparation of whole eggs and its fractions for further Br, Cl, F, I e S determination by ion chromatography (IC), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Solutions of ammonium hydroxide, tetramethyl ammonium hydroxide and water were evaluated in order to select the best suitable solutions for each studied. Methods based in alkaline extraction were not suitable, taking into account that Br and I concentrations in solutions obtained resulted in extractions incomplete and not homogenous with relative standard deviations (RSDs) up to 71%, as well as high values for Br and I in blanks. Moreover, it was not possible to determine F, Cl and S concentrations by IC after extraction procedures, due to the high carbon content present in solution. Using MIC was possible to decompose masses up to 350 mg of whole egg and its fractions. For this, it was necessary to use an ammonium nitrate solution as ignition aid, being this added to the polyethylene bag containing the sample. As absorbing solution for Br, Cl, F, I and S  $\text{NH}_4\text{OH}$  50 mmol  $\text{l}^{-1}$  was selected. In these conditions, recoveries between 98 and 103% and agreements higher than 94% with reference values of the reference material (RM) NIST 8435 were obtained. Based on these studies it was possible to develop a suitable method for Br, Cl, F, I and S determination in whole egg powder and its fractions, involving sample decomposition by MIC for further analyte determination by IC, ICP-MS or ICP OES. The proposed method allowed to observe that mainly the Cl and S concentration ranged considerably depending on the fraction and sample analyzed. However, this behavior was not observed for F, since their concentrations were below the limit of detection (LOD), which was 44.1 mg  $\text{kg}^{-1}$ . Agreements between 100 and 103% were obtained for Cl, when compared the values obtained by MIC-IC method with the official method (AOAC).

Key-words: sample preparation; microwave-induced combustion; halogens; sulfur; whole egg; white and yolk egg

## 1 INTRODUÇÃO

Cloro, flúor e enxofre são considerados minerais importantes para o organismo dos seres vivos, visto que participam de diversas funções para o seu funcionamento. De uma maneira geral, estes elementos atuam na manutenção do balanço ácido-básico (pH) do sangue, na pressão osmótica e balanço da água corporal, no transporte de nutrientes através de membranas, na prevenção de cáries dentárias, na regulação da permeabilidade das membranas de vários tecidos, além de fazerem parte da composição de várias enzimas (WHO, 1996; ARAÚJO *et al.*, 2008). Em particular, o iodo é imprescindível para a síntese de hormônios na glândula da tireoide (COZZOLINO, 2012). Por sua vez, o bromo é um elemento que não apresenta uma função fisiológica totalmente conhecida, visto que seu mecanismo de ação no organismo não é totalmente elucidado (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2011). No entanto, estudos têm associado o excesso ou a carência deste elemento a transtornos que trazem malefícios ao organismo humano (KOHLMIEIER, 2003).

Dentre os alimentos que devem ter a concentração de Br, Cl, F, I e S monitorada, pode-se destacar os ovos, visto que se trata de um alimento bastante consumido mundialmente. Países como China, Japão e México chegam a consumir 350 unidades por pessoa durante o ano, enquanto que no Brasil este consumo é menor, estando em torno de 169 unidades por ano. Com relação a produção de ovos no Brasil, cabe mencionar que o estado de São Paulo é o maior produtor de ovos (34%) e que em 2013 a produção brasileira chegou a aproximadamente 34 bilhões de unidades (UBA, <http://www.uba.org.br>; KOBELITZ, 2011). Dentro desse contexto, cabe destacar a relevância de obter informações a respeito da composição mineral de alimentos, pois, além de serem escassos os trabalhos que tenham avaliado estes analitos em ovos, tratam-se de elementos importantes para o metabolismo dos seres vivos.

De uma maneira geral, previamente a quantificação de halogênios e S é necessário o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras adequado para este fim. Para tanto, deve-se considerar que o preparo de amostras visando a posterior determinação de não metais e, principalmente, de halogênios é um desafio analítico, em consequência da possibilidade de volatilização destes analitos, bem como de contaminação durante o preparo e a análise das amostras (KRUG, 2010).

Dessa forma, a escolha do método de preparo de amostras deve estar associada com o(s) elemento(s) de interesse, com a concentração em que o(s) mesmo(s) se encontra(m), com natureza da amostra e técnica de detecção utilizada, bem como com a precisão e a exatidão desejadas (KRUG, 2010). Por se tratar de uma amostra orgânica em que o interesse é a posterior determinação de não metais, o uso de soluções alcalinas associado a métodos de extração ou combustão têm sido proposto (NÓBREGA *et al.*, 2006; BARIN *et al.*, 2014).

Em relação as técnicas analíticas para a determinação de não metais, além da disponibilidade de instrumentos, o grande desafio é o uso de uma técnica que possibilite a determinação de elementos em concentrações cada vez menores e em matrizes mais complexas (KRATOCHVIL, 2003). Para tanto, algumas técnicas analíticas têm sido amplamente utilizadas para este fim, como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a cromatografia de íons (IC) (MELLO *et al.*, 2013).

Diante do exposto, cabe enfatizar a relevância do constante avanço científico e tecnológico na área de química analítica, principalmente, no desenvolvimento de métodos de preparo de amostras, a fim de proporcionar o desenvolvimento de novos procedimentos que proporcionem a quantificação de forma exata, precisa e segura de minerais em alimentos.

## 2 OBJETIVOS

### Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um método de preparo de amostras para a subsequente determinação de Br, Cl, F, I e S em ovos integrais desidratados e suas frações (clara e gema), por IC, ICP-MS e/ou ICP OES.

### Objetivos Específicos

1. Caracterizar quanto os constituintes majoritários das amostras de ovo integral desidratado, clara e gema desidratadas;
2. Otimizar a massa máxima de amostra, a solução absorvedora e o programa de irradiação micro-ondas para o preparo das amostras por Combustão Iniciada por Micro-ondas (MIC);
3. Avaliar o uso de métodos de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas;
4. Quantificar Br, Cl, F, I e S nas soluções utilizadas para o preparo das amostras por MIC e por extração alcalina assistida por radiação micro-ondas por IC, ICP-MS e/ou ICP OES;
5. Aplicar o método oficial recomendado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para a determinação de Cl em ovos e suas frações;
6. Aplicar o método desenvolvido para a análise de ovos integrais e suas frações oriundas de diversas empresas.

*Esta revisão bibliográfica está dividida em quatro partes principais. Na primeira delas, serão abordados alguns aspectos gerais sobre bromo, cloro, flúor, iodo e enxofre relacionados principalmente as suas funções fisiológicas e à necessidade de determinação dos mesmos em alimentos. Na segunda parte, serão apresentados alguns aspectos gerais sobre o ovo, incluindo sua contribuição nutricional, constituição química, bem como sobre a sua produção nacional. Em uma terceira parte será feita uma breve descrição sobre os métodos de preparo de amostras utilizados para a posterior determinação de halogênios, onde será dada ênfase aqueles utilizados na execução deste trabalho. Na quarta e última parte, serão abordados os aspectos relacionados à determinação de halogênios por IC, ICP-MS e ICP OES.*

## **Absorção, Metabolismo e Biodisponibilidade de Halogênios e Enxofre no Organismo Humano**

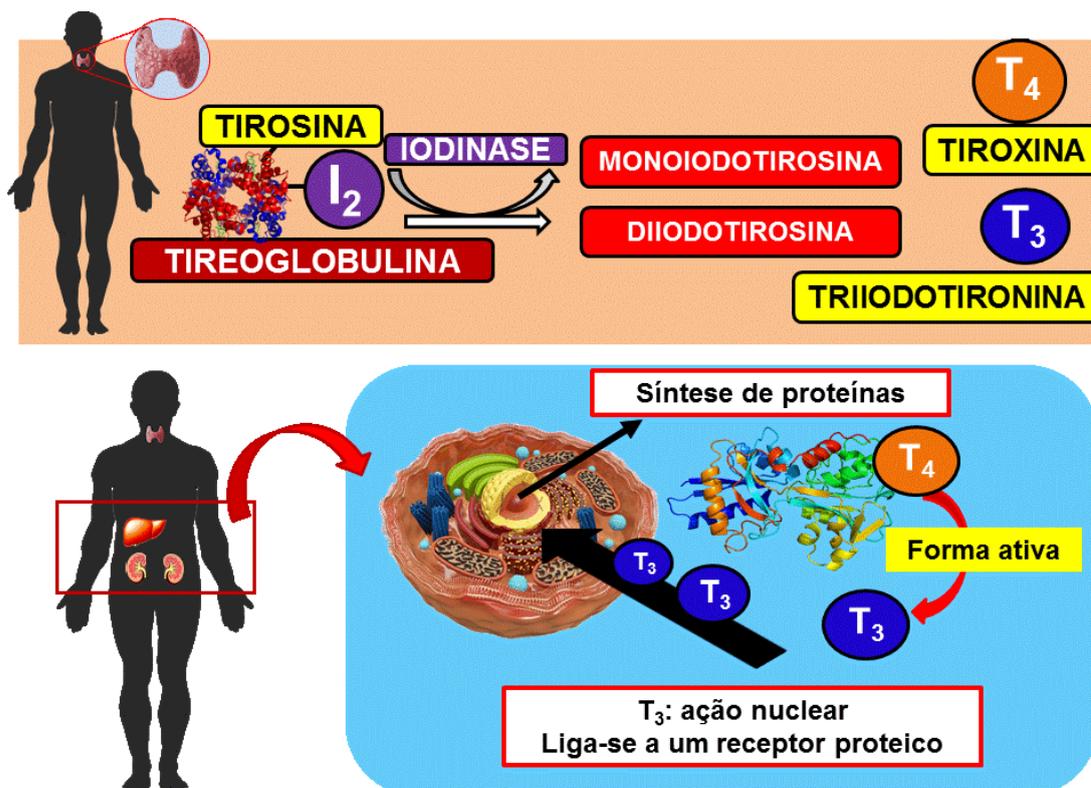
Considerando os elementos investigados neste trabalho (bromo, cloro, flúor, iodo e enxofre), o iodo está entre os minerais mais reportados na literatura, devido sua importância no organismo humano (COZZOLINO, 2012). Além disso, em ovos e suas frações (clara e gema), este mineral foi o mais investigado até o presente momento (FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998; ROSE *et al.*, 2001; ZIKOVSKY e SOLIMAN, 2002; DAHL *et al.*, 2003; HALDIMANN *et al.*, 2005; TRAVNICEK *et al.*, 2006; DUSOVÁ *et al.*, 2012).

O iodo, quando presente na forma inorgânica no organismo, é quase totalmente absorvido no intestino delgado. Por sua vez, quando este mineral encontra-se ligado a uma estrutura orgânica, sua absorção pelo trato gastrointestinal é diminuída para cerca de 50%. Geralmente, o conteúdo total de iodo no organismo é de cerca de 120-160  $\mu\text{mol}$  (15 - 20 mg), sendo que entre 70 e 80% deste elemento é acumulado nas estruturas da glândula tireoide. No momento em que a síntese de hormônios nesta glândula está completa, o excesso de iodo é excretado na urina (ZIMMERMANN; JOOSTE; PANDAV, 2008; COZZOLINO, 2012).

Na tireoide, os íons iodeto são oxidados a iodo elementar ( $\text{I}_2$ ) que, por sua vez, reage com resíduos de tirosina, presentes na estrutura da proteína tireoglobulina, para formar resíduos de monoiodo e diiodotirosina. Esta reação só é possível sob a ação da enzima iodinase que, num segundo momento, catalisa a transferência de um grupo diiododifenil de um resíduo de diiodotirosina para outro, formando a tiroxina ( $\text{T}_4$ ), incorporada a proteína. Além disso, essa enzima também é responsável por catalisar a transferência de resíduos de monoiodotirosina para a diiodotirosina, formando pequenas quantidades de triiodotironina ( $\text{T}_3$ ) (ZIMMERMANN; JOOSTE; PANDAV, 2008; COZZOLINO, 2012).

A tireoglobulina iodada é então captada pelas células da tireoide, onde ocorre um processo conhecido como proteólise, que libera  $\text{T}_4$  e uma pequena quantidade de  $\text{T}_3$ . Estes hormônios são liberados da glândula, através do estímulo da tireotrofina que, por sua vez, tem sua secreção controlada pela  $\text{T}_4$  circulante. Estes hormônios circulam no organismo ligados a globulina, sendo absorvidos pelo fígado, rins e tecidos-alvo. A tiroxina sofre desiodação para  $\text{T}_3$ , que representa a forma ativa do hormônio (COZZOLINO, 2012). No núcleo da célula,  $\text{T}_3$  liga-se a um receptor

proteico e, depois de sua dimerização e ativação, o complexo receptor hormônio é incorporado especificamente a um fator de transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA), que regula a transcrição de um ou mais genes para a síntese de proteínas (COZZOLINO, 2012). A seguir, na Fig. 1 é ilustrado um resumo do metabolismo da síntese de iodo no organismo.



**Figura 1** - Esquema ilustrativo do processo metabólico do iodo no organismo.

O iodo, na forma de hormônio, possui várias funções fisiológicas importantes para o organismo, como participar do desenvolvimento e crescimento e controlar processos metabólicos no organismo. Em humanos, estes hormônios são essenciais para o crescimento e desenvolvimento do cérebro e do sistema nervoso central desde a 15ª semana de gestação até os 3 anos de idade (COZZOLINO, 2012).

Fatores ambientais e hábitos alimentares contribuem para a elevada ocorrência de doenças associadas a deficiência ou excesso de iodo no organismo. Dentre os principais distúrbios causados pela deficiência deste mineral, pode-se citar o bócio endêmico, cretinismo endêmico e hipotireoidismo (ZIMMERMANN; JOOSTE; PANDAV, 2008; COZZOLINO, 2012). Em contrapartida, ingestões excessivas de

iodo ocasionam hipertireoidismo e bócio endêmico (WHO, 1996). É interessante enfatizar que juntamente a este micronutriente, selênio e zinco também estão envolvidos com o metabolismo dos hormônios tireoidianos e, dessa forma, contribuem para o desenvolvimento de doenças, quando deficientes no organismo. Além disso, ingestões elevadas de tiocianato, o qual compete com o iodo durante sua captação pela glândula da tireoide, contribuem para o desenvolvimento de bócio, quando presente na dieta em quantidades elevadas (COZZOLINO, 2012).

Alimentos de origem marinha são excelentes fontes de iodo, entretanto, em geral, são consumidos em pequenas quantidades. Por outro lado, alimentos como sal iodado, leite e ovos, que também são considerados fontes alimentares deste mineral, são mais largamente consumidos (COZZOLINO, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef) e o *International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders* (ICCIDD), as recomendações de ingestão de iodo para crianças são de 90  $\mu\text{g dia}^{-1}$ , para adolescentes e adultos é de 150  $\mu\text{g dia}^{-1}$  e para gestantes e lactantes é de 200  $\mu\text{g dia}^{-1}$  (WHO, 2007; COZZOLINO, 2012).

Apesar de o iodo ser um dos minerais mais investigados, outros minerais como bromo, cloro, flúor e enxofre merecem atenção especial, visto que desempenham funções essenciais e/ou toxicológicas no organismo. Com relação ao bromo, cabe mencionar que seu mecanismo de ação é desconhecido até o momento. No entanto, alguns autores relataram que, dependendo da forma química, este elemento pode ser considerado carcinogênico, levando à formação de células renais tumorais, bem como à formação de células foliculares tumorais da glândula tireoide (VOBECKY *et al.*, 1996; DEANGELO *et al.*, 1998; DELKER *et al.*, 2006). Além disso, o bromo pode interferir no transporte do iodo para a glândula tireoide, o que poderia inibir o funcionamento da mesma (VOBECKY *et al.*, 1996; FAO/WHO, 2004). Segundo Van Dokkum *et al.* (1989), doses de 8 mg  $\text{dia}^{-1}$  de bromo parecem ser adequadas a jovens adultos. Quando deficiente no organismo, o mesmo vem sendo associado ao retardo no crescimento e à insônia. Por sua vez, o excesso encontra-se associado a dores de cabeça, broncoespasmos, distúrbios gastrointestinais, fadiga e tolerância reduzida a exercícios (KOHLMEIER, 2003).

Cloro, flúor e enxofre são minerais que atuam de diferentes formas no organismo. O cloro, por exemplo, participa da manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio ácido-básico, na transmissão de impulsos nervosos e no transporte ativo

dos aminoácidos e da glicose em nível celular. Além disso, este mineral, como ácido clorídrico, faz parte do suco gástrico (ARAÚJO *et al.*, 2008). Sobre a sua toxicidade, cabe mencionar que esta é geralmente relacionado ao contra íon que o cloro está associado (FAO/WHO, 2004). No entanto, o cloro, ligado ou não a um composto volátil, pode ocasionar lesões nos pulmões, sendo esta vinculada desde a irritações nas membranas mucosas até o edema pulmonar (EVANS, 2005). Ainda, o contato, em excesso, com agrotóxicos contendo cloro pode gerar complicações no nascimento de bebês, bem como problemas no neurodesenvolvimento do cérebro (WHYATT, 2004). Considerando que o cloro geralmente é ingerido na forma de um sal mineral, diversos alimentos contêm o mesmo na sua composição química, como frutas, grãos, vegetais, produtos cárneos, produtos lácteos e pescados. Cabe mencionar ainda que, embora não haja um limite máximo de ingestão diária de cloro, deve-se considerar que sua limitação ocorre em função do contra íon ingerido concomitantemente, como no caso do sódio, na forma de cloreto de sódio (BLAKE; MUNOZ; VOLPE, 2009).

Por sua vez, o flúor em concentrações inferiores ao que é considerado normal no sangue ( $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (WHO, 1996) não previne a cárie. Em contrapartida, em concentrações elevadas (acima de  $0,04 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) pode afetar o funcionamento dos rins e das hemácias (FAO/WHO, 2004; PRYSTUPA, 2011). Ingestões diárias de 0,2 a 2 mg de F são consideradas como adequadas para adultos, sendo a água potável um dos principais alimentos responsáveis por fornecer esse mineral para o organismo dos indivíduos (WHO, 1996).

Com relação ao enxofre, é possível destacar que ele é importante no metabolismo e síntese de proteínas, gorduras e carboidratos. Ainda, este mineral participa da síntese de vitaminas do complexo B (ARAÚJO *et al.*, 2008). Acima de 60% do sulfato da dieta é proveniente de alimentos que contém metionina, cisteína, glutatona e taurina. Uma dieta variada contendo carne, alimentos lácteos, peixes, ovos, legumes e vegetais são considerados uma fonte deste mineral. Além desses, bebidas como cerveja, vinho e alguns sucos também podem conter enxofre, podendo, assim, ser uma fonte extra do mesmo. Não há um limite máximo em relação a ingestão de enxofre, geralmente, a maioria dos indivíduos consome uma quantidade suficiente de proteína capaz de fornecer quantidades adequadas deste mineral para o metabolismo do organismo (BLAKE; MUNOZ; VOLPE, 2009).

Dessa maneira, levando-se em consideração a relevância desses minerais no organismo, bem como pelo fato de que estes estão contidos em diversos alimentos, podendo, assim, suprir necessidades importantes para o metabolismo humano e/ou o desenvolvimento de doenças, se ingeridos em concentrações inadequadas – é imprescindível que estudos visando o controle dos mesmos em produtos alimentícios sejam realizados. Dentre os diversos alimentos que podem conter estes minerais, cabe citar o ovo, visto que se trata de um alimento rico nutricionalmente, que apresenta diversos minerais (KOBBLITZ, 2011).

### **Ovos - Generalidades**

De acordo com a legislação brasileira, são denominados apenas de “ovos” aqueles que forem provenientes da espécie das galinhas (*Gallus gallus*). Com isso, para outras espécies o nome deve ser especificado conforme a sua origem, como, por exemplo, “ovo de codorna”. Por sua vez, entende-se como “ovo integral” aquele que é desprovido de casca e que conserva as proporções naturais de clara e de gema, que, quando misturados, resultam em uma substância homogênea (BRASIL, 1990).

A maioria dos ovos de aves tem composição extremamente parecida e oferece quantidades semelhantes de calorias (50 a 190 cal 100 g<sup>-1</sup>). Assim, o tamanho de um ovo é o que o diferencia, pois, enquanto que ovos de avestruz têm cerca de 1400 g, ovos de galinha têm em média 55 g (KOBBLITZ, 2011).

No Brasil, a disposição de normas gerais de inspeção de ovos e derivados são especificados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na Portaria 01, de 21 de fevereiro de 1990 (Brasil, 1990). Além disso, no MAPA está publicada a Resolução 05, de 05 de julho de 1991, a qual relata requisitos em relação ao padrão de identidade e qualidade dos ovos integrais (BRASIL, 1991). Os parâmetros para avaliação da qualidade compreendidos nessa resolução incluem sólidos totais, pH, proteína bruta, cinzas e gordura. Internacionalmente, os critérios de qualidade dos ovos integrais encontram-se compilados na Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, <http://www.codexalimentarius.org>).

A produção de ovos no Brasil encontra-se distribuída em diferentes estados, sendo que em 2013 os principais estados produtores foram São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo, com cerca de 34%, 13% e 9% desta produção, respectivamente.

Neste contexto, cabe mencionar que em 2013 a produção brasileira chegou a aproximadamente 34 bilhões de unidades (UBA, <http://www.uba.org.br>).

Com relação ao consumo *per capita* de ovos no Brasil, cabe salientar que de acordo com dados de 2013 da União Brasileira de Avicultura (UBA, <http://www.uba.org.br>), são ingeridos cerca de 169 unidades deste produto por pessoa ao longo de um ano no País. Esse número é considerado muito baixo em comparação com os maiores consumidores mundiais (China, Japão e México), cujo valor *per capita* chega a 350 unidades por ano (KOBELITZ, 2011, UBA, <http://www.uba.org.br>). Esse baixo consumo está associado, principalmente, a tabus relacionados a problemas de saúde, como nível de colesterol no sangue, bem como a baixa renda *per capita* do País, se comparado a outros países, o que torna mínimo o consumo de produtos de maior valor agregado. Além disso, este baixo consumo pode estar associado ao fato do brasileiro não consumir, em elevadas quantidades, pratos culinários que incluem ovo como componente, como os *burgers* nos EUA ou as “tortillas” mexicanas no México (CIAS, <http://www.cnpsa.embrapa.br/cias>). Dentro desse contexto, cabe mencionar ainda que, no mercado internacional, a participação do Brasil, em 2013, no que diz respeito à exportação de ovos *in natura* e processados foi muito pequena, visto que foi exportado em torno de 1% do total comercializado, sendo que 90% do que foi exportado correspondeu a ovos *in natura* (UBA, <http://www.uba.org.br>).

Na indústria de alimentos, ovos integrais pasteurizados, congelados ou desidratados são preferencialmente utilizados no lugar de ovos *in natura*, pois além do sabor, cor, valor nutritivo e propriedades funcionais serem compatíveis aos dos ovos *in natura*, estes apresentam algumas vantagens operacionais, tais como maior estabilidade, uniformidade, economia de mão-de-obra, além de ocupar menos espaço para armazenar e facilitar o manuseio, no que tange a medida de porções (ARAGON-ALEGRO *et al.*, 2005). Os ovos líquidos são utilizados na fabricação de vários alimentos como bolos, merengues, produtos de confeitaria, embutidos, etc. (BARON *et al.*, 2004). Além de seu uso como ingrediente, os ovos são utilizados como matéria-prima principal na obtenção de diferentes produtos alimentícios, como, por exemplo, ovos ou gemas cozidos em conserva e licor de ovos (KOBELITZ, 2011).

Com respeito aos ovo desidratados, cabe mencionar que seu processo de obtenção ocorre através da secagem de ovos líquidos, por processo *Spray-Drier*, onde ocorre a remoção praticamente total da água, sem afetar a qualidade do ovo.

Basicamente este processo consiste na pulverização do ovo líquido, feita numa câmara de secagem, através de um disco rotativo. As gotículas de ovo são dispersas em corrente de ar quente. Esse procedimento resulta em uma grande área superficial e a evaporação da umidade é praticamente instantânea. Após a secagem, o pó é conduzido através de transporte pneumático até um conjunto de ciclones, onde é feita a separação entre o pó e o ar quente. Por fim, o pó é conduzido para peneira vibratória e, em seguida, embalado (KESHANI *et al.*, 2015).

Em relação aos benefícios do consumo de ovos para a saúde humana, estudos têm indicado que o mesmo possui atividades antimicrobiana e anti-hipertensiva. Além disso, possui propriedades anti-adesiva, antioxidante, anticancerígena, imunomoduladora, dentre outros (KOVACS-NOLAN; PHILLIPS; MINE, 2005). Dentro desse contexto, cabe mencionar que os benefícios à saúde humana, proporcionados pelo consumo de ovos, estão diretamente relacionados com a composição nutricional desse alimento. Nele são encontradas, de uma maneira geral, proteínas de alto valor biológico, vitaminas do complexo B, A, E, K, minerais (como ferro, fósforo, selênio e zinco) e carotenoides (como a luteína e zeaxantina) (KOBBLITZ, 2011).

Considerando que fatores como a idade e a alimentação de aves poedeiras influenciam a qualidade e quantidade de nutrientes presentes nos ovos (GARCIA *et al.*, 2010), na indústria, estratégias relacionadas à modificação na composição nutricional da ração de poedeiras vêm sendo exploradas na tentativa de melhorar a qualidade nutricional desse alimento. Entre as estratégias utilizadas, pode-se destacar a modificação da composição de lipídios, bem como o aumento da quantidade de vitaminas e de minerais disponíveis nas rações (DONATO *et al.*, 2009).

No entanto, cabe mencionar que, embora estudos têm buscado avaliar os efeitos benéficos gerados a partir da modificação de um ou mais nutrientes em rações de poedeiras (ARAÚJO *et al.*, 2007, 2008; CEDRO *et al.*, 2010), geralmente, os mesmos incluem apenas a avaliação de nutrientes majoritários, como ácidos graxos e aminoácidos. Diante disso, existem poucos trabalhos que investigaram a concentração de minerais, como Br, Cl, F, I e S em ovos e/ou suas frações (WEDRAL; VADEHRA; BACKER, 1974; SCHAAFSMA *et al.*, 2000; ROSE *et al.*, 2001; ZIKOVSKY & SOLIMAN, 2002; DAHL *et al.*, 2003; HALDIMANN *et al.*, 2005; TRAVNICEK *et al.*, 2006; DUSOVÁ *et al.*, 2012).

De uma forma geral, os métodos convencionalmente utilizados para o preparo de amostras, visando a posterior determinação desses minerais, nesse tipo de alimento, apresentam alguns inconvenientes. No preparo das amostras, geralmente, são utilizados reagentes como soluções de aminas terciárias solúveis em água (CFA-C) e hidróxido de tetrametilamônio (HTMA), que requerem um elevado tempo nesta etapa (> 2 h). Como técnicas de determinação, são utilizadas, geralmente, a análise instrumental por ativação neutrônica (INAA) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998; KNAPP *et al.*, 1998; GÉLINAS; IYENGAR; BARNES, 1998; ROSE *et al.*, 2001).

### **Preparo de Amostras**

A determinação direta de analitos em amostras sólidas, na maioria das vezes, é mais difícil devido a diversos fatores como interferências e heterogeneidade da amostra; incompatibilidade com a técnica de determinação que, em muitos casos, requer que a amostra esteja na forma de uma solução para análise; limitações relacionadas à calibração dos equipamentos; e indisponibilidade dos analitos em uma forma conveniente de ser determinada. Neste sentido, com o objetivo de eliminar essas limitações, faz-se necessária a introdução de uma etapa de preparo das amostras, previamente a etapa de determinação. Para que o método escolhido para o preparo de amostras seja considerado adequado ele deve ser eficiente e, sempre que possível, simples. Além disso, deve oferecer mínima manipulação da amostra, frequência analítica e não deve ser passível a erros sistemáticos, como perdas por volatilização dos analitos e riscos de contaminação (KRUG, 2010).

Dessa maneira, a escolha do método de preparo de amostras deve estar associada com a natureza da amostra e do elemento a ser determinado, com a concentração em que o mesmo se encontra, com a técnica de detecção utilizada, bem como com a precisão e a exatidão desejadas. Frequentemente, esta etapa é considerada como uma das mais críticas, tendo em vista que, geralmente, é a mais demorada, de maior custo e onde se cometem mais erros (SNEDDON *et al.*, 2006; GONZALEZ *et al.*, 2009; KRUG, 2010). Diante disso, existe a necessidade de um constante avanço tecnológico nesta área, influenciado pelo progresso das técnicas

analíticas, no que tange a determinação de elementos em concentrações cada vez menores e em matrizes mais complexas (KRATOCHVIL, 2003).

### **Preparo de Amostras para a Posterior Determinação de Halogênios e Enxofre**

Considerando à relevância da determinação de não-metals em alimentos, faz-se necessário o desenvolvimento de um método de preparo de amostras adequado para este fim. O preparo de amostras visando a posterior determinação de não-metals e, principalmente, de halogênios pode ser considerado um problema analítico, em consequência da possibilidade de volatilização destes analitos, bem como de contaminação durante o preparo e a análise das amostras.

Dentro desse contexto, cabe mencionar que a possibilidade de perda dos analitos por volatilização aumenta com a utilização de ácidos inorgânicos na etapa de decomposição, uma vez que o uso de ácidos em combinação com os halogênios pode levar à formação de substâncias voláteis (SULCEK; POVONDRA, 1989; KNAPP *et al.*, 1998). Ainda, o uso de soluções ácidas concentradas pode resultar em um aumento significativo dos brancos analíticos, além de requerer a realização de uma etapa de diluição, previamente à determinação, com vistas a reduzir a concentração ácida do meio (FLORES *et al.*, 2004). Ainda é importante mencionar que a elevada acidez residual nas amostras decompostas pode acarretar em problemas de compatibilidade com a técnica de determinação, como no caso da cromatografia de íons (IC), amplamente utilizada para a determinação destes elementos (MELLO *et al.*, 2013)

Assim, tendo em vista as desvantagens anteriormente mencionadas, uma alternativa para o preparo de amostras para subsequente determinação de não-metals é a utilização de soluções alcalinas, seja por meio de procedimentos de preparo que envolvam extrações ou dissoluções. Segundo Nóbrega *et al.* (2006), a utilização de soluções alcalinas tem envolvido um grupo apreciável de analitos em diferentes matrizes e, dentre os principais reagentes utilizados, pode-se destacar o uso do HTMA, as soluções de CFA-C, bem como outras bases fortes.

Neste contexto, levando-se em consideração que o uso das soluções alcalinas anteriormente citadas requer, geralmente, um elevado tempo de preparo de amostras (> 2 h), uma segunda alternativa para o preparo das amostras visando à

determinação de halogênios e S deve ser considerada. Esta consiste na utilização de métodos baseados nas reações de combustão. Nessas, o carbono e hidrogênio presentes na amostra são convertidos, quase que na totalidade, em seus respectivos produtos de oxidação, o que possibilita a obtenção de baixos teores de carbono residual (RCCs). Consequentemente, com a redução dos RCCs é possível minimizar ou até mesmo eliminar problemas de interferências durante a determinação dos analitos (BARIN; FLORES; KNAPP, 2006; FLORES *et al.*, 2007; BARIN *et al.* 2014). Ainda sobre as técnicas de combustão cabe salientar que os analitos podem ser retidos em uma solução adequada a sua absorção, bem como à técnica que será utilizada para a determinação dos elementos de interesse (FLORES *et al.*, 2007; BARIN *et al.* 2014).

Nesta revisão serão abordados com mais detalhes os métodos de preparo de amostras que utilizam soluções alcalinas, bem como as técnicas de combustão em sistema fechado, em especial a combustão iniciada por micro-ondas (MIC).

### **Preparo de Amostras Utilizando Soluções Alcalinas**

A utilização de soluções alcalinas pode fornecer métodos de preparo de amostras simples e eficientes, no que tange a absorção dos analitos, além de permitir a aplicação de radiação micro-ondas e não ocasionar mudanças no estado de oxidação do(s) analito(s) (NÓBREGA *et al.*, 2006). Além disso, seu uso pode reduzir o efeito de memória e interferências poliatômicas, observados para alguns elementos, principalmente os halogênios, quando analisados por ICP-MS (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1998; FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998).

Em geral, para o preparo de amostras por dissolução ou extração com solução alcalina, o HTMA tem sido um dos reagentes mais utilizados. Esse reagente vem sendo aplicado, principalmente, para o tratamento de amostras alimentícias e biológicas (até 500 mg). Ainda, cabe mencionar que, geralmente, são utilizados pequenos volumes desse reagente ( $\leq 1$  ml), sendo a homogeneização realizada à temperatura ambiente ou sob aquecimento (geralmente entre 60 e 90 °C) (ROSE *et al.*, 2001; MARTINS *et al.*, 2002; NÓBREGA *et al.*, 2006; TAGAMI *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2009; CAMPILLO, *et al.*, 2010; GHISI *et al.*, 2011; ROMARÍS-HORTAS; BERMEJO-BARRERA; MOREDA-PINEIRO, 2012).

Em relação aos elementos determinados, após o preparo de amostras alimentícias e biológicas por dissolução ou extração com HTMA, são citados na literatura diversos metais como Ag, Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sr, V e Zn (MARTINS *et al.*, 2002; BATISTA *et al.*, 2009; CAMPILLO, *et al.*, 2010; GHISI *et al.*, 2011) e alguns halogênios (Br, Cl e I) (ROSE *et al.*, 2001; TAGAMI *et al.*, 2006; ROMARÍS-HORTAS; BERMEJO-BARRERA; MOREDA-PINEIRO, 2012).

Dentre os autores citados, somente o estudo descrito por Rose *et al.* (2001) determinou Br e I em ovos por ICP-MS, após o preparo das amostras por extração utilizando HTMA. Neste trabalho, foram utilizados 500 mg de amostra seca ou 3 ml de amostra líquida, sendo a extração dos analitos realizada com 2 ml de uma solução de HTMA (25% m m<sup>-1</sup>) diluída 1:1 com água desionizada, sob aquecimento (75 - 80 °C) por 4 h. Por meio da análise das soluções obtidas após a extração com HTMA os autores determinaram, por ICP-MS, as concentrações de Br e I, onde encontraram 2,6 mg kg<sup>-1</sup> e 0,48 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, na amostra, e limites de detecção (LDs) de 0,07 mg kg<sup>-1</sup> para ambos analitos. No entanto, cabe destacar que a exatidão do método proposto não foi avaliada neste estudo.

Na literatura é possível encontrar, ainda, outros trabalhos que utilizaram solução de HTMA (25% m m<sup>-1</sup>) para o preparo de amostras de ovos com vistas na determinação de I. Nestes estudos, o material de referência (RM) NIST 8415 (*Whole Egg Powder*) (200 - 500 mg) foi homogeneizado com 1 ml de HTMA (25% m m<sup>-1</sup>), sob aquecimento a 90 °C, por 3 h, sendo, posteriormente, diluído com água purificada (25 ml). Após a determinação, por ICP-MS, os autores obtiveram concordâncias em torno de 98% entre o valor encontrado e o valor de referência para I no RM (FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998; KNAPP *et al.*, 1998). Com relação aos LDs, Fecher, Goldmann e Nagengast (1998) descrevem que obtiveram um LD em torno de 0,03 mg kg<sup>-1</sup> para I, considerando 100 mg de amostra seca e um fator de diluição de 50 vezes (FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998). Por sua vez, Knapp *et al.* (1998) descrevem que obtiveram um LD de 0,01 µg I<sup>-1</sup> (KNAPP *et al.*, 1998).

Neste contexto, é importante mencionar que, embora o uso de HTMA apresente algumas vantagens frente a outros métodos de preparo de amostras, como os que utilizam soluções ácidas concentradas – seu uso pode acarretar em brancos analíticos elevados, devido à dificuldade envolvida na sua purificação. Ademais, por não promover a decomposição das amostras, esse reagente,

geralmente, proporciona soluções com elevados teores de carbono, quando utilizado no preparo de amostras orgânicas. Diante disso, normalmente sucessivas diluições devem ser feitas previamente a etapa de determinação, o que, conseqüentemente, ocasiona em LDs maiores (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Com respeito ao uso de soluções de CFA-C e soluções de amônia também foram descritas na literatura no preparo de amostras alimentícias e biológicas. No trabalho desenvolvido por Oliveira, Nóbrega e Pereira-Filho (2012) uma solução de CFA-C (10% v v<sup>-1</sup>) foi utilizada para o preparo de amostras de sal de cozinha iodado para subsequente determinação de I por ICP OES. Para tanto, 500 mg de sal foram dissolvidos em 25 ml de CFA-C (10% v v<sup>-1</sup>). Como resultados, os autores mencionam que as nove marcas de sal de cozinha iodado avaliadas apresentaram concentrações de I que variaram entre 13 e 35 mg kg<sup>-1</sup>. Além disso, os autores descrevem que método desenvolvido mostrou-se adequado, visto que o mesmo proporcionou boa exatidão (recuperações de até 120%) e LD de 0,1 mg l<sup>-1</sup> para I (OLIVEIRA; NÓBREGA; PEREIRA-FILHO, 2012).

Por sua vez, no caso de soluções de amônia, pode-se citar o trabalho de VANHOE *et al.* (1993), em que uma solução de amônia (0,5% v v<sup>-1</sup>) foi utilizada no preparo de amostras de leite em pó e soro humano (300 mg) visando a determinação de I por ICP-MS. Como resultados, os autores mencionam que obtiveram concordâncias em torno de 100%, entre o valor encontrado e o valor certificado para I, quando avaliados três CRMs, e LD de 0,01 mg kg<sup>-1</sup> para I.

Dentro deste contexto, cabe comentar ainda como uma alternativa bastante promissora, a utilização de soluções alcalinas diluídas (na ordem de mmol l<sup>-1</sup>) em combinação com técnicas de combustão em sistema fechado para o preparo de amostras alimentícias visando a subsequente determinação de halogênios e S (MESKO *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014).

### **Técnicas de Combustão**

Como relação às técnicas de combustão, cabe mencionar que estas são classificadas em sistemas abertos: com decomposição em forno tipo mufla; sistema de combustão Wickbold; e decomposições em baixas temperaturas com plasma de

oxigênio, em sistema dinâmico: Trace-O-Mat<sup>®</sup>, e, ainda, em sistemas fechados: bomba de combustão; frasco de combustão de Schöniger e MIC.

Embora alguns sistemas abertos ainda sejam utilizados para decompor amostras visando a posterior determinação de halogênios e S, problemas relacionados a perda de elementos voláteis (halogênios), possibilidade de contaminação – principalmente para análise de elementos a nível traço, bem como tempo envolvido na decomposição (até 80 h) são, geralmente, descritos na literatura como as principais limitações desse tipo de sistema (KRUG, 2010; BARIN *et al.*, 2014).

Em contrapartida, o sistema dinâmico, conhecido como Trace-O-Mat<sup>®</sup>, é um sistema que oferece menores riscos de contaminação – visto que é feito de quartzo e, ainda, possibilita menores chances de perdas por volatilização dos elementos, quando comparado aos sistemas abertos (BARIN *et al.*, 2014). Na literatura é relatada a utilização deste sistema para decomposição de amostras alimentícias e biológicas (200 - 500 mg), inclusive de ovos, visando a posterior determinação de I. Neste trabalho, os autores utilizaram 2 ml de CFA-C (5% v v<sup>-1</sup>), como solução absorvedora para I, após decomposição do RM de ovo em pó (RM NIST 8415), por Trace-O-Mat<sup>®</sup>. Após análise das soluções preparadas com CFA-C (5% v v<sup>-1</sup>), por ICP-MS, os autores relatam concordâncias em torno de 93%, entre o valor encontrado e o valor de referência para I no RM, e um LD de 0,01 mg kg<sup>-1</sup> (GÉLINAS; IYENGAR; BARNES, 1998). No entanto, é importante ressaltar que, atualmente, esse sistema não está disponível comercialmente (BARIN *et al.*, 2014), devido, principalmente, a dificuldade de manuseio e baixa frequência analítica.

Sistemas fechados de combustão em são mais amplamente utilizados, do que em sistemas abertos, principalmente para amostras em que se visa a posterior determinação de não metais. Diante disso, maiores detalhes sobre os métodos de combustão em sistema fechado serão apresentados a seguir.

É importante ressaltar, ainda, que o sistema proposto em 2010, conhecido como combustão iniciada por micro-ondas focalizada (FMIC) não foi incluído na classificação apresentada acima, pois se trata de um sistema aberto e dinâmico (MESKO *et al.*, 2010a). Este sistema oferece diversas vantagens, como o uso de uma elevada massa de amostra; baixos riscos de contaminação; e frequência analítica – quando comparado a outros sistemas de combustão. Entretanto, por se tratar de um sistema aberto, o sistema FMIC não é considerado adequado para a

decomposição de amostras quando se visa a posterior determinação de halogênios, uma vez que há possibilidade de perdas por volatilização (BARIN *et al.*, 2014).

### **Bomba de Combustão**

No procedimento de decomposição envolvendo a bomba de combustão, a amostra, na forma de comprimido, é introduzida no interior de um sistema, geralmente, de aço inoxidável. Após o fechamento do sistema, o interior do frasco é preenchido com excesso de oxigênio (normalmente, a pressão de O<sub>2</sub> utilizada é na faixa de 20 a 30 atm). A ignição da amostra é feita através do contato elétrico dos eletrodos conectados a amostra. Os vapores gerados pela combustão da amostra são absorvidos em uma solução adequada (usualmente, 5 a 10 ml) (KRUG, 2010). O procedimento dura em média 30 min, além do tempo necessário para o arrefecimento do sistema e absorção dos analitos. Posteriormente ao 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), o sistema é aberto e a solução absorvedora é utilizada para a determinação dos analitos. Na Fig. 2 são apresentadas as principais partes que constituem o sistema de bomba de combustão.



**Figura 2** - Bomba de combustão de aço utilizada na decomposição de amostras.

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

A decomposição utilizando a bomba de combustão permite a obtenção de soluções com RCCs relativamente baixos, quando comparados com os digeridos após decomposição por via úmida, além disso permite o uso de massa de amostra relativamente elevada (geralmente, maior que 500 mg) o que permite a obtenção de baixos LDs. No entanto, esse método apresenta desvantagens que incluem baixa frequência analítica e a dificuldade de lavar as partes internas do recipiente, devido à impossibilidade de uma etapa de refluxo (FLORES *et al.*, 2007).

Na literatura foram encontrados trabalhos que relatam o uso da bomba de combustão para a decomposição de vários tipos de amostras visando à determinação de metais, bem como de não metais (FLORES *et al.*, 2007). Como

exemplo, pode-se citar o estudo de Arikawa e Sasaki (1987), que descrevem que utilizaram a bomba de combustão para a decomposição de amostras biológicas (< 1000 mg), para a posterior determinação de S por espectrometria de massa com diluição isotópica. Para tanto, foi utilizado 30 atm de O<sub>2</sub>, 1000 mg de amido como auxiliar de combustão e 1 ml de água como solução absorvedora. Como resultados, os autores comentam que foi verificado em torno de 4% e 3% de S nos cabelos e unhas, respectivamente analisados. Com relação a exatidão e ao LD, cabe ressaltar que os autores não apresentaram informações (ARIKAWA e SASAKI, 1987).

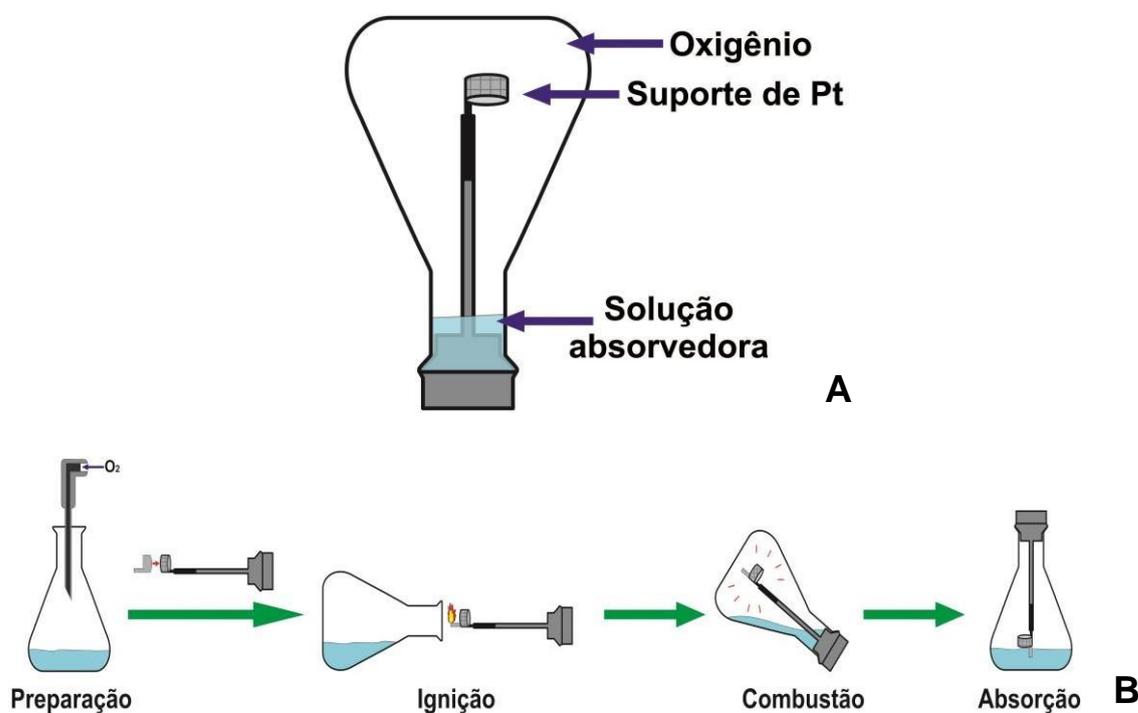
Um trabalho mais recente, descrito por Souza *et al.* (2002), utilizou esse sistema de combustão para a decomposição de CRMs (músculo e fígado bovino, farelo de milho, músculo de bacalhau e leite em pó) para a posterior determinação de I e S por ICP OES. Neste trabalho, os autores relataram a utilização de massas de amostra entre 250 e 500 mg, 25 atm de O<sub>2</sub>, 0,5 ml de etanol misturado com parafina (35 até 40 mg) como auxiliar de combustão, e 5 ml de HNO<sub>3</sub> 0,1% v v<sup>-1</sup> ou CFA-C 10% v v<sup>-1</sup> como solução absorvedora. Em relação aos resultados, foram obtidas recuperações entre 91 e 105% para I e S. Além disso, foram obtidas concordâncias em torno de 95%, entre os valores certificados e obtidos para S após avaliação de variados CRMs. Os LDs do método para I e S não foram apresentados pelos autores (SOUZA *et al.*, 2002).

Com relação às aplicações da bomba de combustão cabe destacar, ainda, que, apesar deste sistema ser utilizado na decomposição de amostras alimentícias e biológicas, este é mais amplamente utilizado na decomposição de carvão e outros combustíveis. Ainda, cabe ressaltar que soluções obtidas a partir da mistura dos sais bicarbonato de sódio e carbonato de sódio (em diferentes proporções), bem como a água são as principais soluções absorvedoras escolhidas para o preparo das amostras por este sistema, quando a intenção é absorver halogênios e S. Além disso, as técnicas por IC, ICP OES e a potenciometria estão entre as principais técnicas utilizadas para a determinação dos elementos anteriormente citados (FLORES *et al.*, 2007).

Por último, vale mencionar que não foram encontradas aplicações deste método para a decomposição de ovos e/ou suas frações.

### **Frasco de Combustão de Schöniger**

O procedimento de decomposição com o frasco de combustão de Schöniger (Fig. 3 A) consiste, basicamente, na combustão da amostra em um frasco fechado na presença de oxigênio à pressão atmosférica. Como pode ser observado na Fig. 3 (B), normalmente a amostra é envolvida por um papel com baixo teor de cinzas e posicionada em um suporte de platina que se encontra fixado na tampa do frasco. O recipiente utilizado nesse sistema é, geralmente, um erlenmeyer, no qual, primeiramente, é colocado um volume adequado de solução absorvedora. Assim, após ter sido adicionada a solução absorvedora e ter-se introduzido O<sub>2</sub> no frasco, a amostra é, então, inserida. A ignição pode ser realizada manualmente, eletricamente ou por meio da incidência de radiação na região do infravermelho. Após a ignição, o frasco é rapidamente invertido para que a própria solução absorvedora vede o sistema, o que minimiza a possibilidade de perda dos produtos resultantes da combustão. A combustão é, geralmente, rápida e se completa entre 5 e 15 s. Posteriormente à combustão, o frasco é agitado manualmente para realizar a limpeza das paredes do recipiente e garantir a recuperação quantitativa dos analitos (FLORES *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2010).



**Figura 3** - Frasco de combustão de Schöniger com seus principais componentes (A) e sequência básica do procedimento de decomposição utilizando o sistema (B) (adaptado de Flores *et al.*, 2007).

No frasco de Schöniger a massa de amostra que pode ser decomposta está diretamente relacionada com o volume do frasco de decomposição. Em geral, para a queima de apenas 50 mg de amostra é necessário um frasco de volume igual ou superior a 500 ml. Diante disso, a sua aplicação para a determinação de concentrações muito baixas é limitada. Além disso, a frequência de análise do frasco de combustão de Schöniger é baixa. Outras desvantagens desta técnica de combustão é a possibilidade de oxidação incompleta da amostra devido a falta suficiente de  $O_2$ , e de ocorrer evaporação de compostos voláteis antes da queima ser concluída (MAGALHÃES *et al.*, 2010). Entretanto, é importante enfatizar que esta técnica é considerada relativamente simples, visto que utiliza uma aparelhagem menos complexa do que o da bomba de combustão (BARIN; FLORES; KNAPP, 2006; FLORES *et al.*, 2007).

Diversos procedimentos envolvendo o frasco de combustão de Schöniger são descritos na literatura para a posterior determinação de halogênios e S, estes incluem, principalmente, amostras biológicas, plantas e compostos orgânicos, não

sendo encontrada aplicação para ovos e/ou suas frações (FLORES *et al.*, 2007; KRUG, 2010).

Em um trabalho envolvendo o preparo de amostras de cabelo (40 – 50 mg), por exemplo, este sistema foi utilizado, visando a posterior determinação de F, por eletrodo íon seletivo (ISE). Neste trabalho, os autores descrevem que utilizaram um frasco de combustão de Schöniger de 500 ml, um papel filtro aderido a um papel adesivo para a ignição e uma solução de ajuste de força iônica (TISAB) 15 ml, como solução absorvedora. Em relação aos resultados, os autores comentam que as concentrações de F variaram de 35 a 210 mg kg<sup>-1</sup>, após avaliação de 7 amostras de cabelo, de origem diferentes. Além disso, foram descritas recuperações de 98 a 104% para F, quando avaliada a exatidão do método proposto. Sobre o LD os autores não apresentaram nenhuma informação (WANG; ZHOU; YANG, 1995).

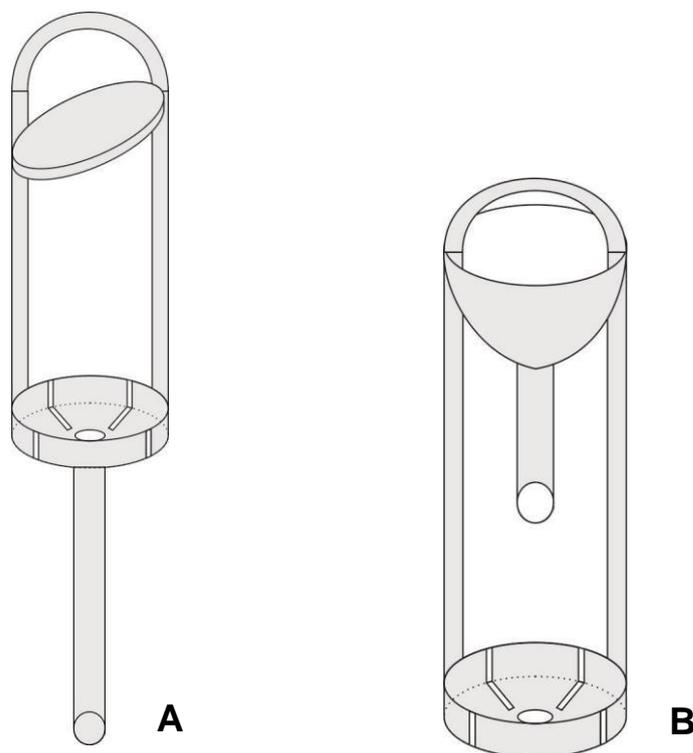
Dentre os principais aspectos relatados na literatura para o preparo de amostras através deste sistema, cabe mencionar que a solução absorvedora mais utilizada é a água. Além disso, a IC e a potenciometria estão entre as principais técnicas para a determinação de halogênios e S (FLORES *et al.*, 2007).

### **Combustão Iniciada por Micro-ondas**

A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi desenvolvida por Flores *et al.* (2004) e combina as principais características dos procedimentos clássicos de combustão, como o frasco de combustão de Schöniger e a bomba de combustão, com as decomposições por via úmida em sistema fechado aquecido por radiação micro-ondas.

De um modo geral, o processo de combustão ocorre em um frasco de quartzo fechado, pressurizado com oxigênio, o que reduz a ocorrência de perdas por volatilização e contaminações pelo ambiente. Neste método, a ignição é feita através da incidência de radiação micro-ondas e uma solução oxidante de nitrato de amônio depositada na superfície de um papel filtro que se encontra em contato com a amostra. Esta solução promove uma reação de oxidação extremamente exotérmica, responsável pela ignição do papel filtro e, posteriormente, da amostra. Após a combustão, os analitos são absorvidos em uma solução adequada. Na MIC, ainda há possibilidade de aplicação de uma etapa de refluxo que permite a obtenção de baixos desvios padrão relativos (RSDs) e recuperações quantitativas dos analitos

(FLORES *et al.*, 2004; BARIN *et al.* 2014). Para o procedimento de combustão, um dispositivo de quartzo (Fig. 4 A), é usado como suporte para a amostra, o qual é inserido no frasco de decomposição.



**Figura 4** - Dispositivos comercial (A) e não comercial (B) de quartzo utilizado na MIC como suporte para as amostras.

Outro dispositivo também utilizado na MIC é o ilustrado na Fig. 4 B, desenvolvido no Laboratório de Hialotecnica da Universidade Federal de Santa Maria. Este é perfeitamente adaptável ao frasco de quartzo disponível comercialmente pelo fabricante do forno micro-ondas e tem sido utilizado para decomposição de variados tipos de amostra (MESKO *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014). A parte superior do dispositivo tem um funil, que permite que a solução absorvedora promova uma lavagem efetiva da base do suporte onde ocorre a combustão da amostra, e que auxilie na proteção da tampa do frasco, impedindo o contato direto da chama originada na combustão com o material constituinte da tampa. Enquanto, a parte inferior do suporte apresenta quatro ranhuras que permitem que ocorra um maior contato entre o oxigênio e a amostra (MESKO, 2008).

Para que amostras sólidas sejam decompostas por MIC faz-se necessário prepará-las na forma de comprimidos. Todavia, no caso de amostras líquidas ou semisólidas, devido à impossibilidade de obtenção de comprimidos, estas são, geralmente, encapsuladas em policarbonato ou envolvidas em filmes de polietileno (PEREIRA, 2008; COSTA; 2013; BARIN *et al.* 2014).

No procedimento por MIC, a amostra é colocada sobre um disco de papel filtro, previamente posicionado sobre o suporte de quartzo, contendo 50  $\mu\text{l}$  de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$ . Em seguida, o suporte é inserido dentro do frasco de decomposição contendo 6 ml da solução absorvedora (volume mínimo recomendado pelo fabricante do equipamento) (Anton Paar GmbH, 2006). Após o fechamento dos frascos com a tampa de politetrafluoretileno (PTFE), estes 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. Posteriormente a ignição, temperaturas superiores a 1300 °C geralmente são atingidas, o que garante a conversão de praticamente toda a matéria orgânica em seus respectivos produtos de oxidação e, conseqüentemente, baixos RCCs são obtidos (normalmente inferiores a 1%) (FLORES *et al.*, 2004, 2007; BARIN *et al.* 2014).

A MIC apresenta como principais vantagens o mínimo consumo de reagentes; baixo tempo de decomposição, tendo em vista que é possível decompor até oito amostras simultaneamente; e permite a realização de uma etapa de refluxo. Além disso, os valores obtidos para os brancos são relativamente baixos e a etapa de descontaminação do sistema é simples e rápida (FLORES *et al.*, 2004, 2007; BARIN *et al.* 2014).

Um aspecto importante das técnicas de combustão está relacionado a solução absorvedora, responsável por reter quantitativamente os analitos antes da determinação. A seleção da solução absorvedora a ser utilizada depende principalmente do tipo de analito e da técnica de determinação utilizada. Dessa forma, a possibilidade de escolha da solução absorvedora mais adequada para reter os analitos é outra vantagem a ser considerada para este tipo de técnica (FLORES *et al.*, 2004, 2007; BARIN *et al.* 2014).

Como mencionado anteriormente, a MIC tem sido utilizada na decomposição de amostras alimentícias, em combinação ao uso de solução alcalinas diluídas (na ordem de  $\text{mmol l}^{-1}$ ), para subsequente determinação de halogênios e S. No trabalho desenvolvido por Hartwig *et al.* (2014), foram decompostos 500 mg de camarão

inteiro (resíduos + massa corpórea), bem como de suas partes (massa corpórea ou resíduos), por MIC, visando a posterior determinação de Br e I, por ICP-MS. A solução utilizada neste trabalho para absorver os analitos foi  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol l}^{-1}$ , e, de acordo com os autores, o método proposto apresentou exatidão satisfatória, tendo em vista que concordâncias em torno de 99% para ambos os analitos foram obtidas, quando avaliado o material de referência (RM) RM NIST 8414. Além disso, LDs de 0,120  $\text{mg kg}^{-1}$  para Br e de 0,0010  $\text{mg kg}^{-1}$  para I foram obtidos (HARTWIG *et al.*, 2014).

Em outro trabalho descrito recentemente na literatura (MESKO *et al.*, 2014), a MIC foi utilizada na decomposição de diferentes tipos de algas marinhas comestíveis, visando a posterior determinação de Br e I, por ICP-MS. Neste trabalho, os autores descrevem que 500 mg de amostra foram decompostas por MIC utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  150  $\text{mmol l}^{-1}$  como solução absorvedora. Ainda, é relatado que o método desenvolvido apresentou concordâncias entre 103% e 108% para ambos os analitos, quando avaliados o CRM BCR 150 (leite em pó) e o RM NIST 8414 (músculo bovino). Os LDs obtidos para Br e I foram 0,011 e 0,010  $\text{mg kg}^{-1}$ , respectivamente (MESKO *et al.*, 2014).

Outras aplicações da MIC para a subsequente determinação de Br, Cl F e/ou I, incluem carvão (FLORES *et al.*, 2008), derivados de petróleo (PEREIRA *et al.*, 2008), alimentos (MESKO *et al.*, 2010b; BARBOSA *et al.*, 2013), nanotubos de carbono (PEREIRA *et al.*, 2010), solo (ALBERS *et al.*, 2011), tabaco (MÜLLER *et al.*, 2012a), substâncias farmacêuticas (MÜLLER *et al.*, 2012b) e plantas (SUCMAN e BEDNAR, 2012). Para a determinação destes elementos é comumente utilizada as técnicas de determinação por IC e por ICP-MS. Em relação a solução absorvedora, é, geralmente, escolhido o uso de meios alcalinos diluídos (na ordem de  $\text{mmol l}^{-1}$ ), sendo que as soluções de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  e de  $\text{NH}_4\text{OH}$  representam em torno de 80% das aplicações (COSTA, 2013; BARIN *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014; MESKO *et al.*, 2014).

Por sua vez, foram encontrados poucos trabalhos que descrevem o uso da MIC, visando a posterior determinação de S (MELLO *et al.*, 2008; MELLO *et al.*, 2009; PEREREIRA *et al.*, 2009; MÜLLER *et al.*, 2012c). No trabalho de Mello *et al.* (2008), os autores descrevem que utilizaram a MIC para a decomposição de coque de petróleo, visando a determinação de S por IC e por ICP OES. Neste estudo, foi descrito concordâncias acima de 98% para S, quando avaliado quatro CRMs de

carvão (SRM NIST 1632b, SRM NIST 1632c, CRM SARM 18 e CRM SARM 19), por ICP OES. Com relação ao LD do método, os autores não descrevem detalhes (MELLO *et al.*, 2008).

Neste sentido, cabe salientar ainda que, apesar de a MIC ser utilizada para o preparo de variadas amostras visando a posterior determinação de halogênios e S, sua utilização para o preparo de amostras alimentícias é mais comumente utilizada para a posterior determinação de Br e I. Além disso, não foi verificada o uso desse sistema para a decomposição de ovos e/ou suas frações.

### **Técnicas para a Determinação de Halogênios e de Enxofre**

Para a determinação de halogênios e S, podem ser utilizadas várias técnicas analíticas e, a seleção da técnica a ser utilizada, geralmente, depende do tipo de amostra, da concentração e do analito a ser determinado, bem como da disponibilidade de instrumentos (KNAPP *et al.*, 1998; VARGA, 2007). Dentre as técnicas utilizadas para determinação de halogênios e de S, pode-se 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 e os métodos titrimétricos e gravimétricos (MELLO *et al.*, 2008, 2013; SKOOG *et al.*, 2014).

Quando comparada com as técnicas espectrométricas, a técnica de IC proporciona um custo relativamente menor, tanto no que tange à aquisição e manutenção do instrumento, quanto no que se refere à realização das análises, visto que não se faz necessário o uso de gases (MELLO *et al.*, 2013). Ainda, cabe mencionar que esta técnica também permite a determinação de F de modo sequencial aos demais elementos, o que até o momento não foi possível por ICP OES, e por ICP-MS é raro (BU *et al.* 2003) dado o seu elevado potencial de ionização (P.I).

Na técnica de IC a separação dos íons presentes na amostra é resultante das interações específicas entre as espécies iônicas e a fase estacionária. O mecanismo de interação dos íons com a fase estacionária é conhecido como troca iônica. Nesta técnica as colunas utilizadas são constituídas por uma matriz polimérica, que possui em sua superfície um grupo funcional ligado a um polímero. A fase móvel também contém espécies iônicas, dessa maneira, ocorre uma competição das espécies

presentes na amostra entre as espécies presentes na fase móvel e na fase estacionária. Para cada íon, o processo de troca é caracterizado pelo equilíbrio de distribuição entre a fase móvel e a fase estacionária (EITH *et al.*, 2007).

A detecção dos íons, geralmente, é feita por condutividade. Contudo, em virtude desta ser uma propriedade comum a todas as espécies iônicas em solução, podem ocorrer interferências causadas pela alta condutividade de alguns íons presentes na fase móvel, principalmente devido à presença do íon sódio, impossibilitando a quantificação de outros íons. Este problema pode ser contornado com o uso de um supressor, que permite a troca de íons presentes no eluente por espécies que contribuam para uma condutância relativamente baixa ou nula (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; EITH *et al.*, 2007).

Apesar da técnica de IC ser utilizada para quantificação de halogênios e S (COETZEE; TALJAARD, 1990; MELLO *et al.*, 2008, 2013), a determinação destes elementos a nível traço é considerada ainda um desafio. Dessa maneira, técnicas espectrométricas, como a ICP-MS e a ICP OES podem ser uma alternativa (MELLO *et al.*, 2008, 2013). Para alimentos, por exemplo, a determinação de Br e I, a nível traço, por ICP-MS, vem sendo bastante utilizada, visto que se trata de uma técnica muito sensível. Cabe destacar que LDs para Br entre 0,01 e 0,12 mg kg<sup>-1</sup> e para I entre 0,0003 e 0,05 mg kg<sup>-1</sup> são relatados na literatura, quando estes foram determinados por ICP-MS em amostras alimentícias (MELLO *et al.*, 2013; MESKO *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014).

A técnica de ICP-MS permite a análise elementar e isotópica, baseada na geração de íons positivamente carregados (M<sup>+</sup>) em um plasma de Ar, onde temperaturas elevadas são alcançadas. Geralmente, as amostras são introduzidas através de um nebulizador, na forma líquida, passando para uma câmara de nebulização. Nessa câmara é formado um aerossol, onde gotículas maiores e menores são separadas, a fim de facilitar o processo de atomização e ionização, quando em contato com o plasma. Os íons M<sup>+</sup> gerados no plasma são amostrados pela interface (cone de amostragem e *skimmer*) por diferença de pressão. A partir deste ponto, os íons, através da lente iônica, são conduzidos até o separador de massas, pela aplicação de potenciais cada vez mais negativos. É importante destacar que a lente iônica também tem como função equalizar a energia cinética dos íons, isto é, fazer com que a energia cinética de cada íon, de mesma razão massa/carga (m/z), seja a mais idêntica possível. No separador de massas, os íons

são separados de acordo com sua  $m/z$  e finalmente conduzidos até o detector, onde a corrente elétrica medida é convertida em contagem por segundo (cps) (THOMAS, 2001a; THOMAS, 2001b; THOMAS, 2001c; BEAUCHEMIN, 2010)

Uma das limitações desta técnica é a possibilidade de alguns elementos sofrerem interferências poliatômicas no plasma, o que, conseqüentemente, interfere na obtenção de baixos LDs. Diante disso, especial atenção deve ser dada a determinação de não-metais. Dentre os halogênios, o  $^{35}\text{Cl}$ , isótopo mais abundante (76%), sofre interferências de  $^{17}\text{O}^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}^{18}\text{OH}^+$  e  $^{34}\text{SH}^+$ , enquanto que o  $^{37}\text{Cl}$  pode sofrer interferências de  $^{36}\text{Ar}^{1}\text{H}$ ,  $^{19}\text{F}^{18}\text{O}$ ,  $^{36}\text{SH}^+$ . Assim como para os isótopos de Cl, o  $^{32}\text{S}$ , que representa 95% de abundância, sofre interferências poliatômicas de  $^{15}\text{N}^{17}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^{1}\text{H}$  e  $^{16}\text{O}_2$  (JARVIS; GRAY; HOUSE, 1992).

Além dos problemas relacionados a interferências espectrais, o efeito de memória é outro agravante na determinação de alguns elementos por ICP-MS. Este efeito é proveniente da formação de espécies voláteis de halogênios. Para tanto, é necessário ter cuidado com a escolha do solvente utilizado para absorver estes elementos, visto que estes, em meio ácido, volatilizam podendo permanecer na câmara de nebulização e no nebulizador (AL-ALMAR; REITZNEROVÁ; BARNES, 2001). Alguns autores avaliaram o efeito de memória na determinação de halogênios em ICP-MS utilizando soluções de  $\text{HNO}_3$  5 e 20%, água deionizada e solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  5%, onde foi observado que o efeito de memória é praticamente nulo com a utilização de solução alcalina (BU *et al.*, 2003).

Embora na literatura não tenham sido encontrados trabalhos que citam a utilização da técnica de IC para a determinação de Br, Cl, F, I e S em amostras de ovo, existem alguns trabalhos que descrevem a determinação destes analitos por outras técnicas analíticas. Desta forma, na Tab. 1 estão listados e detalhados os trabalhos publicados que envolvem diferentes técnicas analíticas para a determinação de halogênios e enxofre em ovos e suas frações.

**Tabela 1** - Trabalhos publicados que envolvem a determinação de halogênios e enxofre em ovos por diferentes técnicas analíticas.

Amostra	Preparo de amostra (massa de amostra; quantidade e concentração de reagentes; forma de aquecimento e tempo de preparo)	Analito(s)	Técnica de determinação	Referência
Membrana interna e externa da casca de ovo e cutícula de ovo	NH <sub>4</sub> OH 6% v v <sup>-1</sup> ou H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 6% v v <sup>-1</sup> ; Frasco de combustão de Schöniger	S foi determinado na forma de BaSO <sub>4</sub>	AAS	Wedral, Vadehra e Backer (1974)
RM NIST 8415	200 - 500 mg; 1 ml HTMA (25% m v <sup>-1</sup> ); Estufa a 90 °C, 3 h	I	ICP-MS	Fecher, Goldman, Nagengast (1998)
RM NIST 8415	200 - 500 mg; 1 ml HTMA (25% m v <sup>-1</sup> ); Estufa a 90 °C, 3 h	I	ICP-MS	Knapp <i>et al.</i> (1998)
RM NIST 8415	i) 200 - 500 mg; 2 ml CFA-C (5% v v <sup>-1</sup> ); Sistema Trace-O-Mat <sup>®</sup> , 35 min  ii) 100 - 250 mg; 40 ml CFA-C; Banho ultrassônico, 30 min	I	ICP-MS	Gélinas, Iyengar e Barnes (1998)

**Tabela 1 - Continuação.**

Amostra	Preparo de amostra (massa de amostra; quantidade e concentração de reagentes; forma de aquecimento e tempo de preparo)	Analito(s)	Técnica de determinação	Referência
Pó de casca de ovo	Não informa	F	GC	Schaafsma <i>et al.</i> (2000)
Ovos	0,5 g de amostra seca ou 3 ml de amostra líquida; 1 ml HTMA (25% m v <sup>-1</sup> ); Estufa a 75 - 80 °C, por 4 h	Br e I	ICP-MS	Rose <i>et al.</i> (2001)
Ovos cozidos	Não há preparo	Br, Cl, I e S	INAA	Zikovsky e Soliman (2002)
Ovos	Não informa	I	ICP-MS	Dahl <i>et al.</i> (2003)

Tabela 1 - Continuação.

Amostra	Preparo de amostra (massa de amostra; quantidade e concentração de reagentes; forma de aquecimento e tempo de preparo)	Analito(s)	Técnica de determinação	Referência
Ovos, clara e gema de ovos desidratados	HNO <sub>3</sub> ; Autoclave a 130 atm a 230 °C	I	ICP-MS	Haldimann <i>et al.</i> (2005)
Clara e gema de ovos <i>in natura</i>	Não informa	I foi determinado de forma indireta através do efeito catalítico na redução de Ce <sup>4+</sup> a Ce <sup>3+</sup> , na presença de As <sup>3+</sup>	AAS	Travnicek <i>et al.</i> (2006)
Gemas de ovo <i>in natura</i>	Não informa	I foi determinado de forma indireta através do efeito catalítico na redução de Ce <sup>4+</sup> a Ce <sup>3+</sup> , na presença de As <sup>3+</sup>	AAS	Dusová <i>et al.</i> (2012)

*Neste capítulo serão descritos os equipamentos, os reagentes e as amostras selecionadas para o desenvolvimento deste trabalho, bem como os procedimentos utilizados para o preparo e análise das amostras.*

*Os métodos de preparo de amostra avaliados para a subsequente determinação de halogênios e S por IC, ICP OES e ICP-MS foram a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) e a extração alcalina assistida por radiação micro-ondas.*

*No procedimento de decomposição por MIC, foi estudada a massa máxima de amostra que poderia ser utilizada sem o risco de um aumento excessivo de pressão durante a etapa de combustão, bem como o tempo total de combustão das amostras. Adicionalmente, foram avaliadas soluções absorvedoras variadas, com o intuito de selecionar a solução mais adequada para absorver os analitos.*

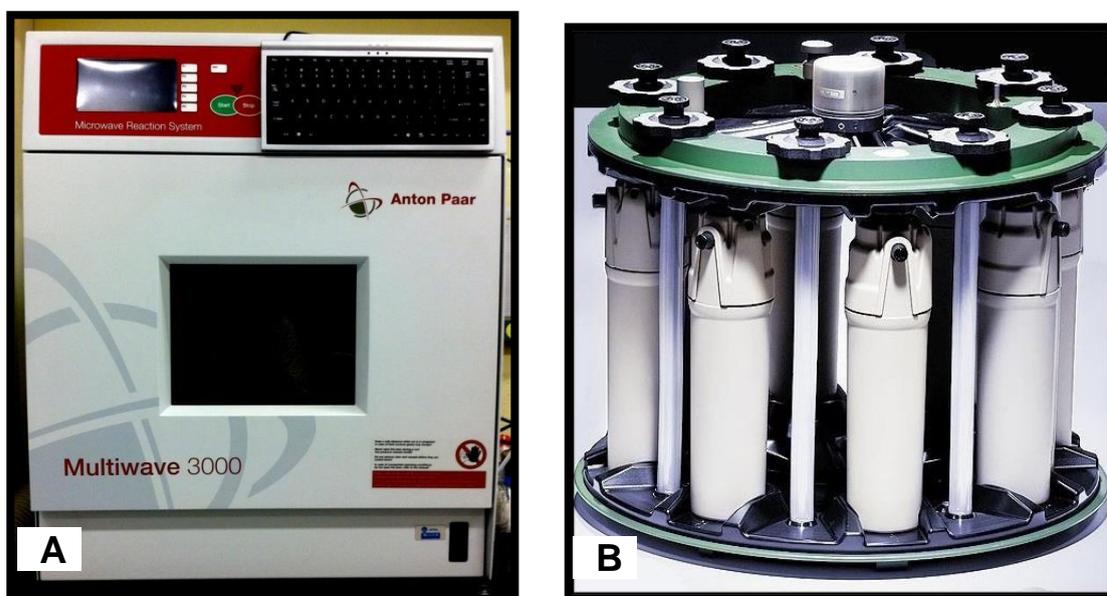
*Para o procedimento de preparo de amostras envolvendo a extração alcalina foram utilizadas uma solução como HTMA e NH<sub>4</sub>OH. Além disso, foi avaliado o método oficial para a determinação de Cl em ovos e suas frações, descrito pela AOAC, visando comparar com os demais procedimentos estudados.*

*A caracterização físico-química do ovo integral desidratado e suas frações também foi realizada para obter informações a respeito da matriz das amostras.*

*Cabe ressaltar que as determinações de Cl, S por ICP OES, bem como 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, visto que esses equipamentos não estão disponíveis na UFPel.*

## Instrumentação

Para o preparo das amostras através da extração alcalina assistida por radiação micro-ondas e da MIC foi utilizado um sistema pressurizado com aquecimento por radiação micro-ondas *Multiwave 3000*<sup>®</sup> (*Microwave sample preparation system*, Anton Paar, Áustria). Para o procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas o sistema foi equipado com 8 frascos de PTFE, com um volume interno de 100 ml, que opera sob condições máximas de 1400 W de potência, 260 °C de temperatura e 60 bar de pressão. Enquanto, para a MIC, foi usado o mesmo sistema, porém equipado com 8 frascos de quartzo, com um volume interno de 80 ml, sob condições máximas de 1400 W, 280 °C e 80 bar (Fig. 5 B). O forno é equipado com sensores de temperatura e de pressão, que permitem o acompanhamento destes parâmetros em tempo real e, ainda, permite que a potência irradiada seja monitorada durante todo o programa de aquecimento.



**Figura 5** - Forno de micro-ondas comercial *Multiwave 3000*<sup>®</sup> (A) e rotor equipado com 8 frascos (B).

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

A água purificada (resistividade até 18,3 MΩ cm), utilizada em todos os procedimentos, foi obtida a partir de um purificador de água modelo MegaUP (MegaPurity, Coreia do Sul).

Um multiprocessador modelo All In One 2 (Philco, Brasil) foi utilizado para misturar as amostras.

Um torno morsa de bancada modelo FORJASUL-33890406 (Tramontina, Brasil) foi utilizado para prensar as amostras na forma de comprimido.

Um banho de ultrassom modelo Ultrasonic Cleaner 1440D Série Evolution (Odontobrás, Brasil), com frequência de 40 kHz, foi utilizado na descontaminação de papéis filtro e dos invólucros utilizados nas decomposições das amostras por MIC. Este mesmo equipamento foi utilizado no processo de eliminação do CO<sub>2</sub> dissolvido na fase móvel do equipamento de IC.

Uma capela de fluxo laminar classe 100 modelo CSLH-12 (Veco, Brasil) foi utilizada para a secagem dos papéis filtro e dos invólucros utilizados nas decomposições das amostras por MIC.

Para a determinação de Cl, F e S foi utilizado um cromatógrafo de íons modelo IC 861 (Metrohm, Suíça) com detector por condutividade modelo 861 advanced compact IC (Metrohm, Suíça) e com um sistema de supressão modelo 853 (Metrohm, Suíça). Para tanto, também foi utilizada uma coluna de troca aniônica com grupos de amônio quartenário suportados em poli(álcool vinílico) modelo Metrosep A Supp 5 (250 x 4 mm d.i., 5 mm de diâmetro de partícula, Metrohm, Suíça) e uma coluna-guarda modelo Metrosep A Supp 4/5 Guard (5 x 4 mm d.i., 5 mm de diâmetro de partícula, Metrohm, Suíça), com o mesmo material de preenchimento da coluna de troca iônica.

Adicionalmente, para a determinação do potencial hidrogeniônico (pH) foi utilizado um potenciômetro digital modelo HI 3221 pH/ORP/ISE Meter (Hanna, EUA), equipado com eletrodo íon seletivo para hidrogênio (modelo HI 1131).

Bromo e I também foram determinados em um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado modelo Elan DRC II (PerkinElmer SCIEX, EUA). O espectrômetro foi equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália) e uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc., Austrália), com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.).

Cloro, S e o RCC foram determinados em um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado modelo Cirrus CDD (Spectro Analytical Instruments, Alemanha) nas soluções obtidas após a decomposição das amostras por MIC. O espectrômetro foi equipado com câmara de nebulização duplo passo (tipo *Scott*), nebulizador de fluxo cruzado (*cross flow*) e uma tocha com tubo injetor de quartzo de 2,5 mm d.i (Spectro EOP Quartz Torch, Glass Expansion, Austrália).

As condições operacionais utilizadas para as técnicas de IC, ICP-MS e ICP OES para a determinação dos analitos, bem como para a determinação do RCC estão descritas na Tab. 4 do item 3.8.

A secagem das amostras e a determinação do teor de umidade foram realizadas em uma estufa modelo 400/2ND (Nova Ética, Brasil). Para a determinação de cinzas, foi utilizado um forno mufla modelo 1C.318.24 (Quimis, Brasil), enquanto para a determinação do teor de proteína bruta foi usado um bloco digestor modelo KB 40S (C Gerhardt, Brasil) e um destilador de nitrogênio modelo MA 036 PLUS (Marconi, Brasil). Ainda, um banho de aquecimento modelo 18 BU B. Braun Biotech International, (Thermomix<sup>®</sup>, Alemanha) e uma centrífuga modelo 2-3, (Sigma, Alemanha) foram utilizados na determinação do teor de gordura.

### **Reagentes e soluções**

Carbonato de sódio p.a (Vetec) e bicarbonato de sódio p.a (Isofar) foram utilizados para obtenção da fase móvel utilizada durante a determinação dos analitos por IC. Para tanto, estes foram dissolvidos em água nas concentrações de 3,2 mmol l<sup>-1</sup> (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) e 1 mmol l<sup>-1</sup> (NaHCO<sub>3</sub>).

Hidróxido de amônio p.a (Synth), diluído em água, na concentração de 500 mmol l<sup>-1</sup> foi utilizado para preparar NH<sub>4</sub>OH nas concentrações de 10, 25, 50 ou 75 mmol l<sup>-1</sup> como solução absorvedora no preparo das amostras por MIC.

Ácido sulfúrico p.a (Synth) foi utilizado na digestão das amostras para a determinação do teor de proteína bruta por método de Kjeldahl. A partir da diluição desse ácido também foi preparada uma solução na concentração de 200 mmol l<sup>-1</sup>, utilizada como solução regeneradora da coluna supressora do cromatógrafo de íons.

Éter de petróleo (Proquimios), éter etílico (Synth), bem como ácido clorídrico p.a (Synth), diluído em água (1:11), foram utilizados para a determinação do teor de gordura por Mojonnier.

Com relação ao teor de proteína bruta, cabe comentar ainda que ácido bórico p.a (Vetec), dissolvido em água (4% m v<sup>-1</sup>), bem como vermelho de metila p.a (Synth) e verde de bromocresol p.a (Synth), dissolvidos em álcool etílico p.a (Vetec), nas concentrações de 0,066% m v<sup>-1</sup> e de 0,033% m v<sup>-1</sup>, respectivamente, foram utilizados como solução indicadora. Além dessa solução, hidróxido de sódio p.a (Isofar) e HCl p.a, diluído em água, na concentração de 12,5 mol l<sup>-1</sup> e 0,01 mol l<sup>-1</sup>, respectivamente, foram também utilizados durante essa determinação.

Hidróxido de tetrametilamônio p.a (diluída em metanol, 25% m m<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich) e NH<sub>4</sub>OH p.a foram diluídos em água nas concentrações de 0,11 mol l<sup>-1</sup> e 50 mmol l<sup>-1</sup>, respectivamente, a fim de serem utilizados no procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas.

Para ignição da combustão na MIC, foi necessário o uso de uma solução de nitrato de amônio (Merck) 6 mol l<sup>-1</sup>, obtida através da dissolução deste sal em água.

Para a pressurização dos frascos de decomposição por MIC, foi utilizado oxigênio comercial (Oxigeo, Brasil). Além disso, argônio de elevada pureza (99,998%, White Martins, Brasil) foi utilizado para a geração do plasma nas determinações por ICP-MS e por ICP OES.

Para as determinações de Cl, F e S por IC, Br e I por ICP-MS e Cl e S por ICP OES, foi necessária a utilização de soluções de calibração preparadas a partir da dissolução de brometo de potássio p.a (Synth), cloreto de potássio p.a (Synth), fluoreto de sódio p.a (Synth), iodeto de potássio p.a (Synth) e sulfato de sódio anidro p.a (Vetec), em água, ou solução compatível com aquela utilizada na absorção dos analitos. Ainda, esses sais foram previamente secos em estufa (85 °C/4 h) para preparar as soluções de calibração, bem como as soluções utilizadas para avaliar a exatidão dos métodos estudados neste trabalho.

Ácido nítrico p.a (Synth) foi utilizado para o preparo das soluções usadas na descontaminação dos materiais que foram utilizados neste trabalho. Além disso, uma solução de álcool etílico 20% (v v<sup>-1</sup>) foi preparada, por meio da diluição de álcool etílico em água, para descontaminação dos papéis filtro utilizados no procedimento de combustão.

Nitrato de prata (Vetec) 0,08 mol l<sup>-1</sup> e HNO<sub>3</sub> (1 + 49), ambos dissolvidos em água purificada, foram preparados para a determinação de Cl pelo método descrito pela AOAC.

Ácido cítrico p.a. (Vetec) foi diluído em água purificada e a solução obtida, contendo  $1000 \text{ mg l}^{-1}$  de carbono, foi utilizada para o preparo das soluções de calibração ( $5$  a  $500 \text{ mg l}^{-1}$ ) utilizadas para a determinação do teor de carbono residual nas soluções obtidas 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  $\text{HNO}_3$   $0,28 \text{ mol l}^{-1}$ , EUA) como padrão interno.

### **Descontaminação dos Materiais Diversos**

As vidrarias, os filmes de polietileno, bem como outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados por imersão em  $\text{HNO}_3$  10% ( $\text{v v}^{-1}$ ) por, pelo menos, 24 h e, posteriormente, foram lavados com água e secos em capela de fluxo laminar.

Os papéis filtro utilizados na MIC, foram descontaminados através de imersão em álcool etílico 20% ( $\text{v v}^{-1}$ ) por 20 min em banho de ultrassom. Posteriormente, os mesmos foram lavados com água e secos em capela de fluxo laminar.

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  $\text{HNO}_3$  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). Além disso, posteriormente a descontaminação com  $\text{HNO}_3$  concentrado, um procedimento de descontaminação com água foi realizado. Para isso, o seguinte programa de aquecimento foi utilizado: *i*) 800 W por 10 min e *ii*) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento).

### **Amostras**

As amostras de ovo integral, clara e gema de ovos desidratadas utilizadas neste trabalho foram adquiridas no comércio local de Pelotas/RS, bem como por doação de empresas de São Paulo/SP, que preferiram não ser identificadas. Dentre as aquisições feitas, uma amostra de ovo integral desidratado foi selecionada aleatoriamente para a otimização do método e as demais foram utilizadas para aplicação do método proposto.

Após a aquisição das amostras, estas foram secas (85 °C, 8 h), misturadas em um multiprocessador e, posteriormente, foram armazenadas em frascos de polietileno de alta densidade (PEAD).

O RM NIST 8435 (*Whole Milk Powder*) foi seco em estufa (85 °C, 4 h) e utilizado para a avaliação da exatidão do procedimento proposto por MIC.

### **Caracterização Físico-química das Amostras**

Com o intuito de obter mais informações a respeito da matriz do ovo integral desidratado, da clara de ovo e da gema de ovo (desidratados) foi realizado um estudo de caracterização físico-química, onde foi avaliado o teor de umidade, o teor de cinzas, o teor de proteína bruta, bem como o teor de lipídios das amostras estudadas. O teor de umidade foi obtido por meio da secagem da amostra a 105 °C até peso constante e o teor de cinzas, por calcinação em forno tipo mufla a 525 °C por 3 h (HORWITZ e LATIMER, 2011). Enquanto, o teor de proteína bruta foi determinado pelo método de Kjeldahl (ZAMBIAZI, 2010) e o teor de gordura foi avaliado pelo método de Mojonnier. Cabe destacar que por não ter disponível uma centrífuga para tubos Mojonnier no laboratório (adaptado de HORWITZ e LATIMER, 2011) foram utilizados tubos de centrífuga no formato cilíndrico e uma centrífuga, conforme mostrado na Fig. 6.



**Figura 6** - Tubo no formato cilíndrico (100 ml) utilizado na centrifugação das amostras.

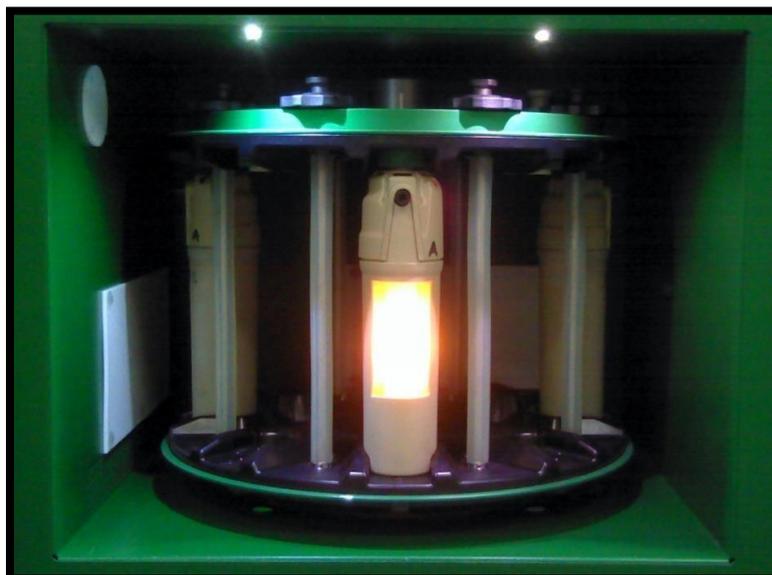
## **Avaliação de Parâmetros Relacionados ao Procedimento de Decomposição por MIC**

### **Determinação da Massa Máxima de Amostra**

Inicialmente, visando determinar a quantidade máxima de amostra a ser decomposta, foi estabelecida uma correlação entre a massa de amostra submetida à decomposição e a pressão máxima indicada no momento da combustão. A partir disso, foi possível estabelecer a capacidade máxima de amostra (entre 100 e 400 mg) que pode ser decomposta, levando em consideração o aspecto da amostra decomposta. O programa de irradiação utilizado nessa etapa foi de 1400 W por 50 s, com posterior resfriamento a 0 W por 10 min.

### **Determinação do Intervalo de Tempo da Combustão**

Para monitorar o tempo de duração do processo de combustão das amostras, foi necessária ser realizada uma modificação na capa protetora de um dos frascos de quartzo, a partir da abertura de uma janela para a visualização do processo. Além disso, foi feita uma alteração no *software* para permitir que o rotor não girasse, bem como não fosse necessária ser colocada a capa protetora do rotor, no momento do teste. Cabe enfatizar que este procedimento não é recomendado pelo fabricante do equipamento e medidas de segurança foram tomadas para evitar acidentes. Com isso, o rotor foi colocado na cavidade do forno, onde permaneceu parado, possibilitando que o frasco contendo a amostra e a capa de proteção com a janela de visualização, ficasse posicionado em frente à porta do equipamento (Fig. 7). Ainda, cabe ressaltar que este modo de visualização foi utilizado somente neste estudo. A potência irradiada nesse procedimento foi de 1000 W, sendo esta irradiação imediatamente interrompida no momento da ignição, permitindo, assim, a observação do início da combustão, seu desenvolvimento e término.



**Figura 7** - Adaptação do sistema para a visualização do processo de combustão (cortesia de PIRES, 2014).

### **Procedimento para Decomposição por MIC e Avaliação da Solução Absorvedora**

Para a decomposição das amostras por MIC, foi avaliado o uso de comprimidos ou 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. No caso do invólucro, adicionou-se  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $6 \text{ mol l}^{-1}$ ) sob a massa de amostra otimizada, sendo o mesmo fechado com o auxílio de uma pinça, selado por aquecimento e o excesso de polietileno removido (massa final de filme de polietileno 10 mg). Por sua vez, os comprimidos foram preparados por prensagem das amostras através do uso de um torno morsa de bancada, sendo também adicionado  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $6 \text{ mol l}^{-1}$ ) sob a massa de amostra otimizada. Contudo, é importante enfatizar que sempre tomou-se o cuidado de manter a mesma força aplicada na preparação dos comprimidos.

A massa otimizada foi obtida a partir de estudos prévios que verificaram a massa máxima de amostra que poderia ser completamente decomposta sem o risco de um aumento excessivo de pressão durante a etapa de combustão, garantindo, assim, a segurança do operador durante o preparo das amostras (descrito no item 4.6.1).

Desta forma, o invólucro contendo a amostra 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ). A seguir, foram adicionados 6 ml da solução absorvedora no interior do frasco de quartzo e o suporte com o invólucro foi colocado, então, no interior do mesmo com o auxílio de uma haste. Por fim, os frascos foram fechados, fixados no rotor, pressurizados com 20 bar de  $\text{O}_2$  por 1 min e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas apresentado na Tab. 2.

**Tabela 2** - Programa de irradiação utilizado para a decomposição das amostras por combustão iniciada por micro-ondas.

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo de permanência	Exaustão
1	1400	-	50 s	Fan 1
2	0	-	1 min	Fan 1
3	1400	-	5 min	Fan 1
4	0	-	20 min	Fan 3*

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

Após o término do programa, as soluções obtidas foram avolumadas a 25 ml e as determinações de Br, Cl, F, I e S foram feitas pelas técnicas de determinação descritas no item 4.8. Outro parâmetro avaliado na MIC foi a solução absorvedora, para tanto foram estudadas, por meio de ensaios de recuperação, soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10, 25, 50 ou 75 mmol  $\text{l}^{-1}$ ) ou água. Os ensaios de recuperação foram realizados por meio da adição de 50 µl de soluções padrão de Br (28 mg  $\text{l}^{-1}$ ), Cl (22400 mg  $\text{l}^{-1}$ ), F (10 mg  $\text{l}^{-1}$ ), I (4,2 mg  $\text{l}^{-1}$ ) e S (23800 mg  $\text{l}^{-1}$ ), na massa otimizada de amostra.

A exatidão também avaliada por meio da decomposição de 200 mg do RM NIST 8435 por MIC, e pela presença deste RM (50 mg) juntamente a matriz da amostra (300 mg de ovo integral desidratado + 100 µl de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 6 mol  $\text{l}^{-1}$ ). Para isso, foi utilizado, assim como para as amostras, o filme de polietileno, como invólucro e a solução absorvedora otimizada a partir dos estudos anteriormente citados. Após, a melhor condição para a decomposição das amostras visando a determinação de Br, Cl, F, I e S foi aplicada para a decomposição de outros ovos

integrals desidratados, bem como para suas frações (gema ou clara, desidratadas). No que diz respeito ao procedimento utilizado para a execução da MIC, ainda cabe destacar que a massa de papel filtro, a concentração e o volume de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , assim como o tempo e a pressão de  $\text{O}_2$  utilizadas foram baseados em trabalhos prévios (FLORES *et al.*, 2004; BARIN *et al.*, 2014).

### Extração Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado

Primeiramente, para o procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, foram transferidos 350 mg de amostra para frascos de PTFE, onde, em seguida, foram adicionados 6 ml de solução HTMA ( $0,11 \text{ mol l}^{-1}$ ) ou  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $50 \text{ mmol l}^{-1}$ ). A seguir, os frascos foram fechados e submetidos ao programa de irradiação com micro-ondas apresentado na Tab. 3.

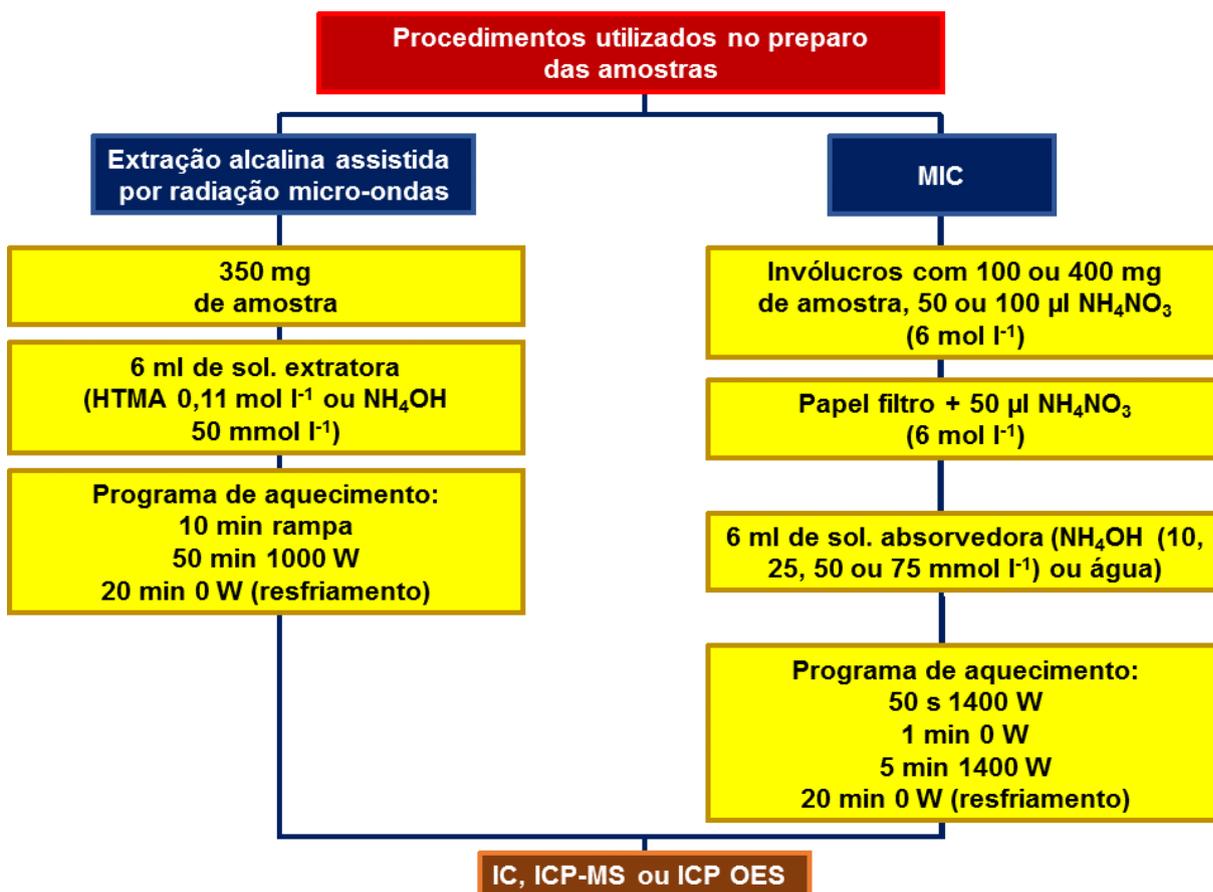
**Tabela 3** - Programa de irradiação utilizado na extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado.

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

É importante mencionar que a temperatura de  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , limitada para ambos os procedimentos de extração assistida por micro-ondas, foi escolhida com o intuito de evitar riscos de degradação do reagente HTMA (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 e as determinações dos analitos foram feitas por ICP-MS.

Na Fig. 8 é apresentado um fluxograma com os procedimentos utilizados neste trabalho para o preparo de amostras de ovo e suas frações, para subsequente determinação dos analitos.



**Figura 8** - Representação esquemática dos procedimentos avaliados para o preparo de amostras de ovo integral e suas frações desidratadas para subseqüente determinação de halogênios e S por IC, ICP-MS ou ICP OES.

#### Determinações por IC, ICP-MS ou ICP OES

As soluções obtidas após as amostras terem sido submetidas aos diferentes procedimentos de preparo de amostra foram analisadas por IC para a determinação de Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, por ICP-MS para a determinação de Br e I e por ICP OES para a determinação de C, Cl e S. Os parâmetros operacionais do IC, do ICP-MS e do ICP OES no momento das análises são apresentados na Tab. 4.

**Tabela 4** - Parâmetros operacionais para a determinação de Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> por IC, Br e I por ICP-MS e C, Cl e S por ICP OES.

Parâmetros	Condições operacionais
<b>IC</b>	
Fase estacionária	Amônio quartenário em poli(álcool vinílico)
Fase móvel (mmol l <sup>-1</sup> )	3,2 Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> / 1,0 NaHCO <sub>3</sub>
Vazão da fase móvel (ml min <sup>-1</sup> )	0,7
Alça de amostragem (µl)	20
Escala de condutividade do detector (µS cm <sup>-1</sup> )	68
<b>ICP-MS</b>	
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1300
Vazão de argônio no tubo externo (l min <sup>-1</sup> )	15,0
Vazão auxiliar de argônio (l min <sup>-1</sup> )	1,20
Vazão de argônio do nebulizador (l min <sup>-1</sup> )	1,15
Câmara de nebulização	Ciclônica
Nebulizador	Concêntrico
Cones de amostragem ( <i>sampler e skimmer</i> )	Pt
Leituras/replicatas	8
Lente iônica (V)	<i>Auto lens "on"</i>
Tempo de aquisição dos dados (ms)	50
Isótopo (m/z)	<sup>79</sup> Br, <sup>127</sup> I

**Tabela 4 - Continuação.**

<b>ICP OES</b>	
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1400 (S, C) e 1600 (CI)
Vazão de argônio no tubo externo (l min <sup>-1</sup> )	12,0
Vazão auxiliar de argônio (l min <sup>-1</sup> )	1,0
Vazão de argônio do nebulizador (l min <sup>-1</sup> )	1,0
Câmara de nebulização	Duplo passo, tipo <i>Scott</i>
Nebulizador	<i>Cross flow</i>
Vista	Axial
Comprimento de onda (nm)	Cl (134,724)
	S (182,034)
	C (193,091)
	Y (371,030)

Com respeito à calibração, cabe destacar que esta foi feita por meio do uso de soluções preparadas a partir de soluções estoque de concentração de 100 mg l<sup>-1</sup> (Cl, F e S) e de 10 mg l<sup>-1</sup> (Br e I). As faixas de calibração utilizadas foram de 1 a 10 mg l<sup>-1</sup> de Cl<sup>-</sup> e de 10 a 30 mg l<sup>-1</sup> SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (IC); 0,1 a 1 mg l<sup>-1</sup> de Br, F<sup>-</sup> e de 1 a 3 mg l<sup>-1</sup> I<sup>-</sup> (IC); 0,001 a 0,01 mg l<sup>-1</sup> de Br e 0,0001 a 0,001 mg l<sup>-1</sup> de I (ICP-MS); 1 a 10 mg l<sup>-1</sup> de Cl e 0,25 a 10 mg l<sup>-1</sup> de S (ICP OES).

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do *software* GraphPad Software®, Inc (InStat 3.0). A comparação de até duas médias foi feita através do cálculo do grau de confiança *Student (t)*, ao nível de 95%. A comparação de três ou mais médias foi realizada através da análise de variância – ANOVA, para intervalo de confiança de 95%.

#### **Determinação de Cl pelo Método Oficial Recomendado pela AOAC**

A determinação de Cl<sup>-</sup> nas amostras de ovo integral desidratado e suas frações foi também avaliada pelo método oficial (971.27) recomendado pela AOAC, a fim de comparar com o método otimizado. O procedimento utilizado para a determinação deste analito é baseado em uma titulação potenciométrica, que utiliza

uma solução de  $\text{AgNO}_3$  ( $0,08 \text{ mol l}^{-1}$ ) como agente titulante e um eletrodo íon seletivo de  $\text{Cl}^-$  para medir as diferenças de potencial estabelecidas ao longo da titulação (HORWITZ e LATIMER, 2011).

### **Determinação do Teor de Carbono Residual**

A determinação do RCC nas amostras decompostas por MIC foi feita por ICP OES somente na condição otimizada. Para tanto, os digeridos, bem como as soluções de calibração foram, previamente, purgadas com argônio por 2 min, para a remoção do  $\text{CO}_2$  dissolvido. Ítrio foi utilizado como padrão interno, este foi adicionado às amostras e aos padrões a uma concentração final igual a  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (GOUVEIA *et al.*, 2001).

Os parâmetros operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado são apresentados na Tab. 4.

*Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para as análises descritas no capítulo 4 (Materiais e Métodos), os quais possibilitaram o desenvolvimento e avaliação dos procedimentos de preparo de amostras de ovo integral desidratado e suas frações para a subsequente determinação de não metais por IC, ICP-MS, ICP OES.*

*A discussão dos resultados encontra-se subdividida em quatro partes principais. Na primeira delas, serão apresentados e discutidos os parâmetros avaliados para caracterizar a amostra físico-quimicamente. Na segunda parte, serão apresentados e discutidos aspectos relacionados aos parâmetros otimizados para processo de combustão das amostras, bem como quantificação dos analitos por técnicas variadas. Num terceiro momento, serão apresentados os resultados obtidos pelo método de extração e pelo método oficial descrito pela AOAC para, então comparar com o método proposto. Por último, serão apresentados os resultados obtidos para a aplicabilidade do método escolhido para ovos integrais, bem como suas frações (clara e gema).*

### Caracterização Físico-Química das Amostras

As amostras de ovo integral desidratado e de suas frações (clara e gema) foram submetidas à determinação do teor de umidade, cinzas, proteína bruta e gordura, de acordo com o que foi descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*). Cabe destacar que para esta avaliação foi escolhida amostras de apenas uma empresa de forma aleatória. Estes parâmetros foram avaliados com o intuito de obter informações a respeito do tipo de matriz a ser decomposta por MIC, visto que matrizes complexas com elevado conteúdo proteico e lipídico, podem ser de difícil decomposição, inclusive quando utilizado este método de preparo de amostras. Na Tab. 5 são apresentados os resultados obtidos para a caracterização físico-química da amostra de ovo integral desidratado e de suas frações (clara e gema).

**Tabela 5** - Determinação dos teores de umidade, cinzas, proteína bruta e gordura em amostras desidratadas de ovo integral e suas frações (clara e gema) resultados expressos em %  $\pm$  desvio-padrão, n=3).

Teor	Ovo integral	Clara de ovo	Gema de ovo
Umidade	2,9 $\pm$ 0,2	4,3 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,1
Cinzas	4,0 $\pm$ 0,4	7,0 $\pm$ 1,0	5,0 $\pm$ 0,6
Proteína bruta	39 $\pm$ 4	68 $\pm$ 5	30 $\pm$ 3
Gordura	31 $\pm$ 3	< 1	31 $\pm$ 4

Como pode ser observado na Tab. 5, como esperado, os teores de umidade (1,4 a 4,3%) para as amostras avaliadas foram consideravelmente baixos, visto que as mesmas foram submetidas a um processo de desidratação industrial. Além disso, os teores de cinzas (4 a 8%) também foram consideravelmente baixos, quando comparados com os teores de proteína bruta (30 a 67%) e de gordura (31%). Ainda, entre as amostras avaliadas, pode-se verificar uma maior variação percentual em relação ao teor de proteína bruta, sendo que a clara de ovo desidratada apresentou praticamente o dobro do valor percentual obtido para as demais amostras. Em contrapartida, a gema apresentou 30 vezes mais gordura, do que a clara. Além disso, cabe enfatizar que, possivelmente, parte do valor percentual não quantificado nas amostras avaliadas pode estar vinculado aos carboidratos presentes em ovos.

Embora não representem mais do que 10% do conteúdo nutricional presente em ovos e suas frações (KOBELITZ, 2011), carboidratos podem estar presentes numa proporção percentual maior, se considerado que juntamente as amostras pode ter adicionado um ou mais adulterante(s) que tenha(m) na sua constituição este nutriente.

A partir dessas informações, pode-se dizer que os constituintes majoritários do ovo integral desidratado, na clara, bem como na gema (proteína bruta e gordura) contribuem para a complexidade da matriz, o que pode limitar a quantidade de massa de amostra a ser decomposta por MIC.

Adicionalmente, pode-se verificar que de acordo com a Resolução 05 de julho de 1991, que rege o padrão de identidade e qualidade do ovo integral, os percentuais de proteína bruta e de gordura ficaram próximos aos limites mínimos estipulados (proteína bruta: mín. 40%, lipídios: mín. 45%) (BRASIL, 1991). Ainda, cabe destacar que outros trabalhos descrevem faixas de variação semelhantes aos percentuais obtidos para todos os parâmetros avaliados neste estudo, que incluem (teor de umidade: 3 a 7%; teor de cinzas: 3 a 6%; teor de proteína bruta: 33 a 84%; gordura: 0,4 a 54%), quando avaliado ovos integrais e/ou suas frações desidratados. Ademais, sobre as variações relatadas na literatura pode-se dizer que, possivelmente, encontram-se associadas ao tipo de alimentação, criação e raça das aves (CABONI *et al.*, 2004; *American Egg Board*, 2006; AYDI *et al.*, 2008; AQUINO *et al.* 2008; KOBELITZ, 2011).

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

A MIC foi um dos métodos de preparo de amostras avaliados visando a posterior determinação de Br, Cl, F, I e S em ovo integral desidratado pelas técnicas analíticas estudadas, tendo em vista que métodos de combustão têm sido aplicados de forma eficiente para a decomposição de alimentos para a subsequente determinação de halogênios (COSTA, 2013; MESKO *et al.*, 2010b; MESKO *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014). No entanto, é importante ressaltar que, até o momento, não existem relatos na literatura do uso da MIC para a decomposição de ovos, cuja matriz é bastante complexa, devido ao seu elevado conteúdo proteico e lipídico, como apresentado no item 5.1. Neste sentido, também cabe enfatizar que é imprescindível que a combustão ocorra de maneira adequada, pois a presença de

algumas espécies químicas, associadas a decomposição incompleta da amostra, pode ocasionar interferências durante a determinação dos elementos de interesse por técnicas como IC, ICP OES e ICP-MS. Como exemplo, pode-se citar a presença de carbono nos digeridos durante as análises por ICP-MS. Quando presente numa elevada concentração, o carbono permanece acumulado na interface do equipamento, implicando na perda de sensibilidade durante a análise, bem como podem ocorrer interferências na ionização dos analitos no plasma (NÓBREGA *et al.*, 2006; GRINDLAY *et al.*, 2013).

As decomposições por MIC foram realizadas conforme descrito no item 4.6.3 (*Materiais e Métodos*). Inicialmente, foi avaliada a forma de introdução da amostra no sistema de combustão, onde, primeiramente, foi verificada a possibilidade de uso de comprimidos obtidos a partir da prensagem das amostras. Como pode ser observado na Fig. 9, durante a etapa de prensagem das amostras foi observada a perda de gordura. Esta perda foi observada somente para as amostras com elevado teor de gordura (cerca de 30%), conforme apresentado no item 5.1.



**Figura 9** - Imagem ilustrativa da perda de gordura durante o preparo do comprimido de ovo integral desidratado (350 mg), por prensagem (tempo de prensagem: 30 s).

Diante disso, diferentemente da maioria dos trabalhos relatados na literatura que utilizaram amostras sólidas na forma de comprimidos, neste trabalho foi investigada a utilização de filmes de polietileno para envolver as amostras, visto que

o uso desse material como invólucro é reportado na literatura para envolver amostras semisólidas, como o mel, bem como outras amostras (COSTA, 2013; BARIN *et al.*, 2014). A imagem do invólucro produzido com a amostra de ovo integral desidratado encontra-se apresentada na Fig. 10.



**Figura 10** - Invólucro contendo 350 mg de ovo integral desidratado e 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $6 \text{ mol l}^{-1}$ ).

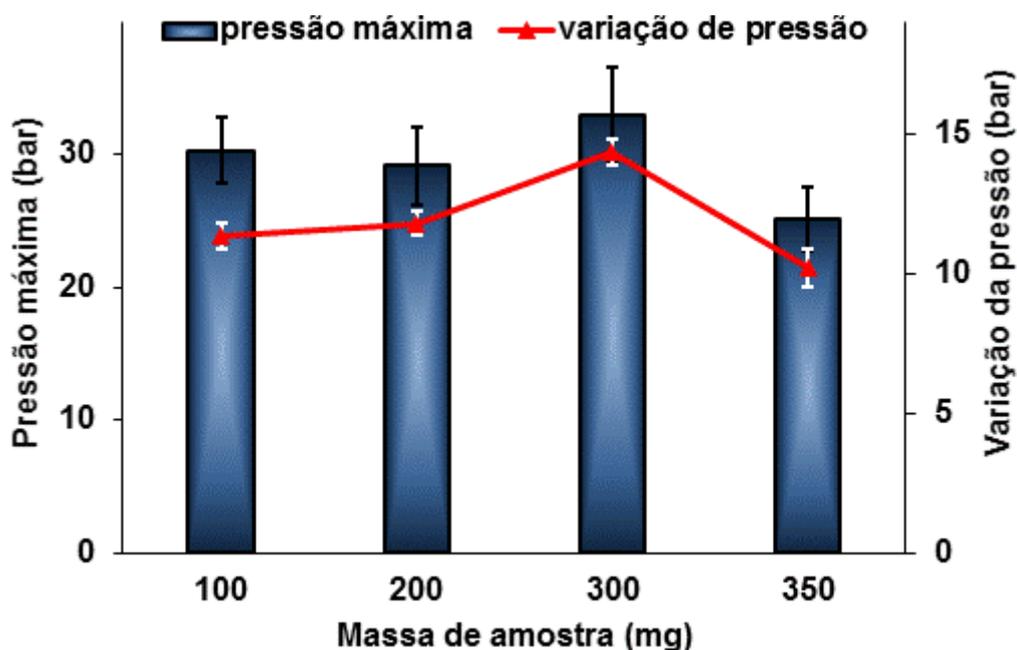
Embora as concentrações de Cl e S, por IC, nas amostras de ovo integral preparadas tanto na forma de comprimidos, quanto na forma de invólucros não tenham apresentado diferença significativa (teste *t* Student,  $p > 0,05$ ), optou-se por prepará-las na forma de invólucros. Esta escolha foi atribuída ao fato de não ter sido feita a determinação de Br e I nessas amostras até o término desse trabalho, o que poderia comprometer os resultados desses analitos, considerando que a gordura perdida durante a prensagem dos comprimidos poderia influenciar na quantificação dos mesmo. Além disso, apesar de ser viável preparar amostras de clara em pó, as quais apresentaram  $< 1\%$  de gordura, na forma de comprimidos, optou-se por padronizar uma forma de introdução da amostra no sistema de decomposição por MIC.

Adicionalmente, nos itens a seguir (5.2.1, 5.2.2 e 5.2.3) foram avaliados o tempo de combustão, a massa de amostra que poderia ser decomposta por MIC de forma apropriada, bem como a solução mais adequada para a absorção dos analitos.

### Avaliação da Massa Máxima de Amostra Decomposta por MIC

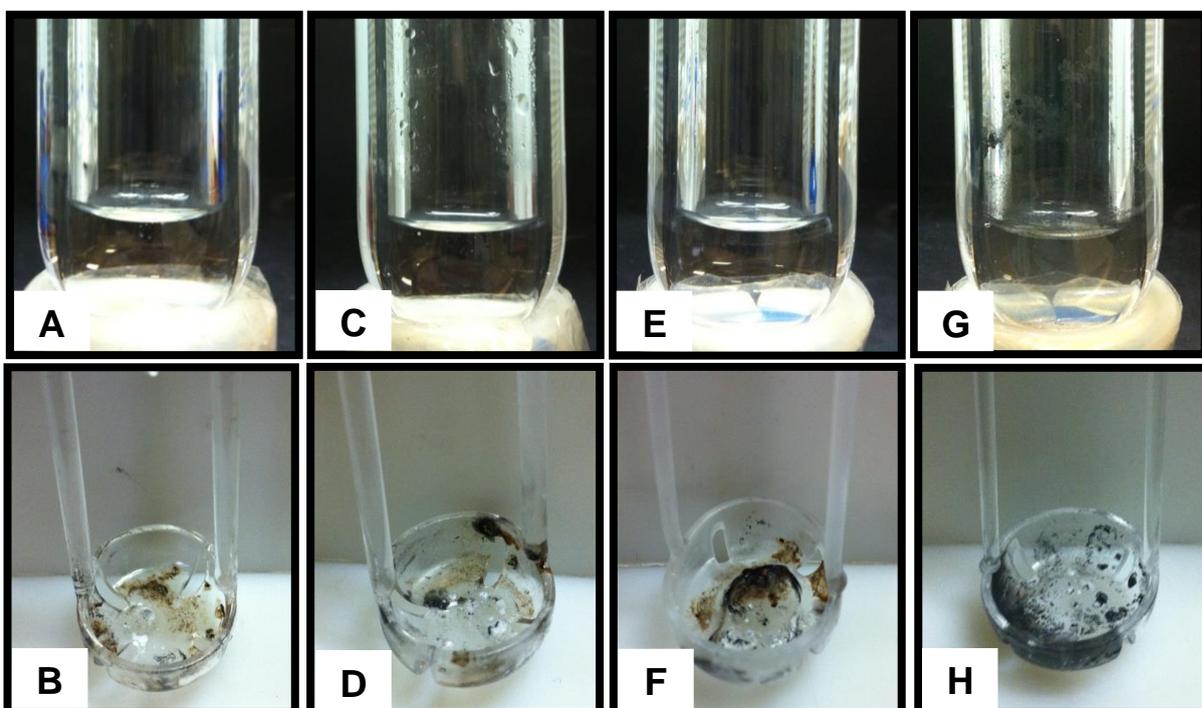
Como mencionado anteriormente, a massa máxima de amostra decomposta por MIC foi um parâmetro avaliado durante o desenvolvimento do método para as amostras de ovo integral desidratado e suas frações. A menor massa avaliada foi 100 mg, para estudos subsequentes a massa utilizada foi aumentada em incrementos de 50 mg ou 100 mg. No decorrer do estudo observou-se o aspecto das soluções obtidas após decomposição da amostra, a pressão máxima atingida no sistema para cada massa de amostra avaliada, bem como a variação interna da pressão do sistema. Esses parâmetros foram avaliados para que, assim, fosse determinada a massa máxima de amostra que poderia ser decomposta de um modo seguro sem que ocorresse um aumento excessivo da pressão do sistema, uma vez que a pressão operacional do forno de micro-ondas não deve ultrapassar 80 bar.

Os resultados obtidos a partir do monitoramento da pressão máxima atingida pelo sistema, durante a decomposição de diferentes massas de amostra por MIC, bem como os obtidos pelo monitoramento da variação da pressão do sistema são mostrados na Fig. 11.



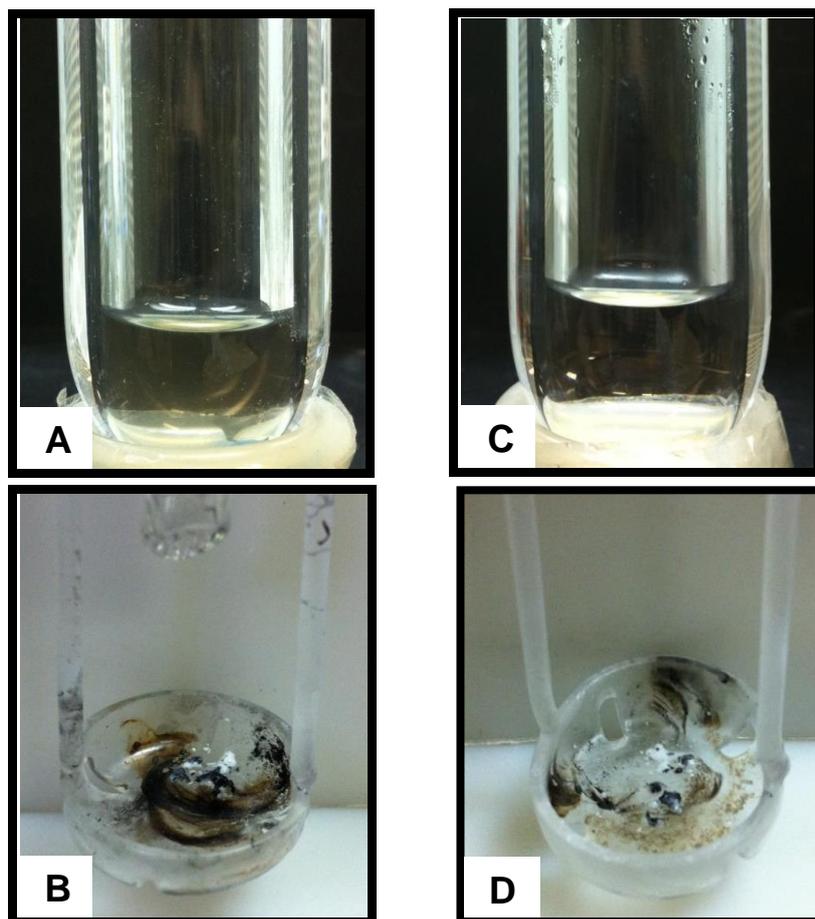
**Figura 11** - Pressão máxima atingida no sistema e variação da pressão em função da massa de amostra decomposta por MIC (pressão inicial de oxigênio - 20 bar, n = 3).

Conforme pode ser observado na Fig. 11, a pressão máxima atingida no sistema durante a combustão de até 300 mg de ovo integral não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste de *Tuckey*) com o incremento da massa de amostra. Além disso, a pressão máxima atingida foi cerca de 37 bar, o que de acordo com o fabricante do equipamento não oferece risco devido ao excesso de pressão. Ainda, pode-se observar que mesmo com o aumento da massa de amostra, o aumento da pressão do sistema em relação a pressão inicial de  $O_2$  não foi superior a 20 bar para as massas avaliadas. A partir deste estudo foi possível perceber que massas de amostras de até 300 mg podem ser decompostas por MIC a uma pressão inicial de  $O_2$  de 20 bar (Fig. 12). Em contrapartida, sob estas condições, não foi possível realizar a combustão de 350 mg de amostra, visto que a decomposição foi incompleta.



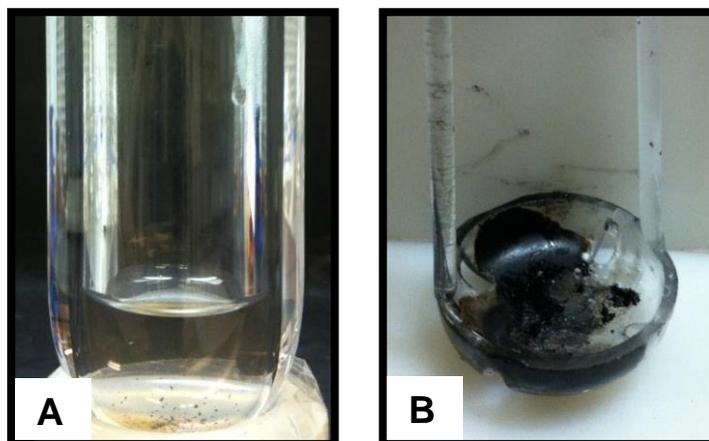
**Figura 12** - Aspecto da solução absorvedora e do suporte de quartzo após a decomposição de diferentes massas de ovo em pó por MIC com pressão inicial de 20 bar de  $O_2$ : 100 mg (A) e (B); 200 mg (C) e (D); 300 mg (E) e (F) e 350 mg (G) e (H).

Dessa maneira, investigou-se a adição de 50  $\mu\text{l}$  e 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$  (mesma solução de ignição) no interior do invólucro da amostra, com o intuito de avaliar se o mesmo auxiliaria no processo de combustão. O  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  é um agente oxidante, assim, quando adicionado à amostra, poderia tornar a reação de combustão mais homogênea. Cabe destacar que além do  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  outros agentes oxidantes poderiam ter sido utilizados, como  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{NaNO}_3$ . O que limita o poder de ação do agente oxidante sob a ignição é a concentração e a potência de radiação micro-ondas aplicada durante essa etapa (PEREIRA *et al.*, 2015). Como pode ser observado na Fig. 13 (A) e (B), com a adição de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$  há presença de material particulado, tanto na solução absorvedora, quanto no suporte de quartzo – diferentemente do que é mostrado com a adição de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$ , onde foi possível decompor 350 mg de amostra, sem a presença de material particulado (Fig. 13 (C) e (D)). A eficiência da decomposição dessa massa de amostra foi comprovada por meio da determinação do RCC nos digeridos, onde nestas condições, as soluções analisadas apresentaram RCC abaixo de 25 mg  $\text{l}^{-1}$  (LD instrumental).



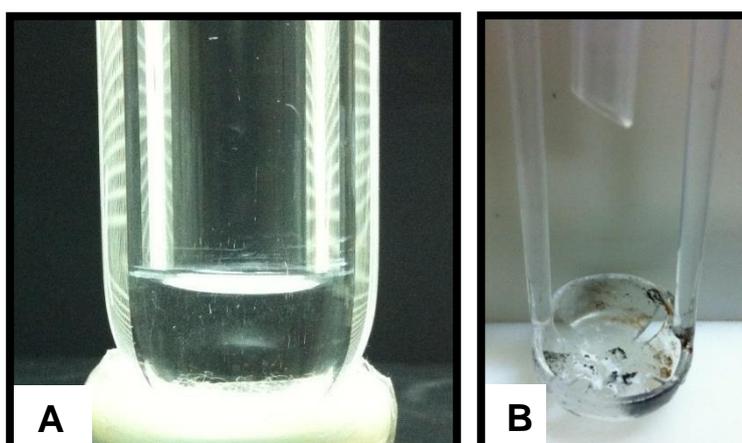
**Figura 13** - Aspecto da solução absorvedora e do suporte de quartzo após a decomposição de 350 mg de ovo em pó, com a adição de 50  $\mu\text{l}$  (A) e (B) ou 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$  (C) e (D), com pressão de  $\text{O}_2$  de 20 bar.

Tendo em vista que foi possível decompor 350 mg de amostra utilizando  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como um auxiliar de combustão, foi dado prosseguimento a avaliação da decomposição da amostra com o uso de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ). Entretanto, não foi possível realizar a decomposição de massas superiores a 350 mg. Possivelmente, isso se deve, em parte, ao aumento do conteúdo proteico e lipídico, associado ao incremento da massa de amostra, o qual acaba por dificultar a combustão, conforme pode ser visualizado na Fig. 14 (A) e (B).



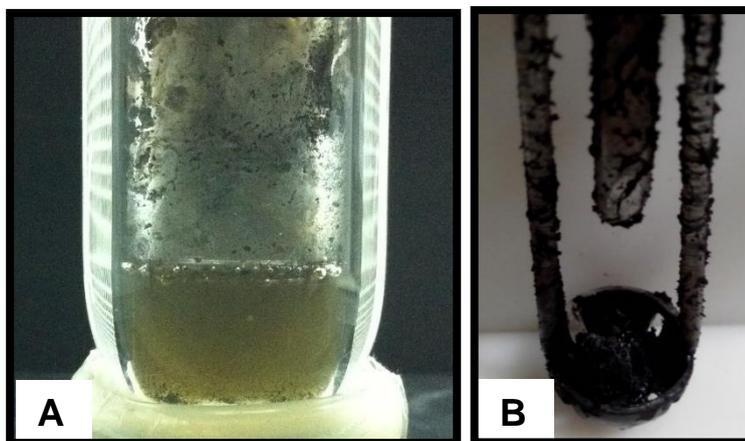
**Figura 14** - Aspecto da solução absorvedora (A) e do suporte de quartzo (B) após a decomposição de 400 mg de ovo integral por MIC, com 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$  e pressão de  $\text{O}_2$  de 20 bar.

Assim, devido a massa de 350 mg ter sido decomposta de uma forma eficiente na presença de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$ , com baixo RCC ( $< 25$  mg  $\text{l}^{-1}$ ), esta foi selecionada para os estudos subsequentes. Embora a condição descrita acima tenha sido selecionada para estudos posteriores, optou-se ainda por avaliar a decomposição de massas maiores de clara de ovo, em virtude de o teor de gordura ( $< 1\%$ ) presente nesta fração ter sido bastante diferente das demais amostras caracterizadas físico-quimicamente. Conforme observado na Fig. 15 (A) e (B), para massas de amostra de até 450 mg, sem adição de nenhum auxiliar de ignição, pode ser decomposta de forma eficiente por MIC.



**Figura 15** - Aspecto da solução absorvedora (A) e do suporte de quartzo (B) após decomposição de 450 mg de clara de ovo desidratada por MIC.

Para fins comparativos, avaliou-se ainda a decomposição de 450 mg de gema de ovo. Na Fig. 16 (A) e (B) é possível observar que essa massa de amostra não obteve o mesmo comportamento verificado para a clara, o que confirma que o teor de gordura é um dos principais fatores limitante em relação a quantidade máxima de amostra a ser decomposta pelas condições utilizadas na decomposição por MIC.



**Figura 16** - Aspecto da solução absorvedora (A) e do suporte de quartzo (B) após decomposição de 450 mg de gema de ovo desidratada por MIC.

É importante ressaltar que estes dois últimos estudos foram realizados com o intuito de elucidar o porquê foi possível decompor somente massas de ovo integral e de gema de ovo inferiores ao do que comumente é citado na literatura (decomposições de 500 a 1000 mg) (COSTA *et al.*, 2013; HARTWIG *et al.*, 2014; MESKO *et al.*, 2014). Diante disso, cabe destacar que não foram feitos estudos adicionais para verificar um limite máximo de clara de ovo possível de ser decomposto. No entanto, acredita-se que massas maiores que 450 mg sejam possíveis de serem decompostas, uma vez que o teor de gordura nessa fração foi consideravelmente pequeno.

Cabe destacar que os estudos realizados para avaliação da massa máxima de amostra a ser decomposta por MIC foram feitos sem a etapa de refluxo (etapa 3 do programa de irradiação utilizado). Além disso, a pressão máxima utilizada nestes estudos foi limitada a 20 bar, em função da mangueira disponível no laboratório para pressurizar os frascos com O<sub>2</sub> não permitir exceder a pressão selecionada.

## Determinação do Intervalo de Tempo da Combustão

Utilizando as condições descritas no item 4.6.2, foi possível visualizar o comportamento e a duração do processo de combustão. Neste estudo foi avaliada a combustão de 100 ou 350 mg de ovo integral desidratado na presença de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$ , 20 bar de  $\text{O}_2$  e 6 ml de água. Com relação ao tempo de ignição foi verificado que ambas as massas de amostras avaliadas levaram cerca de  $6 \pm 2$  s, o que demonstra que o tempo de ignição independe da quantidade de massa de amostra utilizada. Além disso, faixas semelhantes em relação ao tempo de ignição são descritas na literatura para matrizes diversas, como para amostras de coque de petróleo ( $7 \pm 3$  s) e polímeros ( $4 \pm 1$  s) (MELLO, 2008; PIRES, 2014). Por sua vez, com relação ao tempo de combustão foi observado que o intervalo foi praticamente proporcional ao aumento da massa de amostra, sendo que para 100 mg de amostras a combustão durou em torno de  $11 \pm 2$  s, enquanto que para 350 mg de amostras na presença de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{l}^{-1}$  o intervalo de tempo de combustão foi de  $29 \pm 5$  s. Essas informações são importantes para definir o programa de irradiação com micro-ondas que será usado.

Diante disso, a escolha do tempo e da potência selecionados para as etapas 1 e 2, apresentadas na Tab. 2 (*Materiais e Métodos*), foi dada a partir das observações descritas acima, que demonstraram que a queima pode levar de 28 a 42 s, se considerado os desvios-padrão obtidos para o tempo de ignição e o intervalo de tempo de combustão. Além disso, considerando que a radiação micro-ondas não se distribui de forma homogênea dentro da cavidade do forno, este fator também deve ser levado em consideração na elaboração do programa de decomposição.

Por sua vez, o tempo de 5 min a 1400 W, referente a etapa 3 do programa de irradiação apresentado na Tab. 2 (*Materiais e Métodos*), foi selecionado considerando que alguns autores demonstraram que para amostras alimentícias decompostas por MIC e absorvidas em soluções levemente alcalinas, uma etapa de refluxo de 5 min proporcionou melhores recuperações para I (cerca de 99%), quando comparada as decomposições feitas sem refluxo (entre 70 e 75%). Além disso, os autores relatam que foi possível obter RSDs relativamente baixos ( $< 4\%$ ) nas condições avaliadas com o uso da etapa de refluxo (MESKO *et al.*, 2010b). Cabe destacar ainda que no trabalho de Mello *et al.* (2008) são descritos recuperações em

torno de 100% para S, quando avaliada a adição de uma etapa de refluxo de 5 min a 1400 W para decompor amostras de coque de petróleo por MIC (MELLO *et al.*, 2008).

A escolha da etapa de resfriamento, referente a etapa 4 do programa de irradiação micro-ondas, em que foram utilizados 20 min, foi dada de acordo com a recomendação do fabricante (Anton Paar GmbH, 2006).

Assim, o programa definido 50 s a 1400 W (etapa de combustão), 1 min a 0 W, etapa de espera para que a combustão das amostras se completasse, sem que ocorresse evaporação da solução absorvedora, seguido da etapa de refluxo (5 min a 1400 W) e da etapa de resfriamento (20 min a 0 W) foi definido para realizar a combustão das amostras.

É importante ressaltar que a combustão da amostra gerou uma rápida elevação da pressão no interior do frasco, a qual foi causada pela rápida liberação dos gases da queima, o que pode ser observado no visor do equipamento. Isso ocorre porque no momento da combustão a taxa de elevação da pressão excede  $0,8 \text{ bar s}^{-1}$ . Como este valor é parâmetro limite, o *software* informa que um dos parâmetros operacionais foi excedido (nesse caso o limite de elevação da pressão), o que pode ser um indicativo de que a combustão ocorreu.

### **Avaliação da Solução Absorvedora**

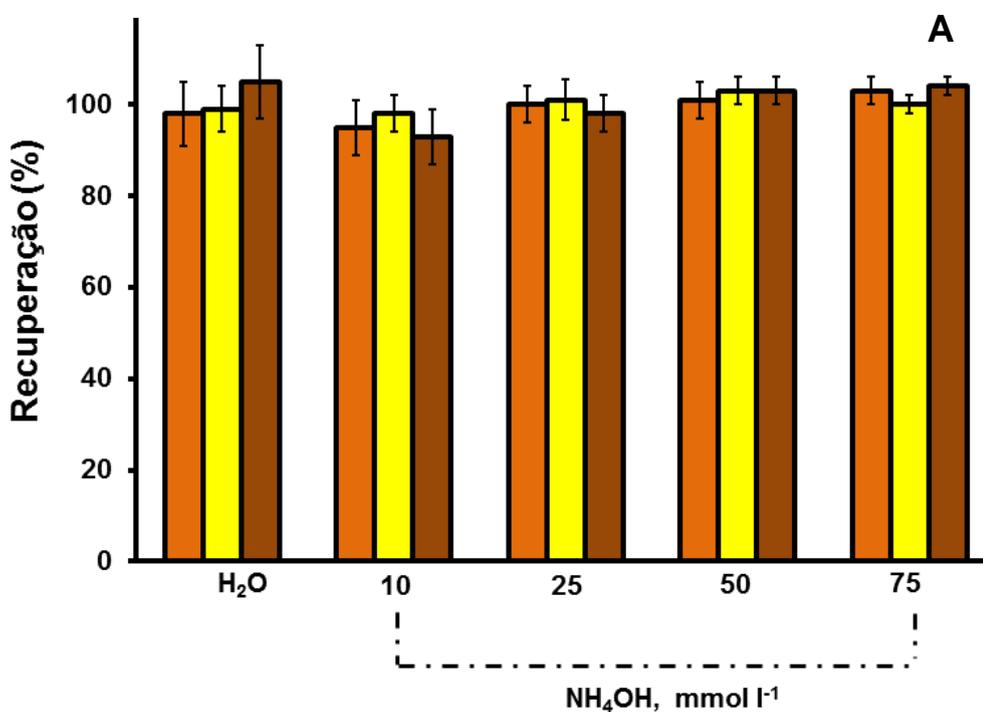
Após as condições operacionais do sistema de combustão terem sido estabelecidas, foram feitos ensaios de recuperação para avaliar a solução mais adequada para a absorção de halogênios e S liberados após a decomposição das amostras. Neste estudo, foram avaliadas soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (10, 25, 50 e 75  $\text{mmol l}^{-1}$ ) ou água. Estas soluções foram escolhidas tendo em vista que meios levemente alcalinos, quando utilizados para a absorção de halogênios e S, proporcionam a obtenção de resultados exatos e precisos (MELLO *et al.*, 2008; MESKO *et al.*, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014). Além disso, essas soluções são compatíveis com as técnicas utilizadas para a determinação dos analitos, conforme trabalhos relatados na literatura (MELLO *et al.*, 2008; MESKO *et al.*, 2010b, 2014; HARTWIG *et al.*, 2014). Para tanto, os ensaios de recuperação foram feitos com a adição de concentrações conhecidas de Br, Cl, F, I e S aos invólucros contendo amostras de ovo integral desidratado (item 4.6.3 – *Materiais e Métodos*).

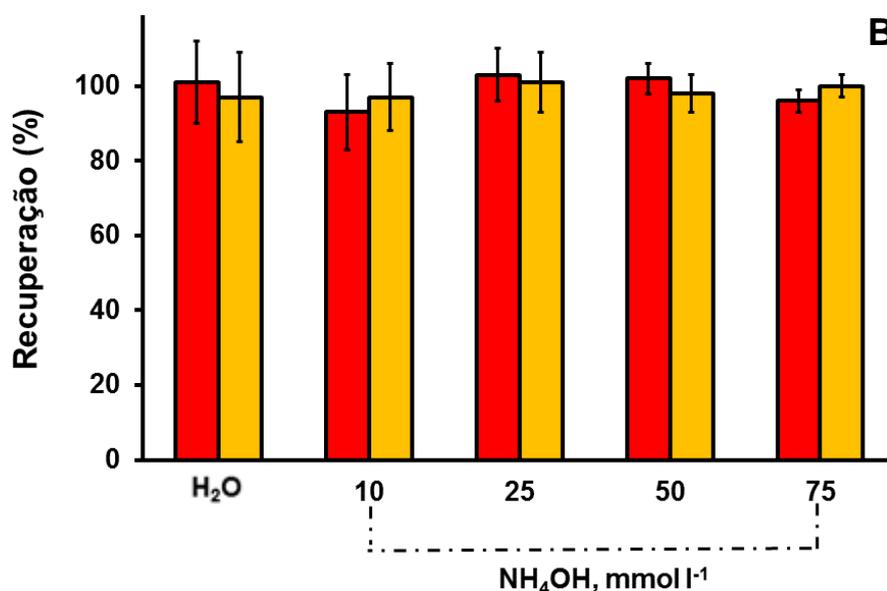
Para as determinações de Cl, F e S foi utilizado um cromatógrafo de íons. Por sua vez, para avaliação das recuperações de Br e I não foi possível utilizar este equipamento, visto que por IC estes elementos não foram detectados nas amostras decompostas nas condições iniciais avaliadas.

Cabe destacar ainda que, conforme apresentado na Tab. 1, diversos trabalhos relataram baixas concentrações de Br e I em ovo integral desidratado, bem como em suas frações.

Diante disso, optou-se por fazer as determinações de Br e I em um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, cuja técnica possibilita, de uma maneira geral obter, baixos LDs para Br e I entre (0,01 e 0,05  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente) (KNAPP *et al.*, 1998; WANG; JIANG, 2007).

Os resultados obtidos por IC, para avaliação das recuperações de Cl, F e S, bem como por ICP-MS para avaliação das recuperações de Br e I, nas soluções absorvedoras estudadas estão apresentados na Fig.17 (A) e (B).





**Figura 17** - Recuperações para ■ Cl, ■ F e ■ S, por IC (A) e para ■ Br e ■ I por ICP-MS (B), em amostras de ovo integral desidratada decompostas por MIC com 5 min de refluxo, utilizando NH<sub>4</sub>OH (10 a 75 mmol l<sup>-1</sup>) e água como solução absorvedora (massa 350 mg, n = 3).

Como pode ser observado na Fig. 17 (A) as recuperações para Cl, F e S foram quantitativas para todas as soluções avaliadas, uma vez que para Cl as recuperações variaram de 95 a 103%, e para F e S variaram de 98 a 103% e 93 a 104%, respectivamente. Contudo, com o uso das concentrações de 25, 50 e 75 mmol l<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH, como solução absorvedora, os RSDs para os analitos mostraram-se inferiores (< 5%) aos obtidos quando 10 mmol l<sup>-1</sup> (cerca de 6%) ou água (entre 7 e 8%) foram utilizadas, para absorver Cl e S. Os RSDs para F foram baixos e não variaram de forma pronunciada nas diferentes soluções (2 a 5%). Com relação as recuperações para F cabe salientar que devido à baixa concentração deste elemento nas amostras avaliadas, optou-se por avaliar o comportamento deste analito a partir da adição de uma concentração conhecida de F na soluções obtidas após decomposição por MIC, que pudessem ser detectadas por IC.

Quanto aos ensaios de recuperação para Cl e S, por ICP OES, nas soluções absorvedoras de NH<sub>4</sub>OH (10 a 75 mmol l<sup>-1</sup>) ou água foram verificadas recuperações entre 96 e 109% para Cl e entre 91 a 99% para S, com RSDs inferiores a 7%. Além disso, através da avaliação dos resultados obtidos por ICP OES para Cl e S, pelo teste de *Tuckey*, não foi observada diferença significativa, a um nível de 95% de

confiança, dos valores obtidos para estes elementos por IC. Dessa forma, todas as soluções utilizadas foram consideradas adequadas para a absorção de Cl, F e S após a decomposição das amostras de ovo integral desidratado.

Conforme apresentado na Fig. 17 (B), em relação às recuperações para Br e I, pode-se verificar que as soluções absorvedoras avaliadas também mostraram-se satisfatórias, visto que para Br as recuperações variaram de 96 a 103% e para I as recuperações variaram de 97 a 101%. Todavia, somente a partir da concentração de 50 mmol l<sup>-1</sup> foi possível obter RSDs inferiores a 6%, visto que em NH<sub>4</sub>OH 10 mmol l<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>OH 25 mmol l<sup>-1</sup> e água foram obtidos RSDs em torno de 10, 8 e 12%, respectivamente. Cabe enfatizar que no trabalho desenvolvido por Costa (2013), em que Br e I foram determinados em amostras de méis, em baixas concentrações, foi relatado comportamento semelhante ao observado neste trabalho, onde menores RSDs (< 6%) foram obtidos a partir do uso de soluções de NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup>. Dessa maneira, as soluções utilizadas com concentrações a partir de 50 mmol l<sup>-1</sup> foram consideradas adequadas para a absorção de Br e I após a decomposição por MIC.

Embora as soluções absorvedoras estudadas para Br, Cl, F, I e S tenham apresentado recuperações que indiquem ser uma possibilidade de uso para manter os analitos absorvidos em seus respectivos meios, estes resultados não podem ser considerados isoladamente, visto que o pH da solução absorvedora, após a decomposição das amostras, influencia na estabilidade do analito no meio. Com isso, após decomposição das amostras por MIC, o pH das soluções absorvedoras foi determinado, onde foi verificada uma variação entre 2,0 e 8,0. Os menores valores de pH observados referem-se às soluções obtidas após a decomposição das amostras utilizando água (2,0) e NH<sub>4</sub>OH 10 ou 25 mmol l<sup>-1</sup> (2,0 a 3,0) como solução absorvedora, enquanto que para as demais soluções o pH manteve-se entre 7,0 e 8,0. Assim, o pH da solução obtida quando foram utilizadas água ou solução de NH<sub>4</sub>OH (10 ou 25 mmol l<sup>-1</sup>) pode ser um indicativo de que em algumas situações os halogênios não possam permanecer absorvidos estáveis nessas soluções, devido ao meio ácido favorecer a formação de espécies voláteis com os halogênios (HX ou X<sub>2</sub>) (KNAPP *et al.*, 1998; GÉLINAS; KRUSHEVSKA; BARNES, 1998; AL-AMMAR; REITZNEROVÁ; BARNES, 2001; FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998; PEREIRA *et al.*, 2009).

É importante ressaltar ainda que outros autores (HARTWIG *et al.*, 2014) em que amostras de camarão foram decompostas por MIC para a posterior determinação de Br e I numa faixa de concentração variada (Br: 28 a 320 mg kg<sup>-1</sup>; I: 1 a 40 mg kg<sup>-1</sup>), relataram recuperações inferiores a 60% para estes elementos, quando utilizado a solução de NH<sub>4</sub>OH 25 mmol l<sup>-1</sup>, o que reforça que as soluções absorvedoras de NH<sub>4</sub>OH 10 ou 25 mmol l<sup>-1</sup> ou água podem não ser uma alternativa viável. Além disso, estas observações estão de acordo com alguns trabalhos na literatura que mencionam que meios alcalinos possibilitam a formação de compostos não voláteis com os halogênios (KNAPP *et al.*, 1998; GÉLINAS; KRUSHEVSKA; BARNES, 1998; AL-AMMAR; REITZNEROVÁ; BARNES, 2001; FECHER; GOLDMANN; NAGENGAST, 1998; PEREIRA *et al.*, 2009).

Para avaliar a exatidão do método proposto o RM de leite integral em pó (NIST 8435) foi decomposto por MIC usando a solução de NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup>, conforme descrito no item 3.4 (*Materiais e Métodos*). Com relação ao RM utilizado, cabe salientar que este foi escolhido em vista de ser o que apresentou características mais semelhantes da amostra de ovo integral desidratado, visto que, este RM é constituído de 3,5% de umidade, 5,9% de cinzas, 26% de proteína e 21% de gordura, conforme descrito no material disponível deste RM no site da NIST ([www-s.nist.gov](http://www-s.nist.gov)). O RM NIST 8415 (ovo integral desidratado), que foi avaliado em alguns trabalhos apresentados na Tab. 1 não pode ser usado neste estudo, em função deste não estar disponível para aquisição durante o desenvolvimento do mesmo.

Os resultados apresentados na Tab. 6, referentes às determinações de Cl e S no RM por IC e Br e I no RM por ICP-MS, após decomposição por MIC, mostraram concordâncias como os valores de referência para Br de 95%, para Cl de 102%, para I de 103% e para S de 97%, o que indica que o método proposto apresenta adequada exatidão. Além disso, considerando que o RM não apresenta uma matriz totalmente semelhante a da amostra, fez-se um estudo adicional com o intuito de verificar a exatidão. Para tanto, foi feita a decomposição por MIC de cerca de 50 mg do RM misturado com a amostra de ovo integral (300 mg), utilizando NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup> como solução absorvedora. Determinações de Cl e S foram feitas por IC e Br e I por ICP-MS. A partir desta avaliação, foram obtidas recuperações de 95 ± 2% para Br, 107 ± 4% para Cl, 95 ± 1% para I e 109 ± 3% para S, confirmando que essa solução é adequada para a absorção dos analitos após a decomposição de ovo por

MIC e subsequente determinação por IC ou ICP-MS. Cabe destacar que não foi possível fazer a determinação de F no RM NIST 8435, pois a concentração esteve abaixo do LD do método desenvolvido.

**Tabela 6** - Determinação de Br, Cl, F, I e S no RM NIST 8435 (*Whole milk powder*), por IC ou ICP-MS, após decomposição por MIC, utilizando  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol l}^{-1}$ , como solução absorvedora (resultados expressos em  $\text{mg kg}^{-1} \pm$  desvio padrão,  $n=3$ ).

Analito	Valor encontrado	Valor de referência
Br	$19 \pm 0,7$	$20 \pm 10$
Cl	$8563 \pm 343$	$8420 \pm 440$
F	$< 44,1$	$0,17^*$
I	$2,4 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,4$
S	$2574 \pm 77$	$2650 \pm 350$

\* valor somente informado

Após a escolha da solução absorvedora mais apropriada para a absorção de Br, Cl, I e S, a amostra de ovo integral desidratado foi decomposta por meio da MIC utilizando como solução absorvedora  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol l}^{-1}$ , sendo os teores de Cl e S quantificados por IC, e os teores de Br e I quantificados por ICP-MS.

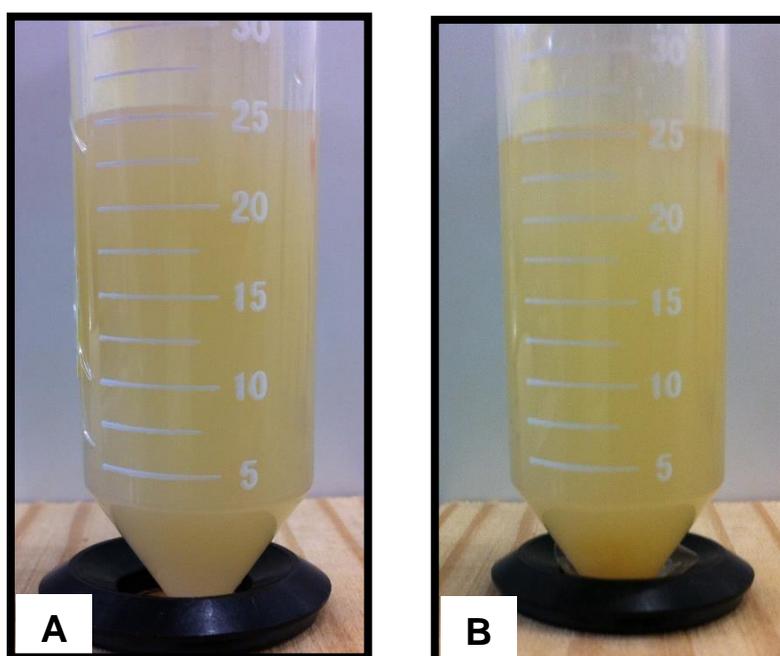
A concentração de Cl e S encontrada na amostra analisada foi de  $6049 \pm 242$  e  $6767 \pm 203 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente. Os RSDs para ambos os analitos ficaram entre 3 e 4%, o que indica que o método apresenta boa precisão. Por sua vez, para Br e I foram obtidas concentrações bastante inferiores às verificadas para Cl e S, sendo obtidas concentrações de  $5,29 \pm 0,21$  e  $0,66 \pm 0,03 \text{ mg kg}^{-1}$  para Br e I, respectivamente. Assim como para Cl e S, os RSDs obtidos foram entre 4 e 5%, indicando, também, boa precisão.

### **Extração Alcalina Assistida por Radiação Micro-ondas em Sistema Fechado**

A extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado foi um dos métodos de preparo de amostras avaliados visando, inicialmente, a determinação de Br e I em ovo integral desidratado por ICP-MS. Esse método foi

avaliado, tendo em vista que a extração é uma das formas de preparo de amostras mais utilizadas visando a posterior determinação de halogênios (MARTINS *et al.*, 2002; BATISTA *et al.*, 2009; CAMPILLO, *et al.*, 2010). Para tanto, amostras de ovo integral desidratado foram submetidas ao procedimento de extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado e utilizando duas soluções: solução de HTMA  $0,11 \text{ mol l}^{-1}$ , cuja escolha encontra-se pautada em estudos anteriores (MESKO *et al.*, 2010b; HARTWIG, 2014), e solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$ , tendo em vista que esta foi a solução otimizada para a absorção dos analitos por MIC. A extração foi realizada conforme o procedimento descrito no item 4.7 (*Materiais e Métodos*).

Na Fig. 18 (A) e (B) podem ser observadas as soluções obtidas após a amostra de ovo integral desidratado ter sido preparada por extração alcalina assistida por radiação micro-ondas, utilizando as diferentes soluções alcalinas.



**Figura 18** - Aspecto das soluções obtidas por extração alcalina assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado usando 350 mg de ovo integral desidratado, e HTMA  $0,11 \text{ mol l}^{-1}$  (A) e  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$  (B).

Com base na Fig. 18 (A) pode-se perceber que ao utilizar HTMA  $0,11 \text{ mol l}^{-1}$  ou  $\text{NH}_4\text{OH}$   $50 \text{ mmol l}^{-1}$  (Fig. 18 (B)) na extração das amostras foram obtidas soluções com colorações visualmente semelhantes. Comportamento parecido foi

verificado no trabalho desenvolvido por Hartwig (2011) que demonstrou que não houve mudança na coloração para as mesmas soluções extratoras utilizadas neste trabalho, quando estas foram usadas para extrair Br e I em camarão e suas frações.

Com relação aos resultados obtidos para Br e I foi verificado que utilizando HTMA 0,11 mol l<sup>-1</sup> a concentração de Br foi menor que o LD (12,0 mg kg<sup>-1</sup>), o que está associada, possivelmente, a contaminação do HTMA com este analito, uma vez que os brancos foram em torno de 6,61 µg l<sup>-1</sup>. Usando NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup> foi verificada uma concentração de Br de 3,68 ± 0,14 mg kg<sup>-1</sup>, com RSD em torno de 4%. Cabe ressaltar que esta concentração representou cerca de 66% da concentração obtida para Br (5,29 mg kg<sup>-1</sup>) quando utilizado a MIC como preparo de amostras e NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup> como solução absorvedora, o que é um indicativo de que a solução de NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup>, possivelmente, não extraiu todo o Br presente na amostra.

Embora testes adicionais não tenham sido feitos, provavelmente com o aumento da concentração dessas soluções e/ou aumento do tempo de contato entre as soluções extratoras e a amostra seriam alternativas a serem avaliadas para possibilitar uma melhor extração de Br.

A concentração de I, quando utilizado HTMA 0,11 mol l<sup>-1</sup> também foi menor que o LD (2,30 mg kg<sup>-1</sup>), enquanto que quando utilizado NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup> a concentração de I foi de 0,310 ± 0,220 mg kg<sup>-1</sup>, com um RSD de cerca de 71%, o que indica que a extração com esta solução alcalina não ocorreu de forma completa e homogênea.

Com relação ao teor de carbono, vale salientar que este é elevado após a extração com soluções alcalinas, visto que neste método não ocorre à decomposição da matriz da amostra, com a conversão da matéria orgânica em CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, como ocorre em outros sistemas de decomposição de amostras, como os baseados nos métodos de combustão (FLORES *et al.*, 2007). Dessa maneira, foi necessária a realização de diluições (de no mínimo 20 vezes), previamente as análises por ICP-MS.

Diante dos resultados obtidos para Br e I, bem como do fato de que estas soluções apresentaram um elevado conteúdo de carbono e outros interferentes dispersos na solução extratora, optou-se por não avaliar as concentrações de Cl, F e S por IC, principalmente para evitar possíveis danos a coluna cromatográfica.

## **Comparação entre os Diferentes Procedimentos de Preparo de Amostras**

Embora o procedimento de preparo de amostras envolvendo a extração alcalina tenha possibilitado a determinação de Br e I, por ICP-MS, este não se mostrou totalmente adequado para a determinação destes analitos, conforme apresentado e discutido anteriormente. Contudo, considerando que não foi viável avaliar as suas potencialidades neste trabalho, é possível descrever algumas vantagens oferecidas por este método, quando comparado a outros métodos de extração, como redução do tempo necessário para o aquecimento e uso de soluções diluídas no preparo de amostras, visto que este método utiliza radiação micro-ondas, o que auxilia no processo de extração dos elementos de interesse. Além disso, o procedimento de extração envolve o uso de um sistema fechado, o que evita perdas e contaminações, durante o preparo das amostras (NÓBREGA *et al.*, 2006).

Em contrapartida, quando comparado com a MIC, este sistema apresenta algumas desvantagens como tempo de preparo de amostras relativamente maior e elevado conteúdo de carbono, visto que não ocasiona a oxidação da matéria orgânica das amostras. Dessa maneira, por possibilitar a obtenção de baixos RCCs e o uso de soluções diluídas, a MIC permite que as soluções obtidas sejam adequadas para determinação de analitos por diversas técnicas analíticas. Ademais, a MIC também possibilita a utilização de um sistema fechado, evitando, assim, perdas por volatilização e contaminações. Ainda, vale salientar que a MIC teve sua exatidão comprovada para Br, Cl, F, I e S por meio de ensaios de recuperação e pela decomposição do RM NIST 8435.

Diante disso, levando em consideração as vantagens da MIC frente a extração assistida por radiação micro-ondas, é importante ressaltar que a MIC mostrou-se mais adequada para o preparo de amostras de ovo integral desidratado, visando a posterior a determinação de halogênios e S, por diversas técnicas analíticas.

## **Branco e Limites de Detecção**

O cálculo dos limites de detecção dos diferentes métodos avaliados foi realizado por meio de um método sugerido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) que, utiliza o branco da amostra para a

obtenção do LD. A equação do método é 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). Cabe destacar que 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.

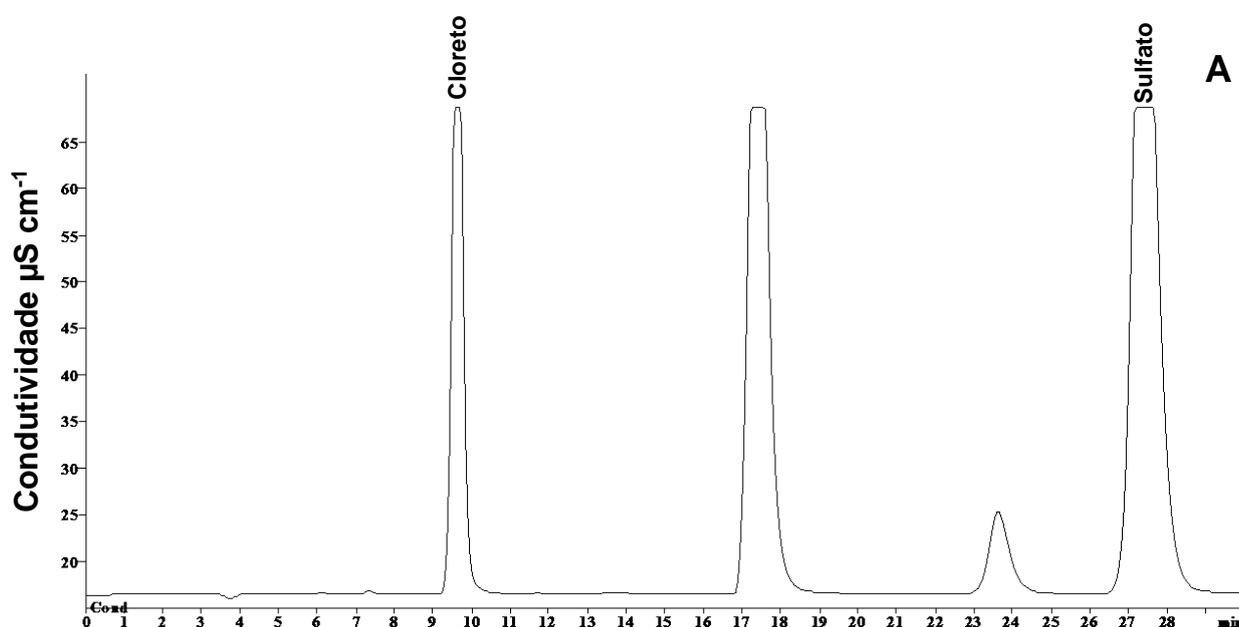
$$LD = \bar{x} + t_{(n-1, 1-\alpha)} \times s \quad (1)$$

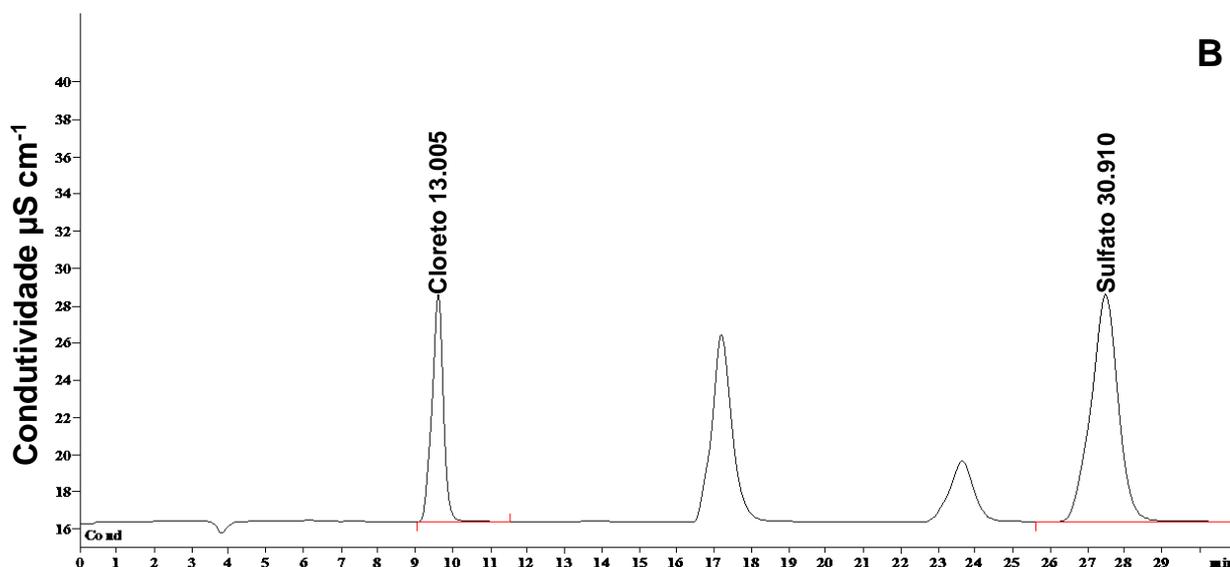
Posteriormente à obtenção dos LDs, onde se utilizou um  $t$  igual a 3, fez-se a conversão dos mesmos considerando a aferição, a massa de amostra e as diluições, quando necessárias. Assim, os resultados obtidos para os LDs de cada método são apresentados na Tab. 7.

**Tabela 7** - Limites de detecção obtidos por ICP-MS, IC, ICP OES e AOAC após os diferentes métodos de preparos de amostras.

Método de preparo de amostras e solução utilizada	Técnica de determinação	Limite de detecção (mg kg <sup>-1</sup> )				
		Br	Cl	F	I	S
Extração alcalina assistida por radiação micro-ondas (HTMA 0,11 mol l <sup>-1</sup> )	ICP-MS	12,0	nd	nd	2,30	nd
Extração alcalina assistida por radiação micro-ondas (NH <sub>4</sub> OH 50 mmol l <sup>-1</sup> )	ICP-MS	0,282	nd	nd	0,021	nd
MIC (NH <sub>4</sub> OH 50 mmol l <sup>-1</sup> )	ICP-MS	0,039	nd	nd	0,015	nd
MIC (NH <sub>4</sub> OH 50 mmol l <sup>-1</sup> )	IC	9,34	42,6	44,1	58,8	39,2
MIC (NH <sub>4</sub> OH 50 mmol l <sup>-1</sup> )	ICP OES	nd	0,011	nd	nd	0,001
AOAC	Titulação potenciométrica	nd	79,0	nd	nd	nd

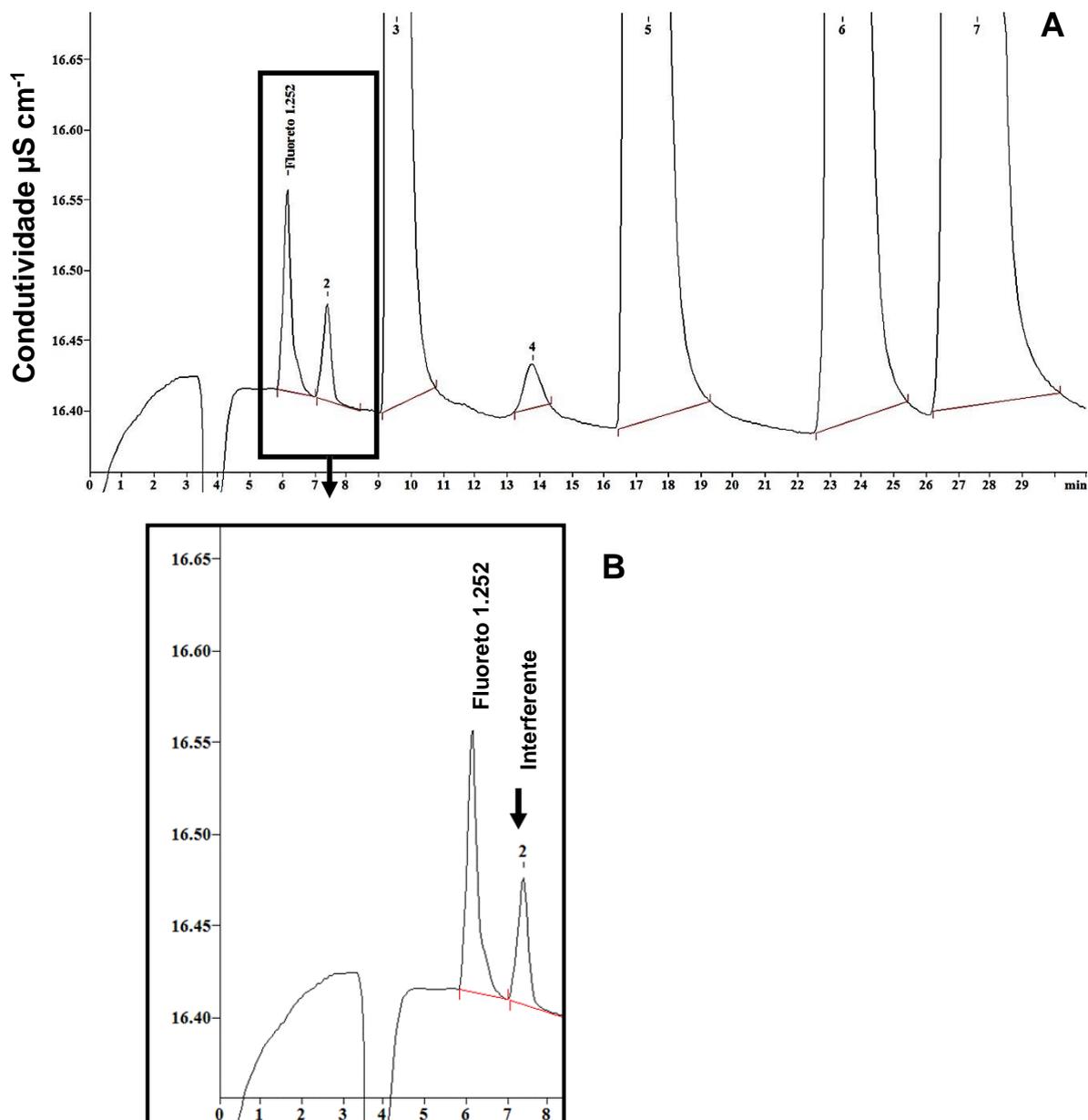
Como pode ser observado na Tab. 7, os LDs obtidos para Cl e S, por IC, foram de 42,6 e 39,2 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. É importante enfatizar que, em vista de terem sido elevadas as concentrações de Cl e S nas amostras, sempre foi possível quantificar as concentrações desses elementos nas mesmas. Além disso, os fatores de diluição (FDs entre 8 e 30 vezes) utilizados na determinação desses elementos por IC garantiram a quantificação dos mesmos sem a presença de interferentes. No entanto, tendo em vista que um estudo inicial (Fig. 19 A) demonstrou que se uma amostra for analisada sem nenhuma diluição a condutividade detectada, durante a análise, excede o valor máximo de trabalho permitido (65  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) para Cl (tempo de retenção,  $T_R$ , entre 9 e 10 min) e para  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $T_R$ , entre 26 e 29 min), foi considerado um FD de 5 vezes no cálculo do LD desses analitos para garantir que isso não ocorresse (Fig. 19 B).





**Figura 19** - Cromatograma referente a determinação de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{SO}_4^{2-}$  por IC sem diluir (A) e diluindo 5 vezes (B) a amostra, após decomposição de 350 mg de amostra + 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ).

No caso do F foi obtido um LD de 44,1 mg  $\text{kg}^{-1}$  por IC, sendo este obtido através de um estudo de interferência, visto que não foi possível quantificar este elemento na amostra utilizada para realizar a otimização do método. Na Fig. 20 é possível verificar que próximo ao pico de F, de  $T_R$  entre 6 e 7 min, um interferente estava sendo eluído no  $T_R$  entre 7 e 8 min, interferindo na resolução cromatográfica deste elemento.



**Figura 20** - Cromatograma obtido para a determinação de F por IC, após decomposição de 350 mg de amostra + 100  $\mu\text{l}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (6 mol  $\text{l}^{-1}$ ) (A) e ampliação da imagem A, referente aos picos de  $\text{F}^-$  e do interferente (B).

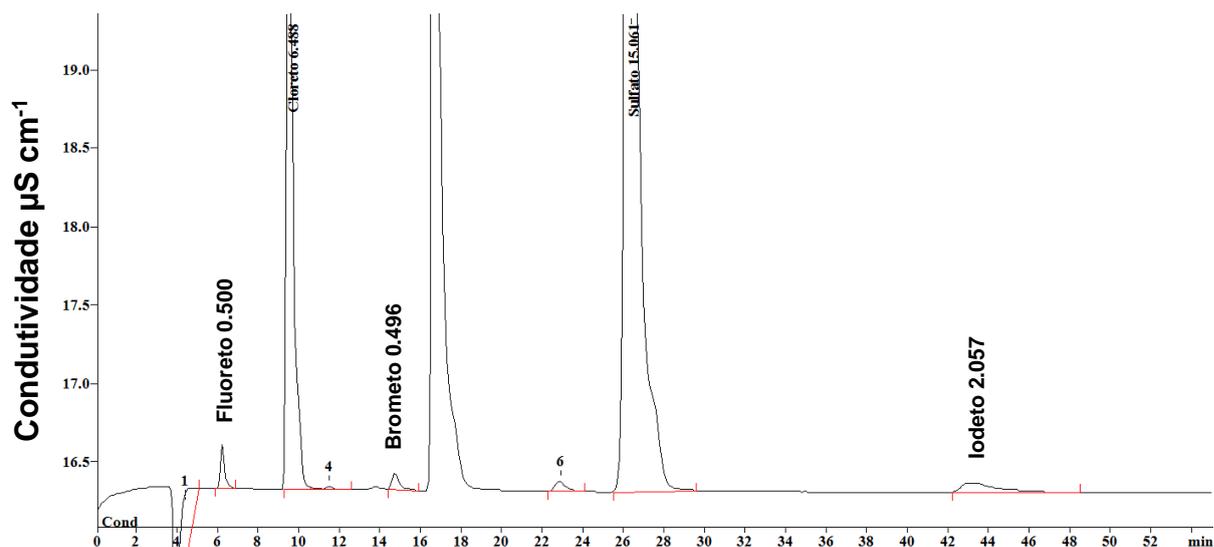
Com este estudo foi possível verificar, através da adição de 0,5  $\text{mg l}^{-1}$  de F nas soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  50  $\text{mmol l}^{-1}$  obtidas após a decomposição das amostras de ovo integral desidratado por MIC, que uma diluição de 20 vezes garantiu uma recuperação de 106% do analito. Diante disso, observou-se que com esta diluição a

interferência era reduzida significativamente e, desta forma, este fator de diluição foi considerado no cálculo do LD.

Com relação aos LDs obtidos, por ICP OES, para Cl ( $0,011 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e S ( $0,001 \text{ mg kg}^{-1}$ ), cabe mencionar que estes foram menores que os obtidos por IC, o que era esperado, uma vez que se tratam de técnicas com sensibilidades diferentes (MELLO *et al.*, 2013). Pereira *et al.* (2009) descrevem LDs de  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  para Cl e de  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  para S, para amostras de petróleo extra pesado preparado por MIC, com determinação por ICP OES (PEREIRA *et al.*, 2009).

Com relação aos LDs obtidos para Br ( $9,34 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e I ( $58,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por IC, pode-se verificar que estes foram consideravelmente maiores, quando comparado aos obtidos por extração alcalina ou por MIC com determinação por ICP-MS, o que, era esperado, visto que se tratam de técnicas de determinação com sensibilidade diferentes (MELLO *et al.*, 2013).

Ainda, sobre os LDs obtidos para Br, F e I, vale mencionar que estes foram calculados a partir de leituras do primeiro ponto da curva de calibração diluído, visto que a concentração dos mesmos não foi possível ser obtida através da leitura dos brancos. A diluição utilizada para cada elemento foi realizada considerando um fator de diluição anterior a verificação do ruído do equipamento. É importante enfatizar, conforme apresentado na Fig. 21, que adicionando uma concentração conhecida de Br, F e I numa amostra decomposta por MIC, absorvida em  $\text{NH}_4\text{OH } 50 \text{ mmol l}^{-1}$ , Br, F e I foram identificados, o que indica que a solução absorvedora foi adequada para estes elementos também para as determinações por IC.



**Figura 21** - Cromatograma obtido para a determinação de Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> por IC, após decomposição 350 mg de amostra + 100 µl NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (6 mol l<sup>-1</sup>) e adição de uma solução multielementar conhecida (F<sup>-</sup> e Br<sup>-</sup>: 0,5 mg l<sup>-1</sup>; I<sup>-</sup>: 2 mg l<sup>-1</sup>).

Apesar de até o momento a MIC não ter sido utilizada para o preparo de amostras alimentícias visando a posterior determinação de halogênios e S por IC, existem vários trabalhos na literatura que relataram o uso da MIC para decomposição de outras matrizes visando a determinação destes elementos por IC (BARIN *et al.*, 2014). Com relação aos trabalhos que avaliaram Br, Cl, F e I, de forma sequencial, são mencionados, para massas de amostras de aproximadamente 500 mg, LDs em torno de 2,5 mg kg<sup>-1</sup>, 0,95 mg kg<sup>-1</sup>, 0,30 mg kg<sup>-1</sup> e 2,7 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente (MESKO *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2010). Por sua vez, para S é relatado um LD de 8,0 mg kg<sup>-1</sup> para amostras de petróleo extra-pesado (500 mg) (PEREIRA *et al.*, 2009). Embora estes LDs sejam bastante inferiores aos obtidos neste trabalho, é importante ressaltar que a massa de amostra utilizada, o tipo de matriz, a solução absorvedora, as condições operacionais do cromatógrafo de íons, e, ainda, os fatores de diluição oriundos dos estudos de interferências para F, levados em consideração no cálculo do LD, influenciam consideravelmente nestes valores.

O limite de detecção obtido para Br e I após a extração alcalina assistida por radiação micro-ondas utilizando a solução de HTMA 0,11 mol l<sup>-1</sup> foi consideravelmente maior ao obtido para a solução de NH<sub>4</sub>OH 50 mmol l<sup>-1</sup>. Os

valores de LDs observados quando o HTMA foi utilizado estão diretamente relacionados com os valores de brancos obtidos, os quais foram elevados para Br ( $6,61 \mu\text{g l}^{-1}$ ) e I ( $0,989 \mu\text{g l}^{-1}$ ), o que indica que o reagente usado apresentou um grau de impureza significativo de Br e I. Isso pode estar associado, em parte, ao fato deste reagente ser de difícil purificação. Além disso, comparando os LDs obtidos para Br e I, por ICP-MS, após preparo por diferentes métodos, pode-se observar que os maiores LDs são para as amostras que foram preparadas utilizando o procedimento de extração, onde toda a matriz da amostra permaneceu presente nas soluções a serem analisadas, o que, por sua vez, ocasiona em teores de carbono dispersos em solução elevados, fazendo com que seja necessária a realização de diluições (de no mínimo 20 vezes) previamente as determinações.

Diferentemente do que foi observado para as extrações alcalinas, para a MIC, foram obtidos baixos LDs tanto para Br, quanto para I. Os baixos LDs obtidos para o método proposto estão diretamente relacionados ao fato de não ter sido necessária a realização de diluições nos digeridos previamente as análises, devido à eliminação da fração orgânica da amostra e o uso de soluções diluídas, o que ocasionou valores praticamente desprezíveis para os brancos (inferiores a  $0,420 \mu\text{g l}^{-1}$  para Br e  $0,248 \mu\text{g l}^{-1}$  para I). Na literatura, para amostras alimentícias, onde cerca de 500 mg foram decompostas por MIC, LDs para Br entre  $0,010$  e  $0,120 \text{ mg kg}^{-1}$  e para I entre  $0,0007$  e  $0,010 \text{ mg kg}^{-1}$ , considerando que os analitos foram absorvidos em soluções alcalinas diluídas e as determinações feitas por ICP-MS (MESKO *et al.*, 2010b; COSTA, 2013; HARTWIG *et al.*, 2014; MESKO *et al.*, 2014). Desta forma, pode-se constatar que os LDs obtidos para Br e I, neste trabalho, estão compreendidos na faixa de concentração reportada na literatura. Cabe destacar ainda que o LD obtido para I ( $0,015 \text{ mg kg}^{-1}$ ) no método otimizado é semelhante ao LD obtido para I ( $0,010 \text{ mg kg}^{-1}$ ) no trabalho desenvolvido por Gélinas, Iyengar e Barnes (1998), que prepararam amostras (200 - 500 mg) do RM NIST 8415 (*Whole Egg Powder*) por combustão em sistema aberto e dinâmico (Trace-O-Mat<sup>®</sup>), utilizando como solução absorvedora CFA-C 5% ( $v v^{-1}$ ) (GÉLINAS; IYENGAR; BARNES, 1998).

Por último, cabe salientar que o LD para Cl, por titulação potenciométrica, foi de  $79,0 \text{ mg kg}^{-1}$ , este valor foi obtido considerando uma gota (0,02 ml) da bureta utilizada para titular as amostras e uma diluição de 12 vezes, visto que com este volume foi obtido o ponto de equivalência para Cl.

### **Determinação de Br, Cl, F, I e S em Ovo Integral Desidratado e suas Frações (Clara e Gema) de Diferentes Origens**

O método proposto, que envolve a decomposição das amostras de ovo integral desidratado e suas frações por MIC para subsequente determinação de Cl, F e S por IC e Br e I por ICP-MS, foi aplicado a ovos integrais desidratados, claras e gemas desidratadas de diferentes origens. Além disso, a determinação de Cl, realizada pelo método recomendado pela AOAC, foi feita para uma amostra ovo integral, clara e gema. As amostras avaliadas, incluem, uma amostra oriunda de uma empresa do Rio Grande do Sul e duas amostras de empresas oriundas do estado de São Paulo, estas foram identificadas aleatoriamente como amostras A, B e C. Na Tab. 8 são mostradas as concentrações de Br, Cl, F, I e S obtidas nas diferentes amostras após a aplicação do método proposto (MIC-IC ou MIC-ICP-MS), bem como para a determinação de Cl pelo método recomendado pela AOAC.

**Tabela 8** - Concentração de Br, Cl, F, I e S nas diferentes amostras de ovo integral e suas frações (resultados expressos em mg kg<sup>-1</sup> ± desvio padrão, n=3).

	MIC-ICP-MS	MIC-IC	MIC-IC	MIC-ICP-MS	MIC-IC	AOAC
Amostra A	Br	Cl	F	I	S	Cl
Ovo integral	5,29 ± 0,21	6049 ± 242	< 44,1	0,660 ± 0,033	6767 ± 203	6045 ± 58
Clara de ovo	16,0 ± 0,6	14073 ± 563	< 44,1	0,150 ± 0,007	14555 ± 437	13967 ± 140
Gema de ovo	2,53 ± 0,10	3978 ± 159	< 44,1	1,47 ± 0,07	3898 ± 117	3861 ± 38
<b>Amostra B</b>						
Ovo integral	4,59 ± 0,18	5886 ± 235	< 44,1	1,60 ± 0,08	6248 ± 187	nd
Clara de ovo	7,10 ± 0,28	11127 ± 445	< 44,1	0,260 ± 0,013	13388 ± 401	nd
Gema de ovo	2,50 ± 0,10	3817 ± 153	< 44,1	1,30 ± 0,06	3741 ± 112	nd
<b>Amostra C</b>						
Ovo integral	5,19 ± 0,20	7284 ± 291	< 44,1	1,37 ± 0,07	7726 ± 232	nd
Clara de ovo	6,11 ± 0,24	13073 ± 522	< 44,1	0,190 ± 0,009	14043 ± 421	nd
Gema de ovo	2,86 ± 0,11	4136 ± 165	< 44,1	2,28 ± 0,11	4157 ± 125	nd

Com relação aos resultados apresentados na Tab. 8, pode-se perceber que a concentração de F em todos os ovos integrais desidratados, bem como em suas frações avaliadas está abaixo do LD do método desenvolvido. Adicionalmente, vale salientar que, até o presente momento, existe apenas um trabalho relatado na literatura que tenha determinado F, porém somente em pó de casca de ovo (SCHAAFSMA *et al.*, 2000). Em contrapartida, por meio do método proposto, foi possível determinar as concentrações de Br, Cl, I e S nas amostras de ovos e suas frações.

De acordo com os resultados, os minerais mais abundantes, bem como que apresentaram uma maior variação em relação à concentração foram o Cl (3978 a 14073 mg kg<sup>-1</sup>) e o S (3898 a 14555 mg kg<sup>-1</sup>). Possivelmente, isso encontra-se associado ao tipo de ração, criação e raça da poedeira (AQUINO *et al.*, 2008; CEDRO *et al.*, 2010; KOBLITZ, 2011). Cabe ressaltar que Cl e S estão entre os minerais considerados mais importantes nas rações de aves, visto que são adicionados em maiores quantidades em rações. Estes minerais possuem elevada relevância para o organismo de poedeiras, visto que participam de processos metabólicos, hormonais e/ou enzimáticos. Além disso, são importantes na manutenção do balanço ácido-básico (pH) do sangue, na pressão osmótica e balanço da água corporal (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Levando-se em consideração somente as concentrações obtidas nas frações de ovos, pode-se observar que Br, Cl e S encontram-se majoritariamente distribuídos na clara, enquanto o I é o único mineral que se encontra presente, predominantemente, na gema. Provavelmente, a constituição química de cada fração tenha uma considerável contribuição neste tipo de distribuição.

Segundo Koblitz (2011), uma fonte de S, presente na clara, é a proteína ovalbumina, a qual é constituída por grupos sulfidril (KOBLITZ, 2011). Neste sentido, cabe considerar que o Cl, além de presente na forma inorgânica, possivelmente está ligado a compostos orgânicos na clara, como, por exemplo, com algumas proteínas. Quanto ao I, vale ressaltar que este mineral é adicionado à ração na forma de um sal combinado a compostos orgânicos, o que indica que este analito esteja presente na forma de um mineral (ARAÚJO *et al.*, 2008). Além disso, considerando-se que por a gema possuir um considerável teor de proteína e de gordura, acredita-se que este possa também estar associado a um ou mais nutrientes.

Quanto ao Br e ao F, cabe mencionar que, embora não tenham sido encontrados trabalhos que associem esses minerais a rações de poedeiras e/ou ovos e suas frações, presume-se que o que foi discutido para os demais elementos sirva também para estes elementos.

Em relação aos resultados obtidos para Cl, pelo método oficial recomendado pela AOAC, vale ressaltar que a maior concentração deste elemento foi obtida na clara ( $13967 \pm 140 \text{ mg kg}^{-1}$ ), assim como ocorreu na determinação de Cl por IC e preparo das amostras por MIC. Em relação aos RSDs pode-se verificar que estes foram em torno a 1%. Quando comparado os resultados obtidos para Cl por MIC-IC com os verificados pelo método oficial, concordâncias em torno de 101% foram obtidas para as amostras de ovo integral desidratado, clara e gema avaliadas. Diante disso, além do procedimento MIC-IC ter tido sua exatidão comprovada através de ensaios de recuperação e avaliação do RM, a avaliação feita pelo método oficial da AOAC também comprovou que os resultados obtidos para Cl por MIC-IC são exatos.

Quando comparado os resultados obtidos para Br, Cl, F, I e S com o que é descrito na literatura para diferentes amostras, Rose *et al.* (2001) descrevem que ovos integrais apresentaram em torno de  $2,60 \text{ mg kg}^{-1}$  de Br, sem mencionar detalhes se estes eram frescos ou desidratados (ROSE *et al.*, 2001). Este relato é diferente das concentrações obtidas para Br (entre  $4,59$  e  $5,29 \text{ mg kg}^{-1}$ ) neste estudo para ovos integrais desidratados. Quanto a concentração de Cl, Zikovsky e Soliman (2002) mencionam que em ovos cozidos foi verificado uma concentração de Cl de cerca de  $1397 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que também foi inferior a faixa de concentração verificada para o Cl em ovos integrais ( $5886$  a  $7284 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (ZIKOVSKY e SOLIMAN, 2002). Neste caso, além de se tratar de uma amostra *in natura*, acredita-se que em função de os ovos terem sido cozidos, possivelmente, este mineral possa ter sido lixiviado durante processo de cocção. Por sua vez, em relação a concentração de F, o trabalho desenvolvido por Schaafsma *et al.* (2000) descrevem que em pó de casca de ovo foi verificado um teor em torno de  $3,75 \text{ mg kg}^{-1}$  deste elemento (SCHAAFSMA *et al.*, 2000).

Com relação as concentrações de I, mais estudos foram reportados na literatura para este mineral em ovos integrais e suas frações (ROSE *et al.*, 2001; ZIKOVSKY e SOLIMAN, 2002; DAHL *et al.*, 2003; HALDIMANN *et al.*, 2005; TRAVNICEK *et al.*, 2006; DUSOVÁ *et al.*, 2012). Em ovos integrais foi obtida uma

faixa de concentração para I de 0,450 a 1,63 mg kg<sup>-1</sup>. Para a clara de ovo foram descritas concentrações entre 0,219 e 1,66 mg kg<sup>-1</sup> de I, enquanto que para a gema de ovo foram citadas concentrações entre 0,900 e 1,41 mg kg<sup>-1</sup>. Neste trabalho, a faixa de concentração obtida para I em ovos integrais foi de 0,660 a 1,66 mg kg<sup>-1</sup>, e para a clara e gema de ovos foi entre 0,150 e 0,260 mg kg<sup>-1</sup> e 1,30 e 2,28 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Considerando-se que a maioria dos autores não mencionam se as amostras avaliadas eram desidratadas ou *in natura*, considera-se que os valores obtidos, para as diferentes amostras, foram relativamente semelhantes ao descritos na literatura.

Por último, para o S é mencionado uma concentração em torno de 28750 mg kg<sup>-1</sup> quando avaliado a membrana interna e externa da casca de ovos, bem como é relatado uma concentração de cerca de 2155 mg kg<sup>-1</sup> quando avaliado cutícula de ovos (WEDRAL; VADEHRA; BECKER, 1974). Cabe salientar que em ovos cozidos é relatada uma concentração menor que o LD do método descrito pelos autores (LD < 3000 mg kg<sup>-1</sup>) (ZIKOVSKY e SOLIMAN, 2002). Neste estudo, para ovos integrais desidratados foi verificada concentrações maiores do que a quantificada por Zikovsky e Soliman (2002).

Dentro desse contexto, tendo em vista as variadas concentrações obtidas, principalmente para Cl e S, nas amostras de ovo integral e suas frações, bem como pela relevância destes minerais para o organismo, torna-se imprescindível determinar a concentração destes elementos em ovos, claras e gemas. Especial atenção deve ser dada a determinação de Br, visto que este analito não apresenta função fisiológica totalmente conhecida, sendo verificado, principalmente, para clara de ovos uma apreciável variação na concentração deste elemento. Neste sentido, a MIC associada as técnicas por IC e por ICP-MS apresenta-se como um método apropriado para este objetivo.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos realizados foi possível desenvolver um método adequado para a determinação de Br, Cl, F, I e S em ovos integrais desidratados, bem como em suas frações. O método envolve a decomposição das amostras de ovo e suas frações por MIC e a determinação dos analitos por IC, ICP-MS ou ICP OES. Especial atenção deve ser dada a constituição química das amostras decompostas, visto que para cada fração do ovo uma massa de amostra distinta pode ser decomposta, sendo verificado que o teor de gordura foi o que mais contribuiu para limitar a massa de amostra decomposta por MIC.

Com relação aos métodos de extração, vale destacar que estes não se demonstraram adequados para a posterior determinação de Br e I em amostras de ovo integral, devido as extrações não terem ocorrido de forma homogênea e completa, bem como por estes analitos estarem presentes em baixas concentrações. Ademais, o conteúdo de carbono presente na solução extratora foi elevado, visto que praticamente toda a matéria orgânica presente na amostra foi dissolvida na solução, o que tornou o método baseado na extração também inadequado para a posterior determinação de Cl, F e S, por IC.

Sobre o método oficial recomendado pela AOAC, cabe mencionar que, embora ele apresente menor custo, por utilizar instrumentação relativamente barata, a titulação potenciométrica acaba sendo de baixa frequência analítica, quando comparada ao método desenvolvido (16 amostras por h). Ainda, pela AOAC é possível obter somente informações a cerca da concentração de Cl, visto que se trata de um método específico para este elemento. Ainda, o procedimento descrito pela AOAC envolve a utilização de mais reagentes e materiais, do que o método otimizado, o que, por consequência, aumenta a quantidade de resíduos gerados e a chance de ocorrerem erros sistemáticos.

Os resultados obtidos por IC e por ICP-MS após a decomposição das amostras de ovos e suas frações indicam que os teores de Cl e S foram os minerais que variaram mais pronunciadamente de uma fração para outra, sendo a clara a fração que mais contém estes elementos. Bromo e I foram obtidos em concentrações em nível traço, sendo verificado maiores concentrações de Br e I na clara e na gema, respectivamente.

A partir do trabalho desenvolvido, novos estudos podem ser realizados, visando a determinação de outros elementos, como, por exemplo, alguns metais. Com base no método proposto, poderiam ser avaliadas outras soluções absorvedoras que se adequem a absorção de metais. Para a determinação dos mesmos, a cromatografia de íons, o eletrodo íon seletivo, bem como a espectrometria por absorção atômica, seriam possibilidades a serem consideradas, visto que são técnicas viáveis de serem executadas na UFPel. Além disso, cabe enfatizar que além de ovos, claras e gemas desidratadas, seria interessante estender o estudo a cascas, frações *in natura* e ovos cozidos.

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 para este tipo de alimento. Ainda, cabe enfatizar que um estudo mais detalhado referente às concentrações de Br (mesmo em concentrações traço) nas amostras poderia ser feito, considerando que este elemento não apresenta função fisiológica totalmente conhecida para o organismo e, como pode ser observado, a concentração deste mineral variou consideravelmente na gema e no ovo integral e significativamente ( $p < 0,05$ ) para clara de ovo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALBERS, C. N.; JACOBSEN, O. S.; FLORES, E. M. M.; PEREIRA, J. S. F.; LAIER, T. Spatial variation in natural formation of chloroform in the soil of four coniferous forests. **Biogeochemistry**, v. 103, p. 317-334, 2011.

ANDERSON, Richard. **Sample Pretreatment and Separation**. Londres: Singapore, 1991. 106 p.

Anton Paar GmbH. **Multiwave 3000** - Microwave Reaction System. Graz: Anton Paar GmbH, 2006. 222 p.

AQUINO, J. S.; SILVA, J. A.; CALDAS, M. C. S.; MASCARENHAS, R. J. Avaliação centesimal e sensorial do macarrão massa fresca tipo espaguete elaborado com ovo desidratado de avestruz. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 3, p. 173-178, 2008.

AYADI, M. A.; KHEMAKHEM, M.; BELGITH, H.; ATTIA, H. Effect of moderate spray drying conditions on functionality of dried egg white and whole egg. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 6, p. 281-287, 2008.

BEAUCHEMIN, D. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 4786-4810, 2010.

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

CHEN, J. H.; WANG, K. E.; JIANG, S. J. Determination of iodine and bromine compounds in foodstuffs by CE-inductively coupled plasma MS. **Electrophoresis**, v. 28, n. 22, p. 4227-4232, 2007.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; SOUZA, K. L. O.; COSTA SOBRINHO, P. S.; LANDGRAF, M. DESTRO, M. T. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 618-622, 2005.

ARAÚJO, J. A.; DA SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; DE LIMA, M. R.; LIMA, C. B. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasílica**, Mossoró, v. 1, n. 3, p. 69-77, 2007.

ARAÚJO, J. A.; DA SILVA, J. H. V.; AMÂNCIO, A. L. L.; LIMA, C. B.; DE OLIVEIRA, E. R. A. Fontes de minerais para poedeiras. **Acta Veterinaria Brasílica**, Mossoró, v. 2, n. 3, p. 53-60, 2008.

ARIKAWA, Y.; SASAKI, A. Extraction and isotope measurement of sulfur in biological samples. **Analytical Sciences**, Japão, v. 3, n. 2, p. 157-160, 1987.

BARIN, Juliano Smanioto.; FLORES, Érico Marlon de Moraes.; KNAPP, Günter. Trends in sample preparation using combustion techniques. In: ARRUDA, Marco Aurélio Zezzi. **Sample preparation**. Nova York: Nova Science Publishers, 2006. p. 53-83.

BARIN, Juliano Smanioto.; FLORES, Érico Marlon de Moraes.; MESKO Márcia Foster.; MELLO, Paola de Azevedo.; PEREIRA, Juliana Cevero Fagundes. Microwave-induced combustion. In: FLORES, Érico Marlon de Moraes. **Microwave-assited sample preparation for trace element determination**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 143-177.

BARON, F.; BRIANDET, R.; LESNE, J.; HUMBERT, F.; ABLAIN, W.; GAUTIER, M. Influence of a Nonfavorable Environment, Egg White, on Resistance to Heat and Disinfectant, Adhesion, and Virulence of Salmonella Enteritidis. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 10, p. 2269-2273, 2004.

BARBOSA, J., T. P.; SANTOS, C. M. M.; BISPO, L. S.; LYRA, F. H.; DAVID, J. M.; KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M. Bromine, Chlorine, and Iodine Determination in

Soybean and its Products by ICP-MS After Digestion Using Microwave-Induced Combustion. **Food Analytical Methods**, Espanha, v. 6, p. 1065-1070, 2013.

BATISTA, B. L.; GROTTTO, 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**, Amsterdam, v. 646, n. 1, p. 23-29, 2009.

BELEVI, H.; MÖNCH, H. Simultaneous determination of fluorine, chlorine and sulfur in incinerator residues by oxidative high pressure digestion and ion chromatography. **Analisis**, Les Ulis, v.28, n. 10, p. 988-994, 2000.

BRASIL. Portaria nº 1, de 21 de fevereiro de 1990. Resolve Aprovar as Normas Gerais de Inspeção de Ovos e Derivados, propostas pela Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Secretaria De Inspeção De Produto Animal. Disponível em:  
<[http://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/PORTARIA%20MAPA%2001\\_90\\_normas%20gerais%20inspe%C3%A7%C3%A3o%20ovos%20e%20derivados.pdf](http://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/PORTARIA%20MAPA%2001_90_normas%20gerais%20inspe%C3%A7%C3%A3o%20ovos%20e%20derivados.pdf)>  
Acesso em: 20 dez. 2014.

BRASIL. Resolução nº 005, de 5 de Julho de 1991. Padrão de Identidade e Qualidade para o Ovo Integral. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Coordenação Geral De Inspeção De Produtos De Origem Animal. Disponível em: < <http://www.iberpharm.com.br/arquivos/RES05-05-07-1991.pdf>>  
Acesso em: 20 dez. 2014.

BLAKE, Joan Salge; MUNOZ, Katy; VOLPE, Stella. **Nutrition: From Science to You**. 1.ed. EUA: Benjamin Cummings , 2009. 936 p.

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**, Áustria, v.171, n. 1, p. 71-79, 2010.

CEDRO, T. M. M.; CALIXTO, L. F. L.; GASPAR, A.; HORA, A. S. Teores de ácidos graxos em ovos comerciais convencionais e modificados com ômega-3. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v. 39, n. 8, p. 1733-1739, 2010.

**CIAS** (Centro de Inteligência de Aves e Suínos) - **A produção de ovos no Brasil**. 2010. Disponível em:

<[http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com\\_content&view=article&id=15&Itemid=17](http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=15&Itemid=17)>. Acesso em: 04/01/2015

**Codex alimentarius**. International Food Standards. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

COETZEE, P. P.; TALJAARD, I. Determination of trace quantities of chloride in oil by ion chromatography. **South African Journal of Chemistry**, Durban, v. 43, p. 107-109, 1990.

COLLINS, Carol Hollingworth; BRAGA, Gilberto Leite; BONATO, Pierina Sueli. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452 p.

COSTA, Vanize Caldeira. **Desenvolvimento de métodos de preparo de amostra para a determinação de Br e I em mel por ICP-MS**. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

COZZOLINO, Silvia Maria Franciscato. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 4.ed. Barueri: Manole, 2012. 1368 p.

DAHL, L.; JOHANSSON, L.; JULSHAMN, K.; MELTZER, H. M. The iodine content of Norwegian foods and diets. **Public Health Nutrition**, London, v. 7, n. 4, p. 569-576, 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**, Amsterdam, v. 221, p. 158-165, 2006.

DONATO, Daniela Carolina Zanardo; GANDRA, Érica Rosendo de Sena; GARCIA, Paula Duarte Silva Rangel; DOS REIS, Carolina Barbosa Malek; GAMEIRO, Augusto Hauber. A questão da qualidade no sistema agroindustrial do ovo. In: 47º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 2009, Porto Alegre. **Anais eletrônicos...** Pirassununga: USP, 2009. Disponível em: < <http://www.sober.org.br/palestra/13/439.pdf>> Acesso em: 07 nov. 2014.

DUSOVÁ, H.; TRÁVNÍČEK, J.; PESKA, Z.; FALTA, D.; PÁLKA, V. Trace element content in market eggs in Bohemia. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, República Checa, v. LX, n. 6, p. 75-80, 2012.

EITH, Claudia et al. **Práticas em Cromatografia de Íons: Uma introdução**, 2.ed. Herisau: Monografia Metrohm, 2007. 142 p.

EVANS, R. B. Chlorine: state of the art. **Lung**, EUA, v. 183, n. 3, p.151-167, 2005.

FAO/WHO - Expert consultation on human vitamin and mineral requirements. 2.ed. Geneva: World Health Organization & Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004.

FECHER, P. A.; GOLDMANN, I.; NAGENGAST, A. Determination of iodine in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry after alkaline extraction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 13, p. 977-982, 1998.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G.; Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 62, n. 9, p. 1051-1064, 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**, Washington, v. 76, n. 13, p. 3526-3529, 2004.

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

GARCIA, E. R. M.; ORLANDI, C. C. B.; OLIVEIRA, C. A. L.; CRUZ, F. K.; SANTOS, T. M. B.; OTUTUMI, L. K. Qualidade de ovos de poedeiras semipesadas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção animal**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 505-518. 2010.

GÉLINAS, Y.; IYENGAR, G. V.; BARNES, R. M. Total iodine in nutritional and biological reference materials using neutron activation analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, Heidelberg, v. 362, p. 483-488, 1998.

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**, Amsterdam, v.98, n. 1, p. 62-65, 2011.

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological

samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, Amsterdam v. 79, n. 2, p. 396-401, 2009.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A.; Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configurations, **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 445, p. 269-275, 2001.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGT, M.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled-mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Amsterdam, v. 86, p. 42-49, 2013.

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

HARTWIG, Carla de Andrade. **Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a determinação de Br e I em camarão por ICP-MS**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Pelotas, 2011.

HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; CRIZEL, M. G.; MULLER, A. L. H.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Determination of bromine and iodine in shrimp and its parts by ICP-MS after decomposition using microwave-induced combustion. **Analytical Methods**, Reino Unido, v. 6, p. 7540-7546, 2014.

HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg: AOAC International. 2011.

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](http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf) > Acesso em: 18 dez. 2014.

JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. **Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry**. Glasgow: Blackie. 1992.

KESHANI, S.; WAN RAMLI WAN DAUDA; NOUROUZIC, M.M.; NAMVARD, F.; GHASEMI, M. Review: Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. **Journal of Food Engineering**, EUA, v. 146, p. 152-162, 2015.

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**, Heidelberg, v. 362, p. 508-513, 1998.

KOBLITZ, Maria Gabriela Bello. **Matérias-primas Alimentícias: Composição e Controle de Qualidade**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 301 p.

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

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of egg components for human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 8421-8431, 2005.

KRATOCHVIL, Byron George. Sampling and sample preparation for trace element analysis. In: MESTER, Zoltan.; STURGEON, Ralph Edward. **Sample preparation for trace element analysis**. 1.ed. Amsterdam: Elsevier, 2003. p.1-21.

KRUG, Francisco José. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1.ed. rev. Piracicaba: CENA/USP, 2010. 340 p.

MAGALHÃES, Carlos Emanuel de Carvalho; FLORES, Érico Marlon de Moraes; KRUG, Francisco José; BARIN, Juliano Smanioto; MESKO, Márcia Foster. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, Francisco José. **Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras**

orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1.ed. rev. Piracicaba: CENA/USP, 2010. p. 184-251.

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**, Amsterdam, v. 470, n. 2, p. 195-204, 2002.

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

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

MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; DUARTE, F. A.; BIZZI, C. A.; DIEHL, L. O.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 405, n. 24, p. 7615-7642, 2013.

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

MESKO, M. F.; PEREIRA, J. S.; MORAES, D. P.; BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; PANIZ, J. N.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G.; FLORES, E. M. M. Focused microwave-induced combustion: a new technique for sample digestion. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 82, n. 5, p. 2155-2160, 2010a.

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, 2010b.

MESKO, M. F.; TORALLES, I. G.; CRIZEL, M. G.; COSTA, V. C.; PIRES, N. R. X.; DE PEREIRA, C. M. P.; PICOLOTO, R. S.; MELLO, P. A. Determinação de bromo e iodo em alga marinha comestível por ICP-MS após decomposição por combustão iniciada por micro-ondas. **Química Nova**, São Paulo, v. 37, n. 6, p. 964-968, 2014.

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 Tobaccousing Microwave-Induced Combustion and Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 22, n. 9, p. 1649-1655, 2012a.

MÜLLER, A. L.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A.; DRESSLER, V. L.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Bromine and iodine determination in active pharmaceutical ingredients by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, Cambridge, v. 27, p. 1889-1894. 2012b.

MÜLLER, A. L. H.; PICOLOTO, R. S.; MELLO, P. A.; FERRÃO, M. F.; DOS SANTOS, M. F. P.; GUIMARÃES, R. C. L.; MÜLLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Total sulfur determination in residues of crude oil distillation using FT-IR/ATR and variable selection methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdam, v. 89, p. 82-87, 2012c.

NADKARNI, R. A.; POND, D. M. Applications of ion chromatography for determination of selected elements in coal and oil shale. **Analytical Chimica Acta**, Amsterdam, 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**, Washington, v. 57, n. 13, p. 2481-2486, 1985.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M. C.; SOUSA, R. A.; CADORE, S.; BARNES, R. M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media: a review. **Spectrochimica Acta Part B**, Amsterdam, v. 61, n. 5, 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**, São Paulo, v. 35, n. 7, p. 1299-1305, 2012.

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**, Amsterdam, v. 1213, n. 2, p. 249-252, 2008.

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

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

PEREIRA, J. S. F.; BIZZI, C. A.; SCHMIDT, L.; MESKO, M. F.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Evaluation of nitrates as igniters for microwave-induced combustion: understanding the mechanism of ignition. **RSC Advances**, Inglaterra, v. 5, p.9532-9538, 2015.

PIRES, Natanael Rodrigo Xavier. Estratégias no preparo de amostras para determinação de Br e Cl em polímeros oriundos de equipamentos elétricos e

eletrônicos. 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

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**, Cambridge, v. 13, p. 1101-1105, 1998.

PRYSTUPA, J. Fluorine – a current literature review. An NRC and ATSDR based review of safety standards for exposure to fluorine and fluorides. **Toxicology Mechanisms Methods**, EUA, v. 21, n. 2, p.103-170, 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**, Amsterdam, v. 1236, p. 161-176, 2012.

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

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

SCHAAFSMA, A.; PAKAN, I.; HOFSTEDE, G. J. H.; MUSKIET, F. A. J.; VAN DER VEER, E.; DE VRIES, P. J. F. Mineral, Amino Acid, and Hormonal Composition of Chicken Eggshell Powder and the Evaluation of its Use in Human Nutrition. **Poultry Science**, v. 79, p. 1833-1838, 2000.

SKOOG, Douglas A.; WEST, Donald M.; HOLLER, F. James.; CROUCH, Stanley R. **Fundamentals of Analytical**. 9.ed. USA: Cengage Learning, 2014. 1072 p.

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**, Abingdon, v. 41, n. 1, 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**, Amsterdam, v. 57, n. 12, p. 2195-2201, 2002.

SUCMAN, E.; BEDNAR, J. Determination of fluoride in plant material using microwave induced oxygen combustion. **Czech Journal of Food Sciences**, Praha, v. 30, p. 438-441, 2012.

SULCEK, Zdenek; POVONDRA, Pavel. **Methods of Decomposition in Inorganic Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 325 p.

TAGAMI, K.; UCHIDA, S.; TSUKADA, H.; TAKEDA, H. Determination of chlorine, bromine and iodine in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry after leaching with tetramethyl ammonium hydroxide under a mild temperature condition. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 570, n. 1, p. 88-92, 2006.

THOMAS, R. A. Beginner's guide to ICP-MS: Part III: The plasma source. **Spectroscopy**, v. 6, n. 16, p. 26-31, 2001a.

THOMAS, R. A. Beginner's guide to ICP-MS: Part IV: The interface region. **Spectroscopy**, v. 7, n. 16, p. 26-34, 2001b.

THOMAS, R. A. Beginner's guide to ICP-MS: Part VI: The mass analyzer. **Spectroscopy**, v. 10, n. 16, p. 44-49, 2001c.

TRAVNICEK, J.; KROUPOVA, V.; HERZIG, I.; KURSA, J. Iodine content in consumer hen eggs. **Veterinarni Medicina**, Praga, v. 51, n. 3, p. 93-100, 2006.

UBA (**União Brasileira de Avicultura**). 2011. Disponível em: <[www.uba.org.br](http://www.uba.org.br)>. Acesso em: 3 dez. 2014.

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**, Cambridge, v. 118, n. 8, p. 1015-1019, 1993.

VARGA, I. Iodine determination in dietary supplement products by TXRF and ICP-AES spectrometry. **Microchemical Journal**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 127-131, 2007.

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

WANG, C. Y.; ZHOU, Y. M.; YANG, W. Z. Fluoride electrode-coupled minicomputer for determination of fluoride in human hair. **Microchemical Journal**, v. 51, n. 3, p. 374-378, 1995.

WEDRAL, E. M.; VADEHRA, D. V.; BACKER, R. C. Chemical Composition of the cuticle, and inner and outer shell membranes from eggs of *Gallus Gallus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 47, n. 3, p. 631-640, 1974.

WHYATT R. M., RAUH V., BARR D. B., CAMANN D. E., ANDREWS H. F., GARFINKEL R., HOEPNER L. A., DIAZ D., DIETRICH J., REYES A., TANG D. L.,

KINNEY P. L., PERERA F. P. Prenatal insecticide exposures and birth weight and length among an urban minority cohort. **Environmental Health Perspectives**, EUA, v. 112, n. 10, p. 1125-1132, 2004.

WHO (World Health Organization). **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva: World Health Organization, 1996. 343 p.

WHO (World Health Organization). **Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination** - A guide for programme managers. Geneva: World Health Organization, 2007. 108 p.

ZIKOVSKY, L.; SOLIMAN, K. Neutron activation analysis of cheese, eggs, fish, fowl and meats. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 251, n. 3, p. 507-509, 2002.

Zambiasi, Rui Carlos. **Análise Físico Química de Alimentos**. 1.ed. Pelotas: UFPEL, 2010. 202 p.

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