



**FURG**

**Dissertação de Mestrado**

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM ALGAS  
COMESTÍVEIS EMPREGANDO A DISPERSÃO DA  
MATRIZ EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR VÓRTEX E  
DETECÇÃO POR CROMATOGRÁFIA DE ÍONS**

---

**Maiara Helena de Melo Malinowski**

**PPGQTA**

**Rio Grande, RS - Brasil**

**2020**

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM ALGAS  
COMESTÍVEIS EMPREGANDO A DISPERSÃO DA MATRIZ  
EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR VÓRTEX E DETECÇÃO  
POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS**

**por**

**MAIARA HELENA DE MELO MALINOWSKI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande (RS), como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2020

**Universidade Federal do Rio Grande - FURG**  
**Escola de Química e Alimentos**  
**Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental**

A comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**DETERMINAÇÃO DE HALOGÊNIO EM ALGAS COMESTÍVEIS EMPREGANDO  
A DISPERSÃO DA MATRIZ EM FASE SÓLIDA ASSISTIDA POR VÓRTEX E  
DETECÇÃO POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS**

Elaborado por

**Maiara Helena de Melo Malinowski**

Como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química Tecnológica e  
Ambiental

**Comissão Examinadora**



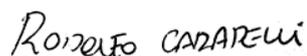
---

Prof. Dr. Bruno Meira Soares (FURG)  
(Presidente-Orientador)



---

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte (UFSM)



---

Prof. Dr. Rodolfo Carapelli (FURG)

Rio Grande, 26 de agosto de 2020.

## AGRADECIMENTOS

---

---

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por iluminar o meu caminho, por me dar força e sabedoria para seguir sempre em frente.

Agradeço aos amores da minha vida, a minha família. Minha Mãe Marta, meu pai Mário, meus irmãos Maira e Mateus e a minha linda e amada sobrinha Maria Isabella, por todo apoio, carinho e preocupação. Vocês são minha inspiração e motivação!

À minha avó Maria Amélia pelo exemplo de vida e pela preocupação.

Ao meu primo Jonas por todo apoio.

Ao meu amor e companheiro Luiz Gustavo, o presente de Deus na minha vida, pelo seu amor e carinho, pela ajuda e compreensão nos momentos difíceis, e pela motivação no alcance dos meus objetivos. Obrigada por me acolher em seus braços!

Agradeço ao meu orientador, o professor Dr. Bruno Meira Soares, primeiramente pela oportunidade, por confiar em mim no desenvolvimento deste trabalho, pela paciência e compreensão, pelos seus ensinamentos, esclarecendo minhas dúvidas, por compartilhar os seus conhecimentos, e ainda, por me tranquilizar, dizendo “tudo vai dar certo”.

Ao professor Dr. Ednei Gilberto Primel pela contribuição no desenvolvimento do trabalho, juntamente com todo pessoal do laboratório.

À professora Dr. Marlei Veiga dos Santos pelo exemplo e inspiração, pela oportunidade na iniciação científica, por todo conhecimento compartilhado na graduação, e principalmente por sua amizade e aporte inicial para ingressar nesta etapa.

Ao professor Dr. Rodolfo Carapelli e Dra. Sergiane Caldas Barbosa pela disposição em participar como membros da banca de qualificação, contribuindo com questionamentos e valiosas sugestões que foram importantes para o aprimoramento deste trabalho.

Aos professores Dr. Fábio Andrei Duarte e Dr. Rodolfo Carapelli pela disposição em participar como membros da banca de defesa na avaliação deste trabalho, compartilhando de seus riquíssimos saberes e contribuições.

À todos os colegas, que fizeram e que fazem parte do laboratório, as pessoas incríveis que conheci que me ajudaram com conselhos, ensinamentos, nos experimentos e que me proporcionaram muitos momentos de alegrias e descontrações, Karina, Liziane, Laísa, Cassiane, Júlia, Thomas, Marisa, Duane, Paula, Larissa, Luane, Jhony, Lucas, Caroline, Jean, Juliane, Paloma. Vocês fazem parte da minha história!

À Dra. Sergiane Caldas Barbosa que me recebeu muito bem no laboratório LACOM, pela disposição em me ajudar no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada pelos seus ensinamentos e por toda ajuda inicial e principalmente por me auxiliar no equipamento.

À Caroline pela disposição e pelos ensinamentos iniciais no equipamento.

À Marisa pela amizade, momentos de descontração, de estudos e aprendizagem. Por todo auxílio no desenvolvimento do trabalho, pelas suas importantes dicas e esclarecimentos das minhas dúvidas. Muito obrigada pela parceria.

À Duane por toda ajuda, amizade e pelos momentos de descontração.

À Paloma pela amizade, parceria e por todo auxílio no desenvolvimento do trabalho, principalmente nos momentos mais complicados. A sua ajuda foi de fundamental importância. Muito obrigada!

Ao Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais – LACOM e ao Laboratório de Eletroespectro Analítica – LEEA pelo espaço concedido para a realização das análises.

Ao Centro Integrado de análises – CIA/FURG, ao Centro de Microscopia Eletrônica da Região Sul – CEME-SUL/FURG, assim como ao Laboratório de Análise Químicas Industriais e Ambientais – LAQIA/UFSC, pelas colaborações no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande – FURG e ao programa de Pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental – PPGQTA - EQA por proporcionar a realização deste sonho e formação profissional, aos professores

pelos valiosos ensinamentos e aos funcionários por toda ajuda nos esclarecimentos de dúvidas.

A todos que de alguma forma contribuíram tanto direta quanto indiretamente para o desenvolvimento deste trabalho. O meu sincero agradecimento.

# SUMÁRIO

---



---

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	xiv
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 Algas</b> .....	3
2.1.1 Aspectos gerais .....	3
2.1.2 Composição química .....	4
2.1.3 Aplicações.....	6
<b>2.2. Halogênios</b> .....	8
2.2.1 Propriedades.....	8
2.2.2 Aspectos gerais, ocorrência e abundância .....	9
2.2.3 Saúde e metabolismo .....	11
2.2.3.1 Flúor .....	11
2.2.3.2 Cloro .....	12
2.2.3.3 Bromo .....	13
2.2.3.4 Iodo.....	13
<b>2.3 Técnicas analíticas empregadas na determinação de halogênios</b> .....	14
2.3.2 Cromatografia de íons .....	16
2.3.2.1 Histórico.....	16

2.3.2.2 Princípio básico .....	17
2.3.2.3 Sistema cromatográfico .....	18
<b>2.4 Preparo de amostras .....</b>	<b>22</b>
2.4.1 Métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios ...	23
2.4.1.1 Piroidrólise .....	23
2.4.1.2. Combustão .....	25
2.4.1.3 Extração alcalina .....	26
<b>2.5 Dispersão da matriz em fase sólida .....</b>	<b>36</b>
2.5.1 Princípios básicos .....	36
2.5.2 Modificações da MSPD.....	38
2.5.2.1 Dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex .....	38
2.5.2.2 MSPD e a Química Analítica Verde .....	40
2.5.2.2 Aplicações da MSPD .....	41
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Instrumentação .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Reagentes.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3 Descontaminação das vidrarias .....</b>	<b>45</b>
<b>3.4 Amostras .....</b>	<b>46</b>
3.4.1 Tratamento preliminar das amostras .....	46
3.4.2 Determinação do teor de cinzas .....	47
3.4.3 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	47
<b>3.5 Decomposição das amostras por MIC .....</b>	<b>48</b>
<b>3.6 Determinação de halogênios por ICP-MS e ISE .....</b>	<b>48</b>
<b>3.7 Extração dos halogênios empregando a VA-MSPD.....</b>	<b>49</b>
<b>3.8 Avaliação dos principais parâmetros da VA-MSPD.....</b>	<b>50</b>

3.8.1 Avaliação do tipo de suporte sólido .....	50
3.8.2 Avaliação do tipo de solução extratora .....	51
3.8.3 Avaliação da massa de suporte sólido.....	51
3.8.4 Avaliação do tempo de maceração .....	51
3.8.5 Avaliação da massa de amostra .....	52
<b>3.9 Descontaminação dos suportes sólidos .....</b>	<b>52</b>
<b>3.10 Determinação de halogênios por IC .....</b>	<b>52</b>
<b>3.11 Otimização da separação cromatográfica .....</b>	<b>53</b>
<b>3.12 Análise estatística.....</b>	<b>54</b>
<b>3.13 Validação do método.....</b>	<b>54</b>
3.13.1 Limite de detecção e quantificação .....	55
3.13.2 Linearidade .....	56
3.13.3 Efeito de matriz .....	56
3.13.4 Exatidão e precisão .....	57
3.13.5 Robustez.....	58
<b>3.14 Tratamento de resíduos .....</b>	<b>58</b>
<b>4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Tratamento preliminar das amostras .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Determinação do teor de cinzas .....</b>	<b>59</b>
<b>4.3 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Otimização da separação cromatográfica .....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Avaliação dos principais parâmetros da VA-MSPD .....</b>	<b>65</b>
4.5.1 Avaliação do tipo de suporte sólido .....	65
4.5.1.1 Descontaminação dos suportes sólidos .....	68
4.5.2 Avaliação do tipo de solução extratora .....	72

4.5.3 Avaliação da massa de suporte sólido.....	74
4.5.4 Avaliação do tempo de maceração .....	75
4.5.5 Avaliação da massa de amostra .....	76
<b>4.6 Validação do método.....</b>	<b>78</b>
4.6.1 Linearidade e efeito de matriz.....	78
4.6.2 Limite de detecção e quantificação .....	81
4.6.3 Exatidão e precisão .....	82
4.6.3.1 Análise dos CRMs .....	82
4.6.3.2 Comparação de métodos .....	83
4.6.3.3 Ensaio de recuperação .....	84
4.6.4 Determinação dos halogênios em amostras de algas .....	85
4.6.5 Robustez.....	86
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Algumas aplicações biotecnológicas das algas.....7
- Figura 2.** Esquema dos mecanismos da cromatografia iônica para a determinação de ânions e cátions. .... 18
- Figura 3.** Principais componentes de um cromatógrafo de íons..... 19
- Figura 4.** Esquema da MSPD original desenvolvida por Barker e colaboradores. ...37
- Figura 5.** MSPD modificada.....39
- Figura 6.** Cromatógrafo de íons utilizado na determinação dos halogênios. ....43
- Figura 7.** Esquema das etapas envolvidas na extração por VA-MSPD.....50
- Figura 8.** Amostras de alga trituradas (a) e após moagem e peneiramento (b).....59
- Figura 9.** Imagens obtidas por MEV para as amostras Nori (A), Kombu (B), Hijiki (C), Wakame (D); os suportes sólidos areia (E), alumina (F), concha de mexilhão (G), florisil (H) e terra diatomácea (I). ....61
- Figura 10.** Otimização da separação de F, Cl, Br e I por IC utilizando a fase móvel  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  1,0 mmol L<sup>-1</sup>. Condições: 0,25 g de amostra; 1,0 g de terra diatomácea (suporte sólido); 5 min de maceração; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup>, 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 – 150. ....63
- Figura 11.** Otimização da separação de F, Cl, Br e I por IC utilizando eluentes contendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  1,7 mmol L<sup>-1</sup> (A),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,7 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  2,55 mmol L<sup>-1</sup> (B) e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  3,4 mmol L<sup>-1</sup> (C). Condições: 0,25 g de amostra; 1,0 g de terra diatomácea como suporte sólido; 5 min de maceração; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.....64
- Figura 12.** Avaliação do tipo de suporte sólido representada pela intensidade de sinal relativo (ISR) (%) (n=3). As barras de erro representam o RSD (%). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de 100 µg g<sup>-1</sup> dos halogênios); 5 min de maceração; 1,0 g de suporte sólido; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.....66
- Figura 13.** Estudo da concentração de Cl após 5 limpezas para florisil (A) e areia (B) com água ultrapura (■);  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol L<sup>-1</sup> (■) e álcool etílico 20% (□). Condições: 10 g de florisil (A); 10 g de areia (B); 20 mL de água ultrapura;

$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 20 mL de 50 mmol L<sup>-1</sup>; 20 mL de álcool etílico 20%; 3 min de agitação em vórtex e centrifugação por 5 min a 6000 rpm. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.....69

**Figura 14.** Cromatogramas para areia (A) e florisil (C), ambos antes da descontaminação e para a areia (B) e florisil (D), após a descontaminação.....70

**Figura 15.** Recuperações dos halogênios utilizando areia e florisil como suporte sólido (n=3). As barras de erros representam o RSD(%). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de 2000 µg g<sup>-1</sup> dos halogênios); 5 min de maceração; 1,0 g de suporte sólido; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.....71

**Figura 16.** Recuperações dos halogênios utilizando como solução extratora água ( ■ );  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  1,0 mmol L<sup>-1</sup> ( ■ ) e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup> ( ■ ). As barras de erros representam o RSD(%) (n = 3). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de 2000 µg g<sup>-1</sup> dos halogênios); 1,0 g de areia; 5 min de maceração; 10 mL de solução extratora e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150. ....72

**Figura 17.** Recuperação dos halogênios utilizando diferentes massa de areia. As barras de erros representam o RSD(%) (n = 3). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de 1500 µg g<sup>-1</sup> de F, 2000 µg g<sup>-1</sup> de Cl, 250 µg g<sup>-1</sup> de Br e I); 5 min de maceração; 1,0 g de areia; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.....74

**Figura 18.** Recuperação dos halogênios utilizando 1 min ( ■ ), 3 min ( ■ ) e 5 min ( ■ ) de maceração. As barras de erros representam o RSD(%) (n=3). Condições: 0,1 g de amostra (com adição de 1500 µg g<sup>-1</sup> de F, 2000 µg g<sup>-1</sup> de Cl, 250 µg g<sup>-1</sup> de Br e I); 1,0 g de areia; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.....75

**Figura 19.** Recuperação dos halogênios utilizando 0,1 g de amostra ( ■ ) e 0,25 g de amostra ( ■ ). As barras de erro representam RSD(%) (n=3). Condições: amostra com adição de 1500 µg g<sup>-1</sup> de F, 2000 µg g<sup>-1</sup> de Cl, 250 µg g<sup>-1</sup> de Br e I; 5 min de maceração; 1,0 g de areia; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.....77

**Figura 20.** Fluxograma da VA-MSPD otimizada.....78

**Figura 21.** Curvas de calibração externa ( ■ ) e por adição de padrão ( ▲ ) para F, Cl, Br, I. Condições: 0,1 g de amostra; 1,0 g de areia; 5 min de maceração; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol L<sup>-1</sup> e 1 min de agitação em vórtex. coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250. ....79

## LISTA DE TABELAS

---

---

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas dos halogênios.....	9
<b>Tabela 2.</b> Métodos de preparo de amostra aplicados para a determinação de halogênios.....	27
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros operacionais para a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS.	48
<b>Tabela 4.</b> Condições instrumentais utilizadas para a determinação de F, Cl, Br e I por IC. ....	53
<b>Tabela 5.</b> Determinação do teor de cinzas (%) em amostras de algas e a comparação com trabalhos da literatura. ....	60
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros de regressão para as curvas de calibração externa e de adição de padrão.....	80
<b>Tabela 7.</b> Resultados determinados para o LOD e LOQ do instrumento e do método. ....	81
<b>Tabela 8.</b> Determinação dos halogênios por IC, após extração por VA-MSPD em CRMs (resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , n = 3) .....	82
<b>Tabela 9.</b> Estudo de comparação de métodos utilizando o método proposto (VA-MSPD/IC) para a determinação de F, Cl, Br e I e o método comparativo (MIC/ISE para F e MIC/ICP-MS para Cl, Br e I) (resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , n = 3).....	83
<b>Tabela 10.</b> Ensaio de recuperação com a determinação de halogênios por IC, após extração por MSPD (resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , n = 3).....	84
<b>Tabela 11.</b> Determinação de halogênios por IC, após extração por MSPD em amostras de algas comestíveis (resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, em $\mu\text{g g}^{-1}$ , n = 3). ....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

---

---

1. ACS, Sociedade Americana de Química, do inglês, *American Chemical Society*
2. AMS, Espectrometria de massa com acelerador, do inglês *Accelerator Mass Spectrometry*
3. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária
4. AOAC, Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*
5. CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
6. FAO, Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês, *Food and Agriculture Organization*
7. GAC, Química Analítica Verde, do inglês *Green Analytical Chemistry*
8. GC-FID, cromatografia a gás com detector de ionização em chama, do inglês, *gas chromatography with flame ionization detector*
9. GC-MS, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, do inglês *gas chromatography coupled to mass spectrometry*
10. LC-HG-AFS, cromatografia a líquido combinada com espectrometria de fluorescência atômica de geração de hidreto, do inglês *high-performance liquid chromatography combined with hydride generation atomic fluorescence spectrometry*
11. LC-ICP-MS, cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry*
12. LC-UV, cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta, do inglês *high performance liquid chromatography with ultravioleta detection*
13. HR-CS GF MAS, espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua com vaporização em forno de grafite, do inglês *high resolution-continuum source molecular absorption spectrometry graphite furnace molecular spectrometry*
14. IC, cromatografia de íons, do inglês *ion chromatography*

15. IC-CD, cromatografia de íons com detecção por condutividade, do inglês *ion chromatography with conductivity detection*
16. IC-CD-MS, cromatografia de íons com detecção por condutividade e espectrometria de massas, do inglês *ion chromatography with conductimetric and mass detection*
17. IC-MS, cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massas, do inglês *ion chromatography coupled to mass spectrometry*
18. IC-UV, cromatografia de íons com detecção ultravioleta, do inglês *ion chromatography with ultraviolet detection*
19. ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
20. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma-mass spectrometry*
21. INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
22. ISE, eletrodo íon seletivo, do inglês *ion selective electrode*
23. LC-MS/MS, cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas em tandem, do inglês *liquid chromatography tandem mass spectrometry*
24. LOD, limite de detecção, do inglês *limit of detection*
25. LOQ, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*
26. MAE, extração assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted extraction*
27. MEV, microscopia eletrônica de varredura
28. MIC, combustão iniciada por micro-ondas, do inglês *microwave-induced combustion*
29. MSPD, dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *matrix solid-phase dispersion*
30. NAA, análise por ativação neutrônica, do inglês *neutron activation analysis*
31. OMS, Organização Mundial da Saúde
32. PLE, Extração com líquido pressurizado, do inglês *pressurized liquid extraction*
33. SD, destilação a vapor, do inglês *steam distillation*
34. SPE, extração em fase sólida, do inglês *solid-phase extraction*
35. SS-HR-CS GF MAS, espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua com vaporização em forno de grafite com amostragem de sólidos, do inglês

*solid sampling-high resolution-continuum source molecular absorption spectrometry*  
*grafite furnace molecular spectrometry*

36. TMAH, hidróxido de tetrametilamônio, do inglês, *tetramethylammonium hydroxide*
37. TXRF, espectrometria de fluorescência de raios-X de reflexão total, do inglês *total reflection X-ray fluorescence spectrometry*
38. UAE, extração assistida por ultrassom, do inglês *ultrasound-assisted extraction*
39. UHPLC-UV, cromatografia a líquido de ultra alta performance acoplada ao detector por ultravioleta, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography with ultraviolet detection*
40. VA-MSPD, dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex, do inglês *vortex assisted-matrix solid-phase dispersion*

## RESUMO

---

---

**Título: Determinação de halogênios em algas comestíveis empregando a dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex e detecção por cromatografia de íons**

Autor: Maiara Helena de Melo Malinowski

Orientador: Prof. Dr. Bruno Meira Soares

Este estudo propõe, pela primeira vez, o desenvolvimento de um método analítico empregando a dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) combinada com a extração alcalina de halogênios (F, Cl, Br e I) em amostras de algas comestíveis para posterior determinação por cromatografia de íons (IC). O método proposto foi avaliado utilizando a alga Nori (*Porphyra* spp.) e foi aplicado em algas do tipo Wakame (*Undaria pinnatifida*), Kombu (*Laminaria ochroleuca*) e Hijiki (*Hizikia fusiformis*). Na VA-MSPD, foi utilizada uma solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol  $\text{L}^{-1}$  como solução extratora, 0,1 g de amostra, 1 g de areia e 5 min de maceração. O método foi linear dentro da faixa avaliada ( $R^2 > 0,99$ ) para todos os elementos e não foi observado efeito de matriz. Os limites de detecção (LOD) do método foram de 37, 36, 26 e 39  $\mu\text{g g}^{-1}$  para F, Cl, Br e I, respectivamente. A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação (entre 92 e 108%), através da aplicação do método em materiais de referência certificados de folhas de maçã (NIST 1515) e folhas de pêssigo (NIST 1547) (com concordâncias de 101% e 97% com os valores certificados, respectivamente) e através da comparação dos resultados com os obtidos por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) após combustão iniciada por micro-ondas (MIC), onde não foi verificada diferença significativa entre os resultados. O método proposto mostrou-se eficiente para a extração de halogênios em diferentes espécies de algas, apresentando vantagens como simplicidade e baixo custo, além do emprego de um material oriundo de fontes renováveis como suporte sólido (areia), contribuindo com os princípios da Química Analítica Verde.

Palavras-chave: Halogênios, algas comestíveis, VA-MSPD, cromatografia de íons.

## ABSTRACT

---

---

**Title: Determination of halogens in edible seaweed employing the vortex assisted-matrix solid-phase dispersion and detection by ion chromatography**

Author: Maiara Helena de Melo Malinowski

Advisor: Prof. Dr. Bruno Meira Soares

This study proposes, for the first time, the development of an analytical method using the vortex assisted matrix solid-phase dispersion (VA-MSPD) combined with alkaline extraction of halogens (F, Cl, Br and I) in edible algae for further determination by ion chromatography (IC). The proposed method was evaluated by using Nori seaweed (*Porphyra* spp.) and applied to Wakame (*Undaria pinnatifida*), Kombu (*Laminaria ochroleuca*) and Hijiki (*Hizikia fusiformis*) samples. In the VA-MSPD a solution of 50 mmol L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was used as extracting solution, 0.1 g of sample, 1 g of sand, and 5 min of maceration. The method was linear within the evaluated range ( $R^2 > 0.99$ ) for all elements and no matrix effect was observed. The detection limits (LOD) of the method were 37, 36, 26, and 39  $\mu\text{g g}^{-1}$  for F, Cl, Br, and I, respectively. The accuracy was evaluated by recovery tests (between 92 and 108%) and analysis of certified reference materials for apple leaves (NIST 1515) and peach leaves (NIST 1547) (with 101% and 97% agreement with the certified values, respectively). Comparing the results with those obtained by mass spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-MS) after microwave-induced combustion (MIC), no significant difference was found between the results. The proposed method proved to be efficient for the extraction of halogens in different algae species, showing advantages such as simplicity and low cost, combined to the use of a material from renewable sources as a solid support (sand), contributing to the principles of Green Analytical Chemistry.

Keywords: Halogens, edible seaweed, VA-MSPD, ion chromatography.

# 1. INTRODUÇÃO

---

As algas são organismos fotossintéticos que habitam diversos ambientes e desempenham uma série de papéis ecológicos, sendo objeto de pesquisas para uma gama de aplicações, desde remediação de águas residuais, produção de biocombustíveis, aplicações terapêuticas e na indústria de cosméticos (GULERI e TIWARI, 2020). Entre muitos aspectos, as algas são ideais para a nutrição humana, pois contêm especialmente minerais e vitaminas, além de proteínas, iodo e ácidos graxos poli-insaturados essenciais (PEREIRA, 2011; PEREIRA, 2020).

As algas fazem parte da dieta nutricional, sendo consumidas em diversos países. A importância de determinar halogênios em algas se deve pelo fato desses elementos apresentarem efeitos que podem ser essenciais à saúde humana, enquanto que concentrações elevadas podem causar efeitos adversos, ocasionando problemas à saúde. Diante da importância relacionada à determinação de halogênios em alimentos, técnicas de quantificação como a cromatografia de íons (IC) (RONDAN *et al.*, 2019), o eletrodo íon seletivo (ISE) (MENDES *et al.*, 2020), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (PICOLATO *et al.*, 2015), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (RONDAN *et al.*, 2018) e a espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua com vaporização em forno de grafite (HR-CS GF MAS) (MACHYŇÁK *et al.*, 2016) têm sido reportadas na literatura. Entretanto, a maioria destas técnicas necessita da aplicação de uma etapa de preparo de amostras para converter os halogênios em sua forma livre e eliminar possíveis interferências.

Os métodos de preparo de amostras nessas matrizes requerem a destruição da matéria orgânica com a decomposição completa da matriz ou a extração das espécies iônicas em uma fase aquosa (FRENZEL e MICHALSKI, 2016). Métodos de preparo de amostra empregando extração alcalina (CAO *et al.*, 2016), bomba de combustão, sistema *Trace O-mat*, frasco de Schöniger (MESKO, 2008), piroidrólise (TAFLIK *et al.*, 2012) e a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) (MESKO *et al.*,

2020) são alguns exemplos que têm sido empregados para a determinação de halogênios em alimentos. Entretanto, dependendo do método aplicado, algumas dificuldades podem ser observadas para a determinação de halogênios, como a perda dos analitos por volatilização e os riscos por contaminação (ANTES *et al.*, 2010). Além disso, alguns métodos necessitam de instrumentação específica de custo relativamente elevado.

A tendência da Química Analítica é o desenvolvimento de métodos simples, pouco morosos, que sejam capazes de reduzir o consumo de reagentes e que possuam um número reduzido de etapas (CAPRIOTTI *et al.*, 2015; WIANOWSKA e GIL, 2019). Nesse sentido, a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) pode ser uma alternativa interessante para ser utilizada como método de preparo de amostras visando a posterior determinação de halogênios. Suas características incluem simplicidade, custo relativamente baixo e robustez em comparação com outros métodos de preparo de amostras (CAPRIOTTI *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2016). Além disso, recentemente alguns estudos têm reportado a utilização de suportes sólidos verdes na MSPD, como materiais que estão disponíveis no ambiente, com eficiência comparável a suportes sólidos comerciais, possibilitando o isolamento seletivo de uma variedade de compostos em diferentes matrizes, incluindo tecidos de plantas e animais (WIANOWSKA e GIL, 2019). Suportes sólidos verdes, como quitosana, terra diatomácea e casca de mexilhão têm demonstrado eficiência para a extração de biocidas em amostras de peixes (VIEIRA *et al.*, 2018). A areia também é eficiente como suporte sólido alternativo para extrair pesticidas em amostras de frutas e vegetais (SANTOS *et al.*, 2019) e espécies de arsênio em frutos do mar (MOREDA-PIÑEIRO *et al.*, 2008).

Devido a essas características, a MSPD tem sido utilizada em um grande número de aplicações visando a determinação de compostos orgânicos. No entanto, poucos estudos têm sido reportados na literatura a respeito da aplicação da MSPD para extração de elementos, especialmente os halogênios. Portanto, este trabalho propõe, pela primeira vez, o desenvolvimento de um método analítico empregando a dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD) como método de preparo de amostras visando a determinação de F, Cl, Br e I em amostras de algas comestíveis por cromatografia de íons (IC).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

---

### 2.1 Algas

#### 2.1.1 Aspectos gerais

O termo “*algae*” aparece pela primeira vez em 1753, para designar uma categoria sistemática de plantas. Essa categoria reunia as algas, alguns líquens e briófitas. As algas constituem um grupo de organismos com ampla diversidade de formas, funções e estratégias de sobrevivência e que não tem origem monofilética. Podem ser classificadas como organismos fotossintéticos, que variam de unicelulares a pluricelulares. A ampla diversidade desses organismos inclui formas procarióticas, representadas pelas cianobactérias, bem como formas eucarióticas, englobando organismos autotróficos, heterotróficos e multicelulares (BICUDO e MENEZES, 2010).

As algas são encontradas em quase todos os lugares que possam lhes oferecer luz para a realização do processo de fotossíntese (EL GAMAL, 2010). São organismos predominantemente aquáticos, embora possam ser encontradas em ambientes tão diversificados como: areias do deserto, neve, troncos de árvores, pele de animais terrestres, paredes e solos úmidos. As algas aquáticas podem ocorrer em água doce, estuarina, marinha ou hipersalina. Algumas podem tolerar uma grande variação de salinidade e temperatura. Nestes ambientes aquáticos as algas são as principais produtoras de matéria orgânica (produtores primários), servindo de alimento aos consumidores primários (herbívoros) (GUERRA *et al.*, 2011).

As algas podem ser classificadas quanto ao tamanho em dois principais grupos, as microalgas (microscópicas) e as macroalgas (macroscópicas) (EL GAMAL, 2010; SASSO *et al.*, 2012; PEREIRA, 2016). As microalgas podem apresentar dimensões a partir de 3  $\mu\text{m}$  e as macroalgas podem atingir vários metros de comprimento.

O longo comprimento das macroalgas deve-se a algumas hastes presentes nessas algas que podem atingir até 65 m, além de exibir um alto grau de

complexidade e organização dos tecidos. Estas algas constituem a base da cadeia alimentar marinha sustentando várias comunidades de animais bentônicos (invertebrados, como alguns ouriços-do-mar e/ou gastrópodes e vertebrados como peixes herbívoros) e que também acabam encontrando refúgio de predadores. Em relação as microalgas, estas constituem o fitoplâncton, vivendo em águas superficiais e suspensas na coluna de água, restritas a zona eufótica e eventualmente formando a base da cadeia alimentar marinha (PEREIRA, 2016).

A coloração característica das algas é devido a combinação dos diferentes pigmentos fotossintéticos presentes nas células (MOURITSEN e MOURITSEN, 2013; PEREIRA, 2016). As macroalgas têm cores extremamente variadas, porém todas elas possuem clorofila. Esses pigmentos estão localizados nos cloroplastos e são responsáveis pela cor verde da maioria das plantas (PEREIRA, 2016). Embora a classificação das algas tenha evoluído, estas são classificadas como pertencentes a três grupos principais com base em sua pigmentação dominante: marrom (*Phaeophyceae*), verde (*Chlorophyta*) e vermelho (*Rhodophyta*) (MOURITSEN e MOURITSEN, 2013). As algas verdes têm pigmentos a base de clorofila a, b e carotenoides, enquanto que as algas vermelhas possuem clorofila, carotenoides e algumas ficobilinas. Já os pigmentos das algas marrons são compostos por clorofila a, c e carotenoides (PEREIRA, 2016).

### 2.1.2 Composição química

A composição das algas varia entre as espécies e também em resposta à fatores ambientais (BARBOT *et al.*, 2016). Entre esses fatores destacam-se a localização geográfica, temperatura da estação, salinidade, luz e nutrientes (YOGANANDHAM *et al.*, 2019; TURAN e CIRIK, 2018). Um exemplo da influência das mudanças sazonais na composição das algas pode ser observado nas macroalgas, que durante o período do verão produzem maiores quantidades de sólidos voláteis e açúcar, enquanto na primavera geram menos sólidos voláteis e mostram um maior teor de proteínas e minerais (BARBOT *et al.*, 2016).

As algas marinhas são abundantes em minerais, micronutrientes, vitaminas, proteínas, iodo e ácidos graxos poli-insaturados essenciais, bem como uma

abundância de fibras alimentares solúveis e insolúveis, com poucas calorias (PEREIRA, 2020). O conteúdo dos minerais pode chegar a 40%, as algas acumulam íons metálicos presentes na água salgada e concentram essas substâncias na forma de sais (YOGANANDHAM *et al.*, 2019). Conforme a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), as algas contribuem muito para o valor nutricional devido a sua rica composição de macronutrientes (Na, Ca, Mg, K, Cl, S e P) e de micronutrientes (I, Fe, Zn, Cu, Se, Mo, F, Mn, B, Ni e Co), além de vitaminas (B12, A e K). (FERDOUSE *et al.*, 2018).

No que se refere ao estudo do valor nutricional e funcionalidade das microalgas, destacam-se a cianobactéria *Spirulina* e as clorófitas *Dunaliella* e *Chlorella*. A *Spirulina* é utilizada como fonte de proteínas, pois possui todos os aminoácidos essenciais; o ácido gamalinolênico, um ácido graxo usado para tratar e prevenir a osteoporose, além da ficocianina, um corante natural utilizado em indústrias alimentícias e vitamina B12. A *Chlorella* é outra microalga rica em proteínas, sais minerais e vitaminas B, C, A e E e é utilizada também no tratamento de úlceras e como antioxidante para combater radicais livres. A *Dunaliella* é rica em  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A.

Apesar das suas propriedades benéficas, as algas também podem apresentar alguns aspectos negativos. O primeiro é que algumas algas ou os seus produtos são tóxicos para os animais, como é o caso de envenenamento de animais em cultivo pela cianofíceia *Microcystis*. A cianofíceia *Lyngbya* pode atuar como causadora de um tipo de dermatite de contato (GUERRA *et al.*, 2011). Outro fato que merece atenção é que as algas podem mudar a cor da água na medida em que crescem em abundância, o que pode prejudicar significativamente o uso recreativo dos sistemas aquáticos. As toxinas de algas verde-azuladas estão contidas nas células vivas e serão liberadas por decomposição celular. A eutrofização é uma preocupação fundamental no manejo de todos os corpos d'água e alguns estudos têm sido desenvolvidos em lagos, para prever os efeitos da carga de nutrientes na biomassa fitoplanctônica. A proliferação de algas verde-azuladas é um risco ambiental que prejudica a qualidade da água em lagos, reservatórios e rios (OMAR, 2010). Cabe destacar ainda que, a eutrofização dos corpos d'água cobertos por uma espessa massa de algas filamentosas, provoca uma barreira entre a água e a atmosfera, que

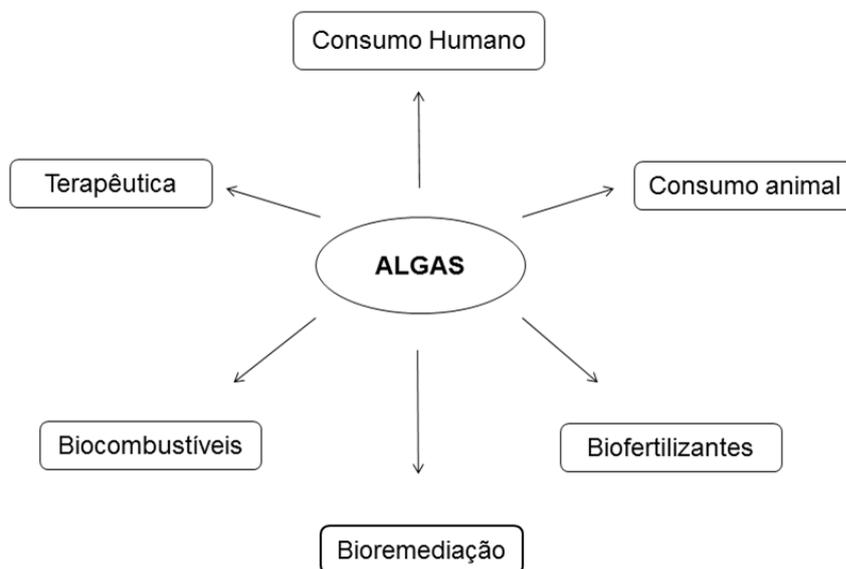
especialmente à noite, desenvolve uma condição anaeróbica provocando a morte de animais por falta de oxigênio (GUERRA *et al.*, 2011).

### 2.1.3 Aplicações

Os países asiáticos, especialmente a China e o Japão, são conhecidos por serem grandes consumidores de algas marinhas. No entanto, as algas passaram a ser utilizadas em uma diversidade de países com diferentes finalidades (LEANDRO; PEREIRA; GONÇALVES, 2020). Devido ao seu grande valor nutricional, as algas podem ser usadas, direta ou indiretamente, para nutrição humana e animal (gado) ou agricultura (biofertilizantes) (PEREIRA, 2016). Muitas espécies de algas, principalmente marrons e vermelhas são utilizadas na alimentação humana e uma das mais importantes é a *Porphyra spp.*, conhecida como Nori, sendo largamente cultivada para utilização na culinária oriental, especialmente no preparo de sushi e temaki (GUERRA *et al.*, 2011). Algumas das algas marrons utilizadas como alimentos são a Wakame, Kombu e Hijiki (SHANNON e ABU-GHANNAM, 2019). Para o consumo humano são utilizadas como suplemento nutricional, devido aos elevados teores de proteínas, polissacarídeos e conteúdo de vitaminas. Além disso, algumas espécies destacam-se por apresentar características econômicas de interesse para a indústria.

Dentre as diversas aplicações, destaca-se a sua utilização na indústria farmacêutica, pois algumas espécies produzem compostos bioativos como antioxidantes e antibióticos. Por serem organismos fotossintéticos e possuir clorofila, podem ser usadas como alimentos e em cosméticos (SIMÕES *et al.*, 2016). Além disso, outros estudos indicam o uso das algas para o fornecimento alternativo de energia renovável (ANSARI *et al.*, 2020; MO *et al.*, 2015; DASAN *et al.*, 2019). Estes organismos possuem óleos ou lipídios que podem ser extraídos e convertidos em biocombustíveis (SIMÕES *et al.*, 2016; ANSARI *et al.*, 2018). Algumas aplicações biotecnológicas das algas podem ser observadas na Figura 1.

**Figura 1.** Algumas aplicações biotecnológicas das algas.



As microalgas sofrem influência das variações nas condições ambientais (ROSSI *et al.*, 2020). Devido a este comportamento, é possível controlar a composição bioquímica e o crescimento de algas, com foco em compostos específicos e altas produtividades (CHOUDHARY *et al.*, 2020). A microrremediação é uma das aplicações de micro e macroalgas no tratamento de resíduos e águas residuais (PHANG *et al.*, 2015). O potencial de remediar águas residuais é devido ao seu mecanismo e estratégia de adaptação, podendo utilizar macro e micro nutrientes das águas residuais e assimilá-los em sua biomassa (MARELLA *et al.*, 2020). A biomassa por sua vez, pode ser utilizada como fonte de produção de biocombustíveis, cosméticos, produtos químicos, alimentos para humanos e animais, bem como gerar compostos de valor agregado (CHEW *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). Assim, as algas podem servir como indicador da qualidade da água e monitoramento ecológico para avaliar o status ambiental (OMAR, 2010), além de oferecer uma abundância de compostos bioativos que fornece potenciais bioquímicos e fisiológicos únicos. Um destes potenciais é o antienvhecimento, pois são ricas em concentração de caroteno e vitamina E, que auxiliam na prevenção do

câncer e no envelhecimento prematuro da pele, além da estimulação do sistema imunológico (GULERI e TIWARI, 2020).

## 2.2. Halogênios

### 2.2.1 Propriedades

Os halogênios são não metais pertencentes ao grupo 7 da tabela periódica. Cada átomo apresenta configuração eletrônica  $ns^2np^5$ , com um elétron a menos que o gás nobre subsequente. Os elementos deste grupo apresentam propriedades semelhantes entre si, mas mudam à medida que aumenta o número atômico (HOLMAN e STONE, 2001). A similaridade está relacionada com o arranjo de 7 elétrons na camada externa da estrutura atômica de cada um dos elementos do grupo. Em solução aquosa, os halogênios formam íons negativos simples, chamados de halogenetos. Esses íons formam facilmente compostos iônicos com praticamente todos os metais. Com exceção do flúor, os halogênios podem formar íons negativos poliatômicos ou complexos (HALKA e NORDSTROM, 2010).

A alta eletronegatividade é uma das principais características dos halogênios, sendo o flúor o elemento de maior eletronegatividade deste grupo (GREENWOOD e EARNSHAW, 2012). Devido à sua alta eletronegatividade, os átomos dos halogênios possuem uma alta afinidade eletrônica (HALKA e NORDSTROM, 2010). As principais propriedades dos halogênios estão descritas na Tabela 1.

Os halogênios formam moléculas diatômicas voláteis, nas quais as temperaturas de fusão ( $T_f$ ) e ebulição ( $T_e$ ) aumentam com o número atômico (LEE, 1999). O flúor é um gás que condensa em um líquido amarelo pálido ( $T_e = -187\text{ °C}$ ) e o cloro é um gás amarelo esverdeado ( $T_e = -35\text{ °C}$ ). Já o bromo apresenta-se como um líquido castanho-avermelhado ( $T_e = 59\text{ °C}$ ) que no estado gasoso adquire coloração alaranjada e o iodo é um sólido cinza-escuro, que sublima rapidamente sem se liquefazer, a pressão atmosférica e entra em ebulição a  $183\text{ °C}$  (RUSSEL, 1994). Os halogênios têm poucos isótopos que ocorrem naturalmente. O cloro possui dois isótopos naturais, o  $^{35}\text{Cl}$  (75,77%) e o  $^{37}\text{Cl}$  (24,23%), assim como o

bromo, com o  $^{79}\text{Br}$  (50,69%) e o  $^{81}\text{Br}$  (49,31%). O flúor ( $^{19}\text{F}$ ) e o iodo ( $^{127}\text{I}$ ) possuem apenas um isótopo natural.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas dos halogênios.

Propriedades	F	Cl	Br	I
Número atômico	9	17	35	53
Número de isótopos	1	2	2	1
Massa atômica (u)	19,00	35,45	79,90	126,9
Configuração eletrônica	$[\text{He}]2s^2 2p^5$	$[\text{Ne}]3s^2 3p^5$	$[\text{Ar}]3d^{10} 4s^2 4p^5$	$[\text{Kr}]4d^{10} 5s^2 5p^5$
Temperatura de fusão ( $^{\circ}\text{C}$ )	-223	-102	-7,3	114
Temperatura de ebulição ( $^{\circ}\text{C}$ )	-187	-35	59	183
Afinidade eletrônica ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	332,6	348,7	324,5	295,3
Energia de ionização ( $\text{kJ mol}^{-1}$ )	1680,6	1255,7	1142,7	1008,7
Eletronegatividade	4,1	2,8	2,7	2,2

### 2.2.2 Aspectos gerais, ocorrência e abundância

Os compostos contendo halogênios desempenharam um papel importante no desenvolvimento da química experimental e teórica. O nome "halogênio" foi introduzido por JSC Schweigger em 1811 para descrever a propriedade do cloro em combinar-se com metais para formar sais (GREENWOOD e EARNSHAW, 2012).

Devido à sua reatividade, os halogênios não ocorrem no estado elementar livre, mas são difundidos e abundantes na forma de seus íons (LEE, 1999; GREENWOOD e EARNSHAW, 2012; DOWNS e ADAMS, 2017). Contudo, são encontrados na crosta terrestre na forma de compostos, com exceção do astato (At) que é radioativo e tem meia vida curta. O F e o Cl são os elementos razoavelmente abundantes, enquanto que o Br e o I são relativamente raros (LEE, 1999).

O flúor é o 13º elemento em abundância nas rochas da crosta terrestre, ocorrendo em concentrações de aproximadamente  $544 \text{ mg kg}^{-1}$  (GREENWOOD e EARNSHAW, 2012). A principal fonte de F é um mineral conhecido como fluorita ( $\text{CaF}_2$ ). Entretanto, outro mineral bastante conhecido é a fluorapatita

[ $3(\text{Ca}(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaF}_2)$ ], amplamente utilizada como matéria-prima para obtenção de fósforo (LEE, 1999).

O cloro é o 20º elemento mais abundante nas rochas, ocorrendo na concentração de aproximadamente  $126 \text{ mg kg}^{-1}$ , enquanto que o bromo é o 46º, ocorrendo na concentração de aproximadamente  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (GREENWOOD e EARNSHAW, 2012). A maior fonte natural de Cl e Br é o mar, considerando que de 1 a 9% do Cl encontra-se na forma de cloreto de sódio (NaCl) e aproximadamente 0,0065% é a concentração de Br. As salmouras naturais são uma fonte significativa de Cl e a principal fonte de Br (DOWNS e ADAMS, 2017). O composto mais abundante a base de cloro é o NaCl, o qual parte é minerado como sal-gema (NaCl) acompanhado de KCl e de  $\text{MgCl}_2$ , e outra parte é obtida pela evaporação da água do mar ao sol. A água do mar contém em média aproximadamente 15000 ppm de NaCl (LEE, 1999). Por outro lado, a quantidade de fluoretos na água do mar é muito baixa, em torno de 1,2 ppm devido à grande concentração do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e à insolubilidade do fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ) (LEE, 1999; GREENWOOD e EARNSHAW, 2012).

O iodo também ocorre como iodato ( $\text{IO}_3^-$ ) e é o elemento consideravelmente menos abundante entre os halogênios, sendo o 60º em ordem de ocorrência, na concentração de aproximadamente 0,46 ppm nas rochas terrestres (GREENWOOD e EARNSHAW, 2012). Este elemento está presente na água do mar em pequenas concentrações ( $\sim 0,05 \text{ ppm}$ ), mas são absorvidos e bioacumulados pelas algas marinhas. As cinzas das algas marinhas foram a primeira fonte comercial de iodo, mas a descoberta de outras fontes, como as salmouras naturais com elevadas concentrações de íons iodeto ( $\text{I}^-$ ), tornou-se mais conveniente (LEE, 1999; DOWNS e ADAMS, 2017). Apesar de serem substituídas, as algas marinhas continuam sendo usadas para a obtenção de iodo no Japão. Adicionalmente, ostras, esponjas e alguns peixes também podem bioacumular iodo em seus sistemas. Os íons  $\text{I}^-$  e  $\text{IO}_3^-$  na água do mar entram no ciclo metabólico da maior parte da flora e fauna marinhas (DOWNS e ADAMS, 2017).

## 2.2.3 Saúde e metabolismo

### 2.2.3.1 Flúor

O íon fluoreto é um elemento crucial na nutrição humana (LA GUARDIA e GARRIGUES, 2015). A ingestão de fluoreto em baixas concentrações tem efeitos benéficos na redução da incidência de cárie dentária, fortalecendo o esmalte dos dentes. Para a prevenção de deficiências de flúor algumas ações de saúde pública incluem a utilização da fluoretação da água potável ou, quando isso não é possível, através da fluoretação do sal ou do leite e através do uso de produtos para cuidados dentários que contenham fluoreto (WHO, 2002; WHO, 2019). Na água potável, o flúor é considerado um componente benéfico em níveis de cerca de  $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ . No entanto, efeitos negativos também podem ser observados após exposição prolongada a altas concentrações de fluoreto, como danos ao sistema esquelético (fluorose esquelética), interferência na função renal, além de prejudicar o aprendizado e a memória (LA GUARDIA e GARRIGUES, 2015). O valor de referência para o flúor na água fluoretada não se deve exceder a concentração de  $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ , com base no risco de fluorose dentária e fluorose esquelética em níveis progressivamente mais altos de ingestão. Concentrações na faixa de  $1,5$  a  $4 \text{ mg L}^{-1}$  resultam em fluorose dentária, valores mais altos (entre  $4$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) podem causar fluorose esquelética (KRAWCZYK-CODA e STANISZ, 2017). A ingestão de concentrações iguais ou superiores a  $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$  corporal corresponde à dose provavelmente tóxica (BRASIL, 2009).

A água potável ainda é a principal fonte de ingestão desse elemento desde que a maioria dos alimentos possui baixas concentrações de flúor, com exceção de peixes marinhos, lagosta, caranguejo, camarão e alguns chás. A absorção de fluoreto presente em alimentos é cerca de 50 a 80% em comparação a absorção por ingestão de água potável. O fluoreto ingerido a partir de alimentos e água é absorvido eficientemente no estômago e no intestino delgado se não houver regulação. Se ingerido em grandes quantidades, o corpo pode ser submetido a intoxicação por fluoreto (LA GUARDIA e GARRIGUES, 2015).

### 2.2.3.2 Cloro

O cloreto é o principal constituinte da água do mar (SAIZ-LOPEZ e VON GLASOW, 2012). No corpo humano, o cloreto possui uma função reguladora do equilíbrio ácido-base, sendo um constituinte do ácido estomacal e um regulador do equilíbrio hídrico entre o sangue, o fluido tecidual e as células (ENSMINGER e ENSMINGER, 1993).

O cloreto é um constituinte normal do fluido extracelular (entre células) e não intracelular (dentro das células). No entanto, nos eritrócitos (glóbulos vermelhos), o cloreto atravessa a membrana celular rapidamente para estabelecer um equilíbrio entre o conteúdo celular e os fluidos extracelulares para ajudar a minimizar as trocas de fluidos. A capacidade do cloreto de passar rapidamente dos eritrócitos para o plasma sanguíneo (conhecido como desvio de cloreto) aumenta a capacidade do sangue de transportar grandes quantidades de dióxido de carbono aos pulmões. O cloreto também é necessário para a produção de ácido clorídrico pelo estômago. Esse ácido é necessário para a absorção adequada da vitamina B12 e ferro, para a ativação da enzima que decompõe o amido e para suprimir o crescimento de micro-organismos que entram no estômago com a alimentação (ENSMINGER e ENSMINGER, 1993). O conteúdo de cloreto no tecido humano é de  $1,1 \text{ g kg}^{-1}$  de peso corporal e a concentração plasmática varia de 98 a  $106 \text{ mmol L}^{-1}$  (BELITZ e GROSCH, 2013).

As doses diárias de Cl seguras e adequadas variam em função da idade, para crianças até 6 meses o valor recomendado é de 180 mg, de 6 meses até 1 ano, o recomendado é 300 mg, já para crianças e adolescentes de 1 até 18 anos o valor adequado varia na faixa de 350 até 750 mg. Para adultos acima de 18 anos o valor adequado é de 750 mg. Deficiências graves podem resultar em alcalose (excesso de álcalis no sangue), caracterizada por falta de ar, câimbras musculares, falta de apetite e, ocasionalmente, convulsões. É importante salientar, que o excesso de íons cloreto no organismo é improvável quando os rins estão funcionando adequadamente (ENSMINGER e ENSMINGER, 1993).

### 2.2.3.3 Bromo

O bromo tem um mecanismo de ação desconhecido. Este elemento é considerado não essencial para a saúde, pois acredita-se que, as espécies bromadas, especialmente o íon bromato,  $\text{BrO}_3^-$ , é cancerígeno (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2012).

A atuação do bromo no desempenho de qualquer função essencial em animais, plantas ou micro-organismos ainda não tem sido conclusivamente demonstrada (PAVELKA, 2012). Existem incertezas quanto ao papel fisiológico do bromo no corpo humano, pois não há consenso sobre a sua necessidade para manter uma boa nutrição ou uma vida saudável (DOLPHIN *et al.*, 2013), mas alguns estudos têm associado o excesso ou a deficiência desse elemento a distúrbios em humanos (MESKO *et al.*, 2016). No entanto, a organização mundial da saúde recomenda a ingestão de  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de bromo por dia (WHO, 2018).

Alguns estudos têm reportado a presença de Br em tecidos humanos de indivíduos que consomem alimentos marinhos em sua dieta, tendo em vista que o Br de origem marinha poderia entrar no corpo humano por diferentes vias. O consumo de alimentos de origem marinha, plantas e/ou animais terrestres que vivem nas proximidades de uma fonte marinha de Br, pode ser responsável pelos níveis elevados de Br nos tecidos humanos (DOLPHIN *et al.* 2013).

O brometo inorgânico ( $\text{Br}^-$ ) é a forma iônica do bromo, o qual pode exercer efeitos observados por alguma interferência na ação de outros halogênios, como o cloreto e iodeto. Na glândula tireoide, ao contrário de outros órgãos e tecidos, o comportamento biológico do brometo é mais semelhante ao comportamento biológico do iodeto, e não do cloreto (PAVELKA, 2012). O bromo pode reduzir a absorção de iodo pela tireoide, de modo a inibir competitivamente a absorção de iodeto pela glândula (PAVELKA, 2004; PAVELKA, 2009).

### 2.2.3.4 Iodo

O iodo é um micronutriente essencial para o organismo humano, sendo um componente fundamental dos hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina

(T4) (BRASIL, 2006; CARVALHO e DUPUY, 2017; LA GUARDIA e GARRIGUES, 2015). A maior concentração de iodo no corpo humano está presente na glândula tireoide, a qual contém de 70 a 80% do conteúdo total de iodo (de 15 a 20 mg) (WHO, 2019). As funções dos hormônios tireoidianos incluem o controle do crescimento, desenvolvimento e alguns processos metabólicos no corpo. Esses hormônios são necessários para o desenvolvimento físico e intelectual, o funcionamento dos músculos e tecidos nervosos, o sistema circulatório, a regulação do calor e da energia do corpo e o metabolismo de todos os nutrientes (LIMCHOOWONG *et al.*, 2017).

A ingestão de iodo recomendada pela OMS é de  $150 \mu\text{g dia}^{-1}$  para adultos e adolescentes a partir de 13 anos,  $200 \mu\text{g dia}^{-1}$  para mulheres durante a gravidez e lactação,  $120 \mu\text{g dia}^{-1}$  para crianças de 6 a 12 anos e  $90 \mu\text{g dia}^{-1}$  para crianças de 0 a 59 meses de idade (WHO, 2004; RISHER e KEITH, 2009).

A deficiência de iodo na nutrição humana resulta em distúrbios de deficiência de iodo (IDDs), como o hipotireoidismo, que ocorre quando a produção do hormônio pela tireoide está abaixo do normal. Por outro lado, um excesso de hormônios ocasiona o hipertireoidismo (WHO, 2004). A deficiência de iodo pode levar a várias anormalidades clínicas, incluindo retardo mental, surdez, crescimento atrofiado e problemas neurológicos (LIMCHOOWONG *et al.*, 2017).

O iodeto pode ser adicionado ao sal de cozinha ( $100 \mu\text{g}$  de iodeto de potássio por grama de cloreto de sódio) para garantir uma ingestão adequada de iodo (WHO, 2019). Entre os principais alimentos ricos em iodeto, destacam-se os alimentos de origem marinha como frutos do mar ( $200\text{-}1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e as algas marinhas ( $0,1\text{-}0,2\%$  em massa).

### **2.3 Técnicas analíticas empregadas na determinação de halogênios**

Entre as principais técnicas analíticas que têm sido empregadas para a determinação de halogênios em diferentes matrizes destacam-se as espectrométricas, as potenciométricas e as cromatográficas. Dentre os métodos existentes na literatura, a determinação pode ser realizada usando tanto a análise

direta da amostra sólida ou após o emprego de um método de preparo de amostras a fim de introduzir a amostra no instrumento na forma de solução.

Entre as técnicas de análise direta de amostras sólidas destacam-se a análise por ativação neutrônica (NAA) (HOU *et al.*, 1997; HOU e YAN, 1998; HOU *et al.*, 1998), a fluorescência de raios-X de reflexão total (TXRF) (DIMITRAKAKIS *et al.*, 2009; VANDER HOOGERSTRAETE *et al.*, 2014) e a espectrometria de absorção molecular de alta resolução com fonte contínua com vaporização em forno de grafite com amostragem de sólidos (SS-HR-CS GF MAS) (FLÓREZ e RESANO, 2013; BECHLIN *et al.*, 2017; CACHO *et al.*, 2018).

Entre as técnicas analíticas que demandam a análise da amostra na forma de solução destacam-se as titulométricas (KÜHN *et al.*, 1998), a potenciometria com eletrodo de íon-seletivo (ISE) (KÜHN *et al.*, 1998; GANJALI *et al.*, 2006; FLORES *et al.*, 2008; ANTES *et al.*, 2010; HOFMANN *et al.*, 2016; PICOLOTO *et al.*, 2019), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (HOU *et al.*, 1998; FLORES *et al.*, 2008; MESKO *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2010; ANTES *et al.*, 2010; MESKO *et al.*, 2014; HOFMANN *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2017), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (FLORES *et al.*, 2008; ANTES *et al.*, 2010; DRUZIAN *et al.*, 2019), a cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS) (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2012), a cromatografia a líquido de alta eficiência com detecção por ultravioleta (LC-UV) (NITSCHKE e STENGEL, 2015), a cromatografia de íons com detecção por condutividade (IC-CD) (KÜHN *et al.*, 1998; FLORES *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2008; HOFMANN *et al.*, 2016), além da cromatografia de íons com detecção por espectrometria de massa (IC-MS) (MESKO *et al.*, 2020). Técnicas como ICP OES, ICP-MS e SS-HR-CS GF MAS, são capazes de fornecer menores LODs quando comparadas com as técnicas cromatográficas, especialmente a IC. Entretanto, essas técnicas utilizam instrumentação de custo relativamente elevado quando comparada com a cromatografia de íons, que apresenta baixo custo de aquisição e manutenção e, dependendo da concentração dos analitos nas amostras, podem ser interessantes para a determinação de halogênios.

Neste sentido, a técnica de IC, em especial a IC-CD, é uma alternativa para a determinação de halogênios, apresentando algumas vantagens que incluem determinações simultâneas de íons, baixa quantidade de amostra necessária para a análise, a opção de vários modos de detecção, boa seletividade e sensibilidade (dependendo do sistema de detecção) (MICHALSKI *et al.*, 2020).

### 2.3.2 Cromatografia de íons

#### 2.3.2.1 Histórico

A cromatografia de íons é resultado da fusão de duas áreas de desenvolvimento da química: a cromatografia e a troca iônica. O trabalho de Adams e Holmes (1935) foi um marco importante, pois foram os primeiros a demonstrar a possibilidade de trocadores de íons baseados em polímeros orgânicos, a partir da reação de fenóis e derivados com formaldeído. Além dos avanços na separação, outro acontecimento importante para o sucesso da cromatografia foi o desenvolvimento simultâneo de detectores automatizados (SMALL, 2013). No entanto, haviam problemas de detecção para a análise de muitos íons inorgânicos devido à falta de um detector universal.

Após alguns anos, no final de 1971 foram iniciadas as primeiras pesquisas a fim de utilizar a detecção condutométrica como meio universal de quantificação de íons inorgânicos e orgânicos. Esse trabalho foi desenvolvido por Small, Stevens e Bauman, mas foi apenas em 1975 que o primeiro relatório da pesquisa foi divulgado pelos autores (SMALL, 2013). Nesta data, a cromatografia de íons foi introduzida como um novo método analítico, evoluindo de um esquema de detecção para alguns ânions e cátions inorgânicos para uma técnica analítica versátil capaz de determinar uma diversidade de espécies iônicas (WEISS, 2016).

A análise de íons inorgânicos utilizando a detecção por condutividade apresenta duas vantagens. A primeira é que todos os íons são eletricamente condutores, de modo que a detecção por condutividade é universal. A segunda é que esses detectores são relativamente simples de construir e operar (HADDAD *et al.*, 2003). Entretanto, a única limitação é a alta condutância dos eluentes, que foi

superada com uma coluna supressora posicionada após a coluna analítica trocadora de íons (SMALL, 2013; HADDAD *et al.*, 2003; SKOOG *et al.*, 2006).

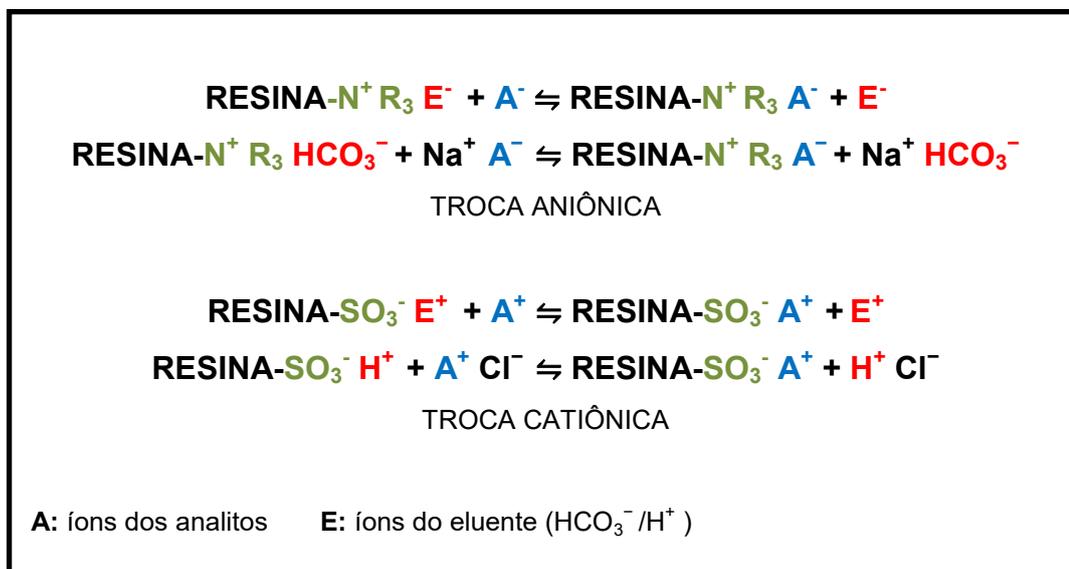
Ainda no início do ano de 1975, a Dow Chemical Company patenteou a nova técnica, concedendo a licença a Dionex Corporation para fabricar e comercializar o instrumento que ficou conhecido como cromatógrafo de íons e o primeiro cromatógrafo de íons foi apresentado no Simpósio da American Chemical Society (ACS) na cidade de Chicago (SMALL *et al.*, 1975; SMALL, 2013).

### 2.3.2.2 Princípio básico

A cromatografia de íons é uma subdivisão da cromatografia líquida (COLLINS, *et al.*, 2006). É uma técnica analítica utilizada para a separação e determinação de solutos iônicos por meio do equilíbrio de troca iônica (HADDAD e JACKSON, 1990). O princípio básico fundamenta-se no mecanismo de troca iônica, onde a retenção dos analitos é baseada na atração eletrostática reversível entre os íons presentes na fase móvel e os grupos funcionais ionizáveis de carga oposta presentes na fase estacionária (LANÇAS, 2009). Na Figura 2, pode ser visualizado um esquema com os mecanismos da cromatografia iônica para a determinação de ânions e cátions, respectivamente.

Os trocadores aniônicos normalmente são constituídos por grupos de amônio quaternário, enquanto que os trocadores catiônicos constituem grupos de ácido sulfônico (EITH *et al.*, 2006). Os trocadores catiônicos, com sítios carregados negativamente, são utilizados na separação de cátions, e os trocadores aniônicos, que têm sítios ativos carregados positivamente, são utilizados na separação de ânions. A fase móvel é, geralmente, uma solução iônica com propriedade tamponante, escolhida de forma a ser compatível com o tipo de trocador usado (COLLINS, 2006). Carbonato e/ou bicarbonato de sódio são os eluentes frequentemente utilizados para a separação de ânions, enquanto que ácidos minerais, como o ácido clorídrico é o eluente comumente utilizado na separação de cátions (PAULL e MICHALSKI, 2018), conforme representado na figura 2. O íon do eluente origina o contra-íon de carga oposta nas proximidades do grupo funcional, tornando as cargas eletricamente neutras (EITH *et al.*, 2006).

**Figura 2.** Esquema dos mecanismos da cromatografia iônica para a determinação de ânions e cátions.



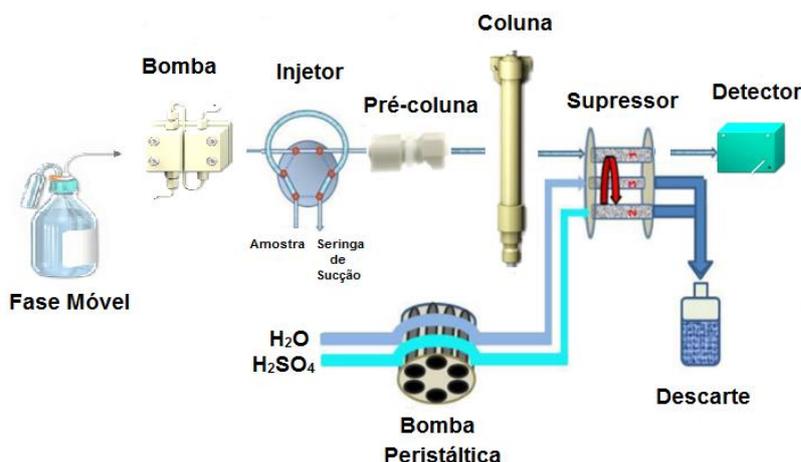
O processo de troca iônica ocorre na condição de equilíbrio, sendo a separação dos íons determinada por suas diferentes afinidades em relação aos grupos funcionais da fase estacionária (WEISS, 2016). Quando as amostras contêm dois ou mais íons a serem separados, estes substituem os íons do eluente, ficando retidos por um determinado tempo na carga fixa antes que sejam novamente trocados pelo íon do eluente, que por sua vez promove a eluição desses íons (EITH *et al.*, 2006). O íon presente na amostra que possuir menor afinidade pelo grupo funcional, se moverá mais rapidamente pela coluna, enquanto que o íon que possuir maior afinidade irá interagir de forma mais intensa com a fase estacionária, ficando mais tempo retido na coluna (FRITZ e GJERDE, 2009).

### 2.3.2.3 Sistema cromatográfico

A configuração básica do instrumento de cromatografia de íons é constituída, essencialmente, por um eluente (fase móvel), uma bomba de alta pressão, um amortecedor, um auto amostrador (válvula de injeção), uma pré-coluna (coluna guarda), uma coluna analítica, uma coluna supressora, um detector e um sistema de

processamento de dados (BHATTACHARYYA e ROHRER, 2012). Na Figura 3, estão demonstrados os principais componentes de um cromatógrafo de íons.

**Figura 3.** Principais componentes de um cromatógrafo de íons.



Fonte: Adaptado de Metrohm.

Na separação por troca iônica, o papel do eluente é competir pelos íons de interesse com os íons presentes na fase estacionária e separar a mistura dos íons de interesse em sinais bem definidos. O eluente usado na cromatografia de troca iônica geralmente consiste em uma solução aquosa de um sal adequado ou uma mistura de sais, com uma pequena porcentagem de solvente orgânico sendo às vezes adicionada. A mistura de sais pode ser uma solução tampão, ou um tampão separado pode ser adicionado ao eluente, se necessário (HADDAD e JACKSON, 1990). Uma grande variedade de critérios pode ser utilizada para a escolha de um sistema de eluição adequado. Algumas características importantes devem ser consideradas na escolha do eluente, como: compatibilidade com o sistema de detecção; natureza química e concentração do íon presente no eluente; pH; capacidade tamponante, bem como o conteúdo de solvente orgânico (modificadores) (HADDAD e JACKSON, 1990; EITH *et al.*, 2006).

A bomba impulsiona a fase móvel através do sistema cromatográfico (WEISS, 2016). Para obter resultados cromatográficos reproduzíveis, a bomba deve ser completamente inerte, robusta e capaz de fornecer elevada precisão e exatidão. Normalmente, são empregadas bombas de pistão único ou duplo. Um amortecedor

de pulso é usado para suavizar o pico de pressão no pico do ciclo de bombeamento e para fornecer um fluxo de eluente quando a bomba está recarregando. A vazão do eluente é geralmente controlada pelo motor da bomba velocidade, embora existam algumas bombas, onde a vazão é controlada pela distância do curso do pistão (FRITZ e GJERDE, 2009).

A válvula de injeção possui duas conexões até o “loop” por onde a amostra é injetada no sistema cromatográfico. A amostra é transportada para a coluna cromatográfica pela fase móvel, após a troca de posição da válvula de injeção (WEISS, 2016).

A coluna guarda ou pré-coluna é constituída pelo mesmo material da coluna cromatográfica e funciona como uma proteção para a coluna de cromatográfica contra a contaminação de amostras ou eluente, aumentando a durabilidade da coluna cromatográfica e praticamente não influencia do desempenho da separação (FORTI e ALCAIDE, 2012). Já a coluna cromatográfica é a parte mais importante do sistema cromatográfico, pois é onde ocorre a separação dos analitos. A escolha de uma fase estacionária adequada e as condições cromatográficas determinam a qualidade da análise (WEISS, 2016).

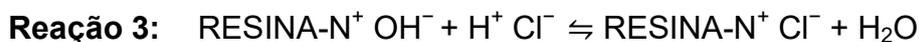
O sistema supressor tem como principal função reduzir quimicamente a alta condutividade de fundo dos eletrólitos no eluente e converter os íons presentes na amostra em uma forma mais condutora (WEISS, 2016). Este sistema aumenta a sensibilidade da técnica, aumentando a detectabilidade dos íons de interesse, por meio da conversão dos íons do eluente em espécies moleculares e os íons de interesse como ácidos ou bases que são monitorados utilizando um detector de condutividade.

Para a separação de ânions é utilizada uma coluna supressora com trocador catiônico na forma ácida, conforme representado pelas reações a seguir:



A coluna supressora remove os cátions presentes no eluente, trocando-os pelo íon  $\text{H}^+$ , e assim, neutralizando o íon  $\text{HCO}_3^-$ .  $\text{A}^-$  representa os íons de interesse

que tornam-se mais condutivos. Na separação de cátions é utilizada uma coluna supressora com trocador aniônico na forma básica, conforme representado pelas reações a seguir:



Para o mecanismo de troca para cátions, a coluna supressora remove os ânions presentes no eluente, trocando-os pelo íon  $\text{OH}^-$ , e assim, neutralizando o íon  $\text{H}^+$ .  $\text{A}^+$  representa os íons de interesse que tornam-se mais condutivos.

O detector é um dispositivo capaz de registrar a passagem, em fluxo, de um composto presente no eluente (FORTI e ALCAIDE, 2012). Assim, os analitos são detectados pelo sistema de detecção e podem ser quantificados. O desempenho do detector é avaliado de acordo com alguns critérios: linearidade, sensibilidade, resolução (volume da célula do detector), ruído (limite de detecção). O detector mais utilizado na cromatografia de íons é o detector de condutividade, usado com ou sem supressor (WEISS, 2016). Os detectores de condutividade apresentam muitas propriedades de um detector ideal. Eles podem ser altamente sensíveis, são universais para as espécies carregadas e, como regra, respondem de uma forma previsível às alterações na concentração. Além disso, esses detectores são de operação simples, de baixo custo de construção e de manutenção, fáceis de serem miniaturizados e, geralmente, operam por longos períodos sem necessitar de manutenção (SKOOG *et al.*, 2006). No entanto, outros tipos de detectores podem ser empregados, como os amperométricos e potenciométricos. Outras possibilidades incluem as detecções espectroscópicas, como a fotometria e a fluorescência (EITH, 2006). Além disso, recentemente tem sido empregada a cromatografia iônica com sistema de detecção compreendendo o detector condutimétrico e a detecção por espectrometria de massa no mesmo instrumento, na técnica de cromatografia de íons com detecção por condutividade e espectrometria de massas (IC-CD-MS) (MESKO *et al.*, 2020).

As vantagens mais importantes da cromatografia iônica são: uma ampla gama de aplicações; boa exatidão e precisão; hardware bem desenvolvido; muitas opções

de detecção; alta seletividade e eficiência de separação; boa tolerância às matrizes da amostra e baixo custo de operação. Além disso, é uma técnica amplamente aceita como método de referência padrão para vários analitos em diferentes matrizes (MICHALSKI, 2006, MICHALSKI, 2009; KOŃCZYK *et al.*, 2019). Entretanto, a IC é uma técnica que não possibilita a análise direta de amostras sólidas e necessita de um método de preparo de amostra prévio que seja eficiente, capaz de isolar os analitos de forma seletiva, visando a minimização de interferências durante a análise cromatográfica. A seguir, serão revisados os principais métodos de preparo de amostras que têm sido reportados na literatura para a determinação de halogênios em diferentes amostras.

## 2.4 Preparo de amostras

O preparo de amostra é uma etapa determinante em uma análise química, onde a amostra é submetida a um pré-tratamento adequado para posterior determinação por uma técnica analítica. Esta etapa é necessária para converter a amostra representativa, em uma forma possível de ser analisada para que os analitos possam ser determinados com exatidão e precisão (KRUG, 2010; HARRIS, 2008). O preparo da amostra apresenta alguns objetivos típicos, como a remoção de possíveis interferências, o isolamento do(s) analito(s), aumentando assim a seletividade do método e, quando possível, o aumento da concentração do(s) analito(s) em etapas de pré-concentração (FRENZEL e MICHALSKI, 2016). No entanto, qualquer que seja o método de preparo deve-se levar em consideração a natureza da amostra, do analito a ser determinado e a sua concentração, além da técnica de determinação e da precisão e exatidão desejadas (KRUG, 2010).

A preservação da amostra garante que esta mantenha as suas características físicas e químicas, para que a análise possa representar com fidelidade o objeto em estudo (MITRA e BRUKH, 2003). No que se refere à determinação de halogênios, a maioria das técnicas de determinação disponíveis necessitam que a amostra esteja na forma de solução para que os analitos possam ser detectados sem a presença de interferências (MELLO *et al.*, 2013; KRUG, 2010).

Não existe um método de preparo de amostras que seja universal. Geralmente, um método adequado deve ser eficiente, evitando erros sistemáticos provenientes de contaminação, perda por volatilização ou digestão incompleta, além de ser reprodutível, apresentar baixos limites de detecção, ser seguro e, sempre que possível, simples e rápido (KRUG, 2010). Entretanto, a perda dos analitos por volatilização e os riscos por contaminação são algumas dificuldades que podem ser observadas na determinação de halogênios (ANTES *et al.*, 2010). Estas dificuldades estão associadas à complexidade de muitas matrizes, como amostras biológicas, geológicas, medicamentos, alimentos, entre outras, onde os halogênios devem ser convertidos em uma forma química não volátil. Além disso, é importante observar que os reagentes utilizados no preparo também não devem interferir na etapa de determinação (MELLO, *et al.* 2013). Assim, os métodos de preparo de amostras que visam a determinação de halogênios requerem o completo isolamento das espécies de interesse, a partir da matriz.

#### 2.4.1 Métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios

Diversos métodos de preparo de amostras têm sido relatados na literatura visando a decomposição da matriz e dissolução dos halogênios em uma solução ou a sua extração a partir de diferentes tipos de amostras. Dentre os métodos mais utilizados para a determinação de halogênios, destacam-se a piroidrólise, os métodos de extração e os métodos a base de combustão. A seguir, estão descritos alguns dos principais métodos de preparo de amostras comumente aplicados para a posterior determinação de halogênios.

##### 2.4.1.1 Piroidrólise

A piroidrólise, também conhecida como hidrólise em alta temperatura é um método de preparo de amostras que tem sido amplamente utilizado para separar halogênios, boro e enxofre de matrizes sólidas, especialmente rochas minerais, carvão combustível e outras matrizes de difícil decomposição (MISHRA *et al.*, 2018). É considerado um método de preparo muito eficiente para a determinação de

halogênios, fornecendo soluções adequadas para a análise através de técnicas como ICP-MS, ICP OES e técnicas cromatográficas. A grande vantagem do método é a efetiva separação dos analitos a partir da matriz, minimizando possíveis interferências durante a etapa de determinação (MULLER *et al.*, 2016)

A piroidrolise baseia-se na formação de compostos voláteis presentes em uma amostra devido a hidrólise dos elementos, a altas temperaturas (na faixa de 900 a 1200 °C) e na presença de vapor d'água. A ação combinada de calor e vapor em altas temperaturas produz compostos voláteis dos analitos, que no caso dos halogênios, são convertidos em seus óxidos e subsequentemente em seus respectivos ácidos, sendo hidrolisados e carregados por um gás transportador que pode ser ar, oxigênio ou argônio até um condensador. Após a condensação, os analitos são absorvidos em uma solução adequada, podendo ser uma solução alcalina, no caso de halogênios. No entanto, a determinação de flúor não requer soluções alcalinas, e água pode ser usada ou mesmo nenhuma solução pode ser necessária (MELLO *et al.*, 2013). Esse método fornece uma solução quase isenta de reagentes e possui a capacidade de separar os analitos diretamente das amostras sólidas sem realizar a sua dissolução (MISHRA e JEYAKUMAR, 2018).

Na literatura, destacam-se alguns estudos com a aplicação da piroidrolise como método de preparo para posterior determinação de halogênios, como a determinação de fluoreto em carvão com determinação por ISE (DRESSLER *et al.*, 2003), a determinação de bromo e iodo em partículas transportadas pelo ar (PICOLOTO *et al.*, 2014) e em amostras de tecido e parede celular de alga *Laminaria digitata* (KÜPPER *et al.*, 2013) por ICP-MS. Em outros estudos foram determinados  $^{127}\text{I}$  e  $^{129}\text{I}$  em solos e amostras de farinha de trigo integral, algas e turfa com determinação por espectrometria de massa com acelerador (AMS) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (HEROD *et al.*, 2014), além da determinação de iodo usando cromatografia de íons com detecção ultravioleta (IC-UV) para análise de alimentos (SHINODA *et al.*, 2012).

#### 2.4.1.2. Combustão

Os métodos de decomposição por combustão podem ser classificados em sistemas abertos e fechados. A combustão realizada em sistemas abertos, como a combustão em forno tipo mufla apesar de ser relativamente simples, apresenta limitações, pois alguns elementos podem ser perdidos por volatilização (KRUG, 2010). A fim de evitar esse problema, os métodos de combustão realizados em sistemas fechados passaram a ser investigados, como a decomposição com frascos de Schöniger, o emprego das bombas de combustão e, recentemente, o método de preparo que combina a combustão em sistema fechado com o emprego da radiação micro-ondas, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) (MESKO *et al.*, 2016).

Os métodos de combustão usando frasco de Schöniger e a bomba de combustão, também apresentam algumas limitações, como baixa massa da amostra, baixo rendimento e segurança, assim como a indisponibilidade da etapa de refluxo. No entanto, todas as desvantagens citadas foram superadas com o desenvolvimento da MIC (MELLO *et al.*, 2013). O princípio básico da MIC envolve a combustão da amostra em frascos de quartzo fechados e pressurizados com oxigênio, onde a etapa de ignição é realizada através da interação da radiação micro-ondas com uma solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  (agente de ignição), a qual é adicionada em um disco de papel filtro posicionado na base de um suporte de quartzo. A amostra na forma de comprimido é colocada sobre o suporte e a combustão da amostra se dá após a irradiação das micro-ondas (KRUG, 2010; MELLO, *et al.*, 2013).

A MIC ganhou destaque e tem sido utilizada em muitos estudos para a determinação de halogênios, principalmente para a análise de alimentos, como pode ser observado no trabalho de Hartwig *et al.* (2014), os quais realizaram um estudo sistemático da decomposição de amostras de camarão e suas partes para a determinação de Br e I por ICP-MS. Da mesma forma, os elementos Br e I também foram determinados em amostras de mel por ICP-MS (COSTA *et al.*, 2015). O método também foi utilizado para a determinação de Br e I em plantas medicinais por ICP-MS (NASCIMENTO *et al.*, 2017), e para a determinação de F em amostras de frutos do mar por ISE (PICOLATO *et al.*, 2019). Mesko *et al.* (2014), utilizaram a

MIC para a determinação de Br e I em diferentes tipos de algas marinhas comestíveis por ICP-MS, mostrando que o método é adequado para a decomposição das amostras e dissolução dos analitos utilizando uma solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  150 mmol L<sup>-1</sup> como solução absorvedora (MESKO *et al.*, 2014).

#### 2.4.1.3 Extração alcalina

A extração é um método simples e eficiente que tem sido utilizado em diversas aplicações envolvendo a determinação de halogênios. Este método está baseado na extração utilizando soluções ácidas ou alcalinas, água ou solvente orgânico. No entanto, a maneira mais convencional no procedimento de extração para a determinação de halogênios, baseia-se no uso de soluções alcalinas. Entre estas, soluções de hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) e amina terciária solúvel em água (CFA-C) têm sido reportadas para a diluição ou dispersão da amostra em meio alcalino (MELLO *et al.*, 2013).

ROMARÍS-HORTAS *et al.* (2009), utilizaram o método de extração assistida por micro-ondas (MAE) para a determinação simultânea de bromo e iodo por ICP-MS em amostras de algas usando TMAH. Os autores avaliaram diferentes massas de amostra e combinações de volumes de TMAH para a extração de Br e iodo, permitindo o uso de grandes quantidades de amostra, possibilitando melhores limites de detecção. Porém, os métodos de extração não eliminam totalmente a matriz, apresentando elevados teores de carbono residual, o que pode ser um problema na determinação por técnicas espectrométricas a base de plasma como ICP-MS e ICP OES (KRUG, 2010).

Todos os métodos de preparo de amostras supracitados mostram-se eficientes para a determinação de halogênios em diversas matrizes e, principalmente, em amostras de algas. Na Tabela 2, estão apresentados alguns trabalhos descritos na literatura que fazem a determinação de halogênios.

**Tabela 2.** Métodos de preparo de amostra aplicados para a determinação de halogênios.

Amostras	Elementos (ou espécies)	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Limite de detecção (LOD)	Referência
<b>Algas</b>					
<i>Porphyra spp.</i> (Nori) <i>Palmaria</i> (Dulse) <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame) <i>Himanthalia elongata</i> (Espaguete do mar) <i>Laminaria ochroleuca</i> (Kombu) <i>Ulva Rigida</i> (Alface do mar)	Br e I	MAE (250 mg de amostra, 10 mL de água ultrapura e 10 mL de TMAH como solução extratora)	ICP-MS	I: 25 ng g <sup>-1</sup> Br: 20 ng g <sup>-1</sup>	ROMARÍS-HORTAS <i>et al.</i> , 2009
<i>Laminaria ochroleuca</i> (Kombu)	Br e I e espécies de arsênio e antimônio <sup>a</sup>	MSPD (massa de suporte sólido (areia ou sílica gel) e amostra não informado; 25 ml de água ou MeOH como solução extratora)	ICP-MS	Não informado	MOREDA-PIÑEIRO <i>et al.</i> , 2009
<i>Himanthalia elongata</i> (Espaguete do mar) <i>Laminaria saccharina</i> (Kombu doce) <i>Bifurcaria bifurcata</i> <i>Mastocarpus stellatus</i> <i>Gigartina pistillata</i>	F, Cl, Br e outros íons	Decomposição por via seca (500 mg de amostra, 50 mL de água como solução extratora)	IC-CD	F: 0,002 mg L <sup>-1</sup> Cl: 0,002 mg L <sup>-1</sup> Br: 0,006 mg L <sup>-1</sup>	GÓMEZ-ORDÓÑEZ <i>et al.</i> , 2010
<i>Himanthalia elongata</i>	Br e I	MAE (100 mg de amostra,	ICP-MS	Br: 19,9 ng g <sup>-1</sup>	ROMARÍS-HORTAS <i>et al.</i> ,

(Espaguete do mar) <i>Saccorhiza polyschides</i> (Furbelows) <i>Palmaria palmata</i> (Dulse) <i>Porphyra umbilicalis</i> (Nori) <i>Laminaria ochroleuca</i> (Kombu) <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame) <i>Himanthalia elongata</i> (Espaguete do mar) <i>Ulva rigida</i> (Alface marinha), <i>Spirulina platensis</i> (Spirulina)		10 mL de água ultrapura e 10 mL de TMAH como solução extratora)		I: 24,6 ng g <sup>-1</sup>	2011
<i>Himanthalia elongata</i> (espaguete do mar) <i>Saccorhiza polyschides</i> (Furbelows) <i>Palmaria palmata</i> (Dulse) <i>Porphyra umbilicalis</i> (Nori) <i>Laminaria ochroleuca</i> (Kombu) <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame) <i>Ulva rigida</i> (Alface marinha) <i>Spirulina platensis</i>	Br e I	MAE (100 mg de amostra, 10 mL de água ultrapura e 10 mL de TMAH como solução extratora)	IC-ICP-MS	Br: 83 ng g <sup>-1</sup> I: 2,3 ng g <sup>-1</sup>	ROMARÍS-HORTAS <i>et al.</i> , 2012
<i>Palmaria palmata</i> (Dulse) <i>Porphyra umbilicalis</i> (Nori) <i>Ulva rigida</i> (Alface marinha) <i>Laminaria ochroleuca</i> (Kombu)	I	MAE (0,2 g de amostra, 10 mL de água ultrapura e 10 mL de TMAH como solução extratora)	ICP-MS	24,6 ng g <sup>-1</sup>	ROMARÍS-HORTAS <i>et al.</i> , 2013

<i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame)					
<i>Laminaria digitate</i>	Br e I	Piroidrólise (100 mg de amostra, 500 mg de V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , 7 mL de uma solução contendo TMAH 0,5% e Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 0,005%)	ICP-MS	Não informado	KÜPPER <i>et al.</i> , 2013
<i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame) <i>Laminaria japônica</i> (Kombu) <i>Porphyra sp.</i> (Nori)	I e perclorato (ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> )	Extração (3 g de amostra com 12 µg L <sup>-1</sup> de padrão interno NaCl <sup>18</sup> O <sub>4</sub> e 20 mL de ácido acético 1%)	IC-MS/MS	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> : 0,07 µg kg <sup>-1</sup> I: Não informado	YANG <i>et al.</i> , 2014
<i>Porphyra spp.</i> (Nori) <i>Hizikia fusiforme</i> (Hijiki) <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame)	Br e I	MIC (500 mg de amostra, 6 mL de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 150 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 0,011 µg g <sup>-1</sup> I: 0,010 µg g <sup>-1</sup>	MESKO <i>et al.</i> , 2014
<i>Porphyra umbilicalis</i> (Nori)	I	MAE (100 mg de amostra, 10 mL de água ultrapura e 10 mL de TMAH como solução extratora)	ICP-MS	Não informado	ROMARÍS-HORTAS <i>et al.</i> , 2014
Várias espécies de macroalgas e microalgas	I	Decomposição por via seca (200 mg de amostra e 2,5 mL de água e CH <sub>3</sub> OH)	LC-UV	0,2 ng µL <sup>-1</sup>	NITSCHKE e STENGEL, 2015
Kelp <i>Porphyra spp.</i> (Nori) <i>Undaria Pinnatifida</i> (Wakame)	Iodeto de potássio (KI), 3-iodo-L-tirosina (MIT) e 3,5-diiodo-L-tirosina (DIT)	UAE <sup>b</sup> (0,5 g de amostra com 50 mL de água e 5 mL de HDTA 25% (m/m)) MSPD (50 mg de amostra e 50 mg de suporte sólido (SBA-15), 0,4 mL de IL [C12mim] Br 200 mmol L <sup>-1</sup> como solvente de eluição)	UHPLC-UV	KI: 3,7 ng mL <sup>-1</sup> MIT: 9,1 ng mL <sup>-1</sup> DIT: 16,7 ng mL <sup>-1</sup>	CAO <i>et al.</i> , 2016

<i>Sargassum muticum</i> <i>Undaria pinnatifida</i>	I	Digestão por via úmida (300 mg de amostra e 5 g de HNO <sub>3</sub> / HCl; digeridos diluídos com água e NH <sub>4</sub> SCN)	ICP-MS	3,9 mg kg <sup>-1</sup>	BADOCCO <i>et al.</i> , 2016
<i>Laminaria angustata</i> (Hidaka-Kombu) <i>Hizikia fusiforme</i> (Hijiki) <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame) <i>Laminaria japonica</i> (Kombu) <i>Porphyra spp.</i> (Nori)	Cl e S	MIC (550 mg de amostra, 6 mL de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 150 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	IC-CD	Cl: 11 mg kg <sup>-1</sup> S: 9,1 mg kg <sup>-1</sup>	COELHO JUNIOR <i>et al.</i> , 2017
<i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame) <i>Laminaria ochroleuca</i> (Kombu)	I	Decomposição por via seca (10-12 g de amostra dissolvidas em água; 25 mL de CHCl <sub>3</sub> , 5 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 5 mol L <sup>-1</sup> e 5 mL de peróxido de hidrogênio a 30% adicionados na matéria orgânica e titulados com Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N)	Titulometria de oxidação-redução	Não informado	GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2019
<b>Alimentos</b>					
Fígado bovino, amido de milho, leite em pó e farinha de trigo	I	MIC (500 mg de amostra e 6mL de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 50 mmol L <sup>-1</sup> ou 6mL de TMAH 56 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	0,0007 µg g <sup>-1</sup>	MESKO <i>et al.</i> , 2010
Suplemento mineral	F, Br e I	Piroidrólise (30-150 mg de amostra, 450 mg de	ISE e	Não informado	TAFLIK <i>et al.</i> , 2012

		V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , e 8mL divididos em dois frascos, um com 5 mL e outro com 3 mL de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub> 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS		
Soja e seus produtos	Cl, Br, e I	MIC (500 mg de amostra e 6mL de NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Cl: 1,25 µg g <sup>-1</sup> Br: 0,03 µg g <sup>-1</sup> I: 0,002 µg g <sup>-1</sup>	BARBOSA <i>et al.</i> , 2013
Camarão e suas partes	Br e I	MIC (500 mg de amostra e 6mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 0,12 µg g <sup>-1</sup> I: 0,001 µg g <sup>-1</sup>	HARTWIG <i>et al.</i> , 2014
Mel	Br e I	MIC (1000 mg de amostra e 6mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 34 ng g <sup>-1</sup> I: 6,0 ng g <sup>-1</sup>	COSTA <i>et al.</i> , 2015
Leite em pó	Br e I	MIC (700 mg de amostra e 6mL de NH <sub>4</sub> OH 25 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 0,007 µg g <sup>-1</sup> I: 0,003 µg g <sup>-1</sup>	PICOLOTO <i>et al.</i> , 2015
Camarão cru e cozido e suas partes (tecido e casca)	Br e I	MIC (500 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 0,02 µg g <sup>-1</sup> I: 0,01 µg g <sup>-1</sup>	MESKO <i>et al.</i> , 2016
Ovo em pó e frações (clara de ovo e gema de ovo)	Br, e I	MIC (350 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução	ICP-MS	Br: 0,039 µg g <sup>-1</sup> I: 0,015 µg g <sup>-1</sup>	TORALLES <i>et al.</i> , 2017

absorvedora)					
Farinhas	Br, e I	MIC (1000 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 25 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 7,6 ng g <sup>-1</sup> I: 0,76 ng g <sup>-1</sup>	SILVA <i>et al.</i> , 2017
Arroz	Br e I	MIC (1000 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Br: 0,004 mg kg <sup>-1</sup> I: 0,0008 mg kg <sup>-1</sup>	RONDAN <i>et al.</i> , 2018
Cereais e leguminosas	Cl e S	MIC (500 mg de amostra e 6 mL de água como solução absorvedora)	IC-CD	Cl: 10 mg kg <sup>-1</sup> S: 9 mg kg <sup>-1</sup>	RONDAN <i>et al.</i> , 2019
Ovo em pó integral e frações (clara de ovo em pó e gema de ovo em pó)	F, Cl, Br, I e S	MIC (350 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	IC-CD-MS	F: 4,9 mg kg <sup>-1</sup> Cl: 16,1 mg kg <sup>-1</sup> Br: 1,5 mg kg <sup>-1</sup> I: 0,12 mg kg <sup>-1</sup> S: 3,9 mg kg <sup>-1</sup>	MESKO <i>et al.</i> , 2020
Farinhas com e sem glúten	Cl e S	MIC (1000 mg de amostra e 6 mL de água como solução absorvedora)	IC-CD	Não informado	MESKO <i>et al.</i> , 2020
Mel	F, Cl, Br, I e S	MIC (800 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	IC-CD-MS	F: 1,3 mg kg <sup>-1</sup> Cl: 15 mg kg <sup>-1</sup> Br: 0,21 mg kg <sup>-1</sup> I: 0,067 mg kg <sup>-1</sup> S: 6,9 mg kg <sup>-1</sup>	MESKO <i>et al.</i> , 2020

---

**Outras amostras**

Argila	F, Cl, Br e I	Piroidrólise (2000 mg de amostra, 2g de V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , e Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /NaHCO <sub>3</sub> 5,4/5,1 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	IC-CD	F: 0,030 µg g <sup>-1</sup> Cl: 0,043 µg g <sup>-1</sup> Br: 0,09 µg g <sup>-1</sup> I: 0,13 µg g <sup>-1</sup>	PENG e WU, 2013
Cimento	F e Cl	MIC (100 mg de amostra e 6 mL de água como solução absorvedora)	ISE e IC-CD	F: 18 mg kg <sup>-1</sup> para IC-CD e 47 mg kg <sup>-1</sup> para ISE Cl: 99 mg kg <sup>-1</sup> para IC-CD e 165 mg kg <sup>-1</sup> para ISE	PEREIRA <i>et al.</i> , 2016
Solo	F, Cl, Br e I	MIC (100 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 25 ou 100 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	IC-CD e ICP-MS	Não informado	PEREIRA <i>et al.</i> , 2017
Plantas medicinais	Br e I	MIC (1000 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ICP-MS	Não informado	NASCIMENTO <i>et al.</i> , 2017
Plantas	I	MAE (150 mg de amostra e 2 mL de TMAH e 10 mL de água (1:5), como solução extratora)	ICP-MS	3-20 ng g <sup>-1</sup>	JERŠE <i>et al.</i> , 2018
Solos e plantas	Br e alguns metais	MIC (300 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 50 mmol L <sup>-1</sup> como solução	ICP-MS	Não informado	COUTO <i>et al.</i> , 2018

---

absorvedora)					
Cabelo Humano	F, Cl, Br, I e S	MIC (300 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>4</sub> OH 100 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	IC-MS e ICP-MS	Não informado	MESKO <i>et al.</i> , 2019
Concentrados de cobre	F e Cl	SD <sup>c</sup> (600 mg de amostra e 10 mL de NaOH 0,1 M)	IC-CD	Cl: 0,5 µg L <sup>-1</sup> F: 0,2 µg L <sup>-1</sup>	MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2020
Plantas medicinais	F	MIC (1000 mg de amostra e 6 mL de NH <sub>3</sub> 25 mmol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora)	ISE	0,75 µg g <sup>-1</sup>	MENDES <i>et al.</i> , 2020

<sup>a</sup> Espécies de arsênio determinadas por LC-ICP-MS e espécies de Sb determinadas por LC-HG-AFS.

<sup>b</sup> UAE, extração assistida por ultrassom.

<sup>c</sup> SD, destilação a vapor.

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos sobre a determinação de halogênios em diferentes tipos de alimentos e em diversos materiais, contudo, ainda são poucos os trabalhos envolvendo a determinação de halogênios em amostras de algas. Percebe-se que entre os halogênios, o I é o elemento de grande destaque, seguido do Br e pouca informação tem sido reportada a respeito da concentração de F e Cl em algas. Em relação aos métodos de preparo de amostras, a decomposição por via seca e a extração por MAE tem sido comumente aplicada para a determinação de halogênios em amostras de algas, enquanto que a piroidrólise e a MSPD tem sido pouco investigadas para essas amostras. Outros trabalhos têm abordado principalmente a MIC como método de preparo de amostras para alimentos.

A maioria dos métodos de preparo de amostras, como alguns métodos de decomposição e métodos de extração, são eficientes, ou seja, capazes de fornecer recuperações quantitativas dos halogênios. Além disso, alguns métodos como a MIC são métodos com operação relativamente simples. Entretanto, é importante salientar algumas desvantagens como a possibilidade de perda dos halogênios e risco de contaminação na decomposição por via seca em forno tipo mufla, a baixa frequência analítica e a insegurança dos métodos como os frascos de Schöniger e bomba de combustão, além dos cuidados que devem ser observados em relação as temperaturas do reator e do gerador de vapor na piroidrólise, assim como a necessidade de utilização de instrumentação de custo relativamente elevado como os fornos micro-ondas, como no caso da MAE e da MIC (KRUG, 2010).

Cabe destacar que o preparo de amostra ainda é uma etapa crítica nos procedimentos analíticos, além de ser considerada uma das etapas mais relevantes e morosas em uma análise. São desejáveis métodos que sejam simples, de baixo custo, rápidos, que empreguem pequenas quantidades de solventes, além de solventes cada vez menos tóxicos e, principalmente, que sejam compatíveis com as técnicas de determinação (MITRA e BRUKH, 2003). Em virtude disso, inúmeros esforços têm sido realizados para melhorar o desempenho analítico, desenvolvendo e otimizando novos métodos de preparo de amostra.

Neste sentido, um dos métodos simples e eficientes que atualmente tem atraído a atenção dos pesquisadores, especialmente no contexto de sua aplicação

para a extração de compostos orgânicos, é a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD). A escolha de um sorvente (ou suporte sólido) apropriado na MSPD fornece a possibilidade de isolamento seletivo de compostos a partir de várias matrizes, incluindo amostras como tecidos de plantas e animais (WIANOWSKA e GIL, 2019). Além disso, a MSPD apresenta vantagens por ser um método eficiente, simples, de baixo custo, relativamente rápido e ambientalmente amigável (SANTOS *et al.*, 2019).

## **2.5 Dispersão da matriz em fase sólida**

### **2.5.1 Princípios básicos**

A MSPD foi introduzida por Barker *et al.* (1989), como uma nova abordagem para o isolamento de drogas e seus metabólitos em tecidos (músculo bovino), a fim de eliminar as dificuldades apresentadas pela complexidade da matriz, contendo quantidades significativas de tecidos, proteínas, lipídios entre outros componentes. Desde então, a técnica vem ganhando destaque na comunidade científica para extração/isolamento de compostos em diversas matrizes.

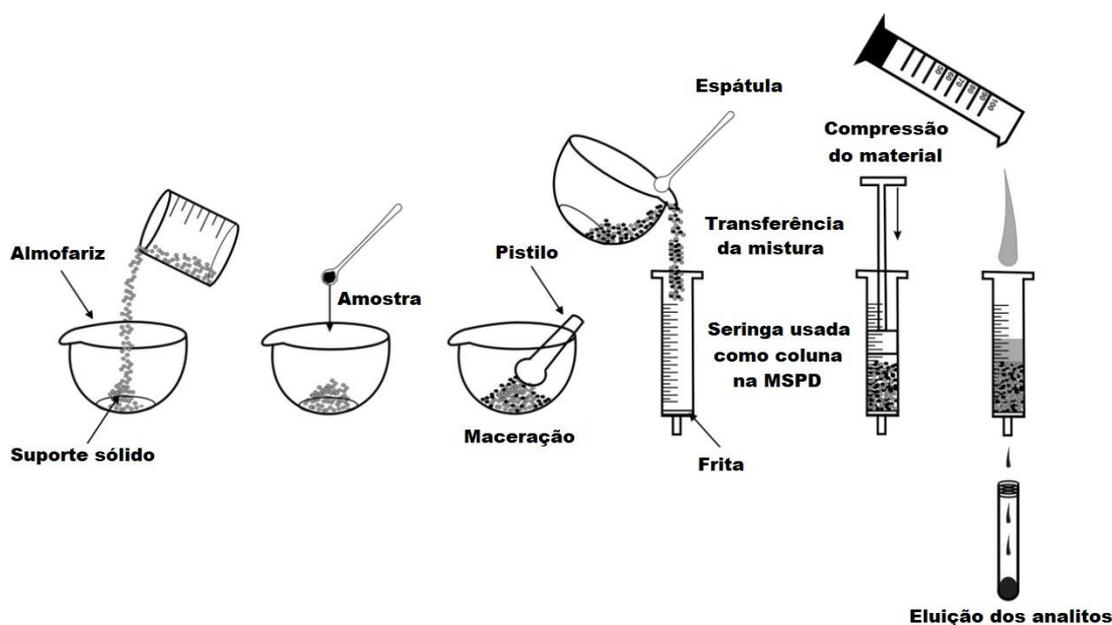
O princípio básico da MSPD baseia-se na mistura de uma amostra viscosa, sólida ou semissólida com um sólido (suporte sólido) de característica abrasiva em sua superfície, como suportes sólidos à base de sílica ou o seu derivado funcionalizado com grupos octadecilsilano (C18). Estes suportes sólidos são os mesmos utilizados em cartuchos empregados na extração em fase sólida (SPE), mas com funcionalidades diferentes. Na SPE, estes materiais são aplicados para adsorção dos analitos presentes em amostras líquidas. Por outro lado, na MSPD, o suporte sólido é macerado juntamente com a amostra para facilitar a liberação dos analitos (BARKER, 2000; BARKER, 2007).

Uma característica importante da MSPD consiste na força mecânica utilizada durante a maceração da amostra juntamente com o suporte sólido. Esta maceração pode ser realizada com auxílio de almofariz (gral) e pistilo de porcelana, ágata ou vidro, com o objetivo de promover a ruptura da estrutura física da amostra e a dispersão dos componentes em partículas de menor tamanho, diminuindo deste

modo, a interação entre o analito e os demais constituintes da amostra (WIANOWSKA e GIL, 2019).

A dispersão é realizada por um tempo suficiente para que ocorra a completa homogeneização e, assim, a amostra e o suporte sólido formam uma mistura, que é empacotada em uma coluna vazia (seringas ou cartuchos de SPE), na qual é colocada uma frita (filtro de polietileno) antes e após o empacotamento (CALDAS *et al.*, 2013). A última etapa consiste na eluição dos analitos sob vácuo (alternativamente o solvente é evaporado para concentrar os analitos) (WIANOWSKA e GIL, 2019). Na Figura 4, estão representadas as etapas envolvidas na MSPD original.

**Figura 4.** Esquema da MSPD original desenvolvida por Barker e colaboradores.



Fonte: Adaptado de (WIANOWSKA e GIL, 2019).

Na etapa de eluição da MSPD os analitos podem ficar retidos no cartucho enquanto os demais constituintes são eluídos em uma etapa de lavagem e, só após, os analitos são eluídos com um solvente adequado. Ou ainda, os componentes da matriz podem ser seletivamente retidos no cartucho e os analitos eluídos diretamente. No entanto, alguns problemas podem comprometer a eficiência do método. Na etapa de empacotamento do cartucho, por ser um processo manual,

existe um problema associado à formação de caminhos preferenciais na mistura que compõe o recheio, o que pode afetar a precisão do método. Devido a esses fatores, a MSPD vem sofrendo modificações, buscando minimizar diferenças entre as extrações, eluir preferencialmente os analitos em detrimento dos interferentes presentes na matriz e diminuir o número de etapas envolvidas, tornando o método mais simples e rápido.

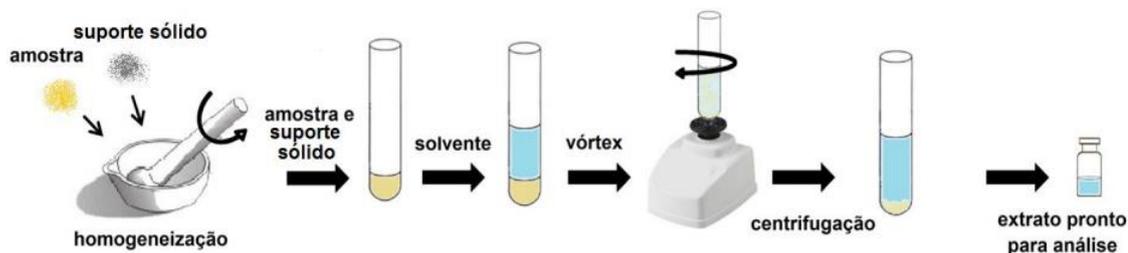
### 2.5.2 Modificações da MSPD

Entre as modificações reportadas na literatura para o aprimoramento da técnica, destacam-se abordagens alternativas da MSPD utilizando ultrassom, micro-ondas, campo magnético e vórtex, visando reduzir custos, tempo e reagentes. Além disso, os esforços também têm sido voltados ao estudo de uma variedade de suportes sólidos (ou sorventes), como o uso de suportes sólidos alternativos, sejam eles naturais ou sintéticos, contribuindo para a diminuição do custo de análise e cumprindo os requisitos da Química Analítica Verde (GAC) (CALDAS *et al.*, 2013). Com base nas propriedades dos analitos e na complexidade da amostra, vários suportes sólidos tem sido utilizados, desde materiais clássicos comerciais, como C18 e C8, alumina, florissil e sílica (CAPRIOTTI *et al.*, 2010), até suportes sólidos verdes como areia, quitosana, quitina e concha de mexilhão (CALDAS *et al.*, 2013; ROMBALDI *et al.*, 2015; HERTZOG *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2018).

#### 2.5.2.1 Dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex

Sebastià *et al.* (2010) propuseram uma modificação na MSPD para a extração de aflatoxinas. Neste trabalho, os autores substituíram a etapa de transferência e empacotamento da mistura em cartuchos de SPE pela transferência direta para tubos de vidro de fundo cônico com o solvente de eluição, seguido da agitação e posterior centrifugação. Na Figura 5, estão representadas as etapas envolvidas na MSPD modificada.

**Figura 5.** MSPD modificada.



Fonte: Adaptado de (CALDAS *et al.*, 2013).

A etapa de eluição em coluna substituída pela agitação em vórtex foi desenvolvida com o objetivo de propiciar a extração quantitativa dos analitos a partir de matrizes complexas em um menor tempo de extração, além de reduzir o consumo de solvente (TU e CHEN, 2018). Com o menor consumo de solvente, conseqüentemente uma menor quantidade de amostra é necessária para a extração quantitativa das espécies de interesse (WIANOWSKA e GIL, 2019).

Outra vantagem do uso do vórtex inclui a eliminação da etapa de empacotamento da amostra (após maceração com o suporte sólido), visto que nesta etapa podem ocorrer erros de precisão do método devido ao empacotamento manual. Também é possível melhorar a eficiência de extração, pois há um aumento do tempo de contato da amostra com o solvente, além de promover uma menor exposição dos analistas a solventes orgânicos e reagentes tóxicos (CALDAS *et al.*, 2013). A partir desta modificação, Caldas *et al.* (2013), desenvolveram um método empregando a MSPD com a modificação da etapa de empacotamento pela etapa de agitação em vórtex para a extração de resíduos de pesticidas a partir de fígado de peixe e hepatopâncreas de siri com determinação por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) e os autores adotaram a denominação de dispersão da matriz em fase sólida assistida por vórtex (VA-MSPD). Desde então, a VA-MSPD tem sido investigada para uma série de aplicações.

### 2.5.2.2 MSPD e a Química Analítica Verde

A busca por ações sustentáveis na Química tem sido guiada pela Química Verde, através do desenvolvimento de métodos, sínteses e processos que visam a proteção do meio ambiente. Especialmente na área de Química Analítica, existem os 12 princípios da GAC (GALUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIENSKI, 2013), os quais estão descritos a seguir:

- 1) Priorizar técnicas de análise direta para evitar o preparo de amostra;
- 2) Reduzir o tamanho e número de amostras;
- 3) Realizar medições *in situ*;
- 4) Integrar processos e operações analíticas visando reduzir o consumo de energia e reagentes;
- 5) Automatizar e miniaturizar os métodos;
- 6) Evitar derivatização;
- 7) Reduzir o volume de resíduos e dispor adequadamente aqueles que são gerados;
- 8) Priorizar métodos multianalito ou multiparâmetro;
- 9) Minimizar o uso de energia;
- 10) Priorizar o uso de reagentes de fontes renováveis;
- 11) Eliminar ou substituir reagentes tóxicos;
- 12) Aumentar a segurança do operador.

O emprego de suportes sólidos disponíveis no meio ambiente (verdes), a dispensa de utilização de energia como radiação micro-ondas e ultrassom, a segurança do operador, a minimização de etapas na VA-MSPD, a possibilidade de utilização de pequenas massas de amostras (possibilidade de miniaturização), o que leva à redução no consumo de reagentes e geração de resíduos, além da utilização de soluções/solventes menos agressivos ao meio ambiente são características que contemplam uma boa parte dos princípios da GAC e fazem da MSPD, uma interessante alternativa para o desenvolvimento de métodos analíticos mais verdes.

### 2.5.2.2 Aplicações da MSPD

A MSPD possui uma vasta aplicação como método de preparo de amostras visando a determinação de compostos orgânicos. Entre os trabalhos envolvendo amostras de algas, destaca-se o trabalho realizado por García-Rodríguez *et al.* (2012), os quais empregaram a MSPD (formato original) para a extração de 17 pesticidas em amostras de algas marinhas. A extração consistiu na maceração de 1 g de amostra com 4 g de sulfato de sódio anidro (0,4 g de negro de fumo grafitado e 3,6 g de florisil como adsorventes de limpeza) e a determinação foi realizada por GC-MS. O método estabelecido foi aplicado na determinação de pesticidas em 5 amostras comerciais de algas comestíveis e 6 amostras de algas marinhas.

Outros estudos envolvendo a aplicação da MSPD para a determinação de compostos orgânicos em alimentos utilizando suportes sólidos alternativos também têm sido investigados. Rombaldi *et al.* (2015), avaliaram pela primeira vez a utilização de conchas de mexilhão dourado como suporte sólido na VA-MSPD para a extração de resíduos de 11 pesticidas e 9 produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal em amostras de tecido de mexilhão dourado. Os resultados mostraram que a concha de mexilhão é um material eficaz permitindo a determinação dos analitos, com recuperações médias variando de 61 a 107% e RSDs inferiores a 18%. A determinação foi realizada por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Hertzog *et al.* (2015), utilizaram a VA-MSPD para a extração de 15 produtos farmacêuticos em amostras de peixes e determinação por LC-MS/MS. Os melhores resultados foram obtidos com 0,5 g de terra de diatomácea, 0,5 g de sulfato de sódio e 5 mL de metanol. As recuperações analíticas variaram de 58 a 128% com RSDs inferiores a 15%.

Em relação a determinação de compostos inorgânicos (metais, espécies metálicas ou não metais) poucos trabalhos têm investigado a MSPD como método de preparo de amostras. A MSPD tem sido empregada para a análise de especiação química em amostras biológicas. Como exemplo, destaca-se a determinação de espécies de arsênio em frutos do mar por cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (LC-ICP-MS), utilizando areia como suporte sólido na MSPD tradicional (MOREDA-PI EI RO *et al.*,

2009). A análise de especiação de mercúrio também foi investigada para a extração de espécies de mercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ) em tecidos de peixe por MSPD (modificada através do uso de vórtex) utilizando  $\text{SiO}_2$  como suporte sólido e determinação das espécies por GC-MS (DUARTE *et al.*, 2013). Recentemente, outros estudos têm investigado a aplicação de nanotubos de carbono como suporte sólido na MSPD para a determinação de espécies de mercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  e  $\text{Hg}^{2+}$ ) em órgãos (CHEN *et al.*, 2017) e tecidos de peixes (DENG *et al.*, 2015).

No que diz respeito à determinação de halogênios, existe apenas um trabalho na literatura para determinação de iodo e suas espécies. Cao *et al.* (2016), realizaram um estudo utilizando a MSPD miniaturizada para a microextração de iodo inorgânico e aminoácidos a base de iodo em amostras de algas marinhas. A determinação foi realizada por cromatografia a líquido de ultra alta eficiência acoplada ao detector por ultravioleta (UHPLC-UV). Os melhores resultados foram obtidos utilizando peneira molecular (SBA-15) como suporte sólido e o líquido iônico (brometo de 1-dodecil-3-metilimidazólio) na concentração de  $200 \text{ mmol L}^{-1}$  como solvente de eluição. O método proposto foi aplicado com sucesso na microextração de iodeto de potássio, 3-iodo-L-tirosina e 3,5-diiodo-L-tirosina em algas do tipo Nori, Kelp e Wakame.

Em virtude do que foi exposto, embora existam poucos trabalhos na literatura, a aplicabilidade da MSPD para a determinação de compostos inorgânicos tem se mostrado promissora e com potencial para ser utilizada como método de preparo de amostras visando a determinação de halogênios em amostras de algas comestíveis, devido à sua simplicidade, seletividade, rapidez, custo reduzido e pela possibilidade de empregar materiais naturais como suportes sólidos verdes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

---

#### 3.1 Instrumentação

A determinação dos halogênios foi realizada em um cromatógrafo de íons (Metrohm, modelo IC compacto Pro 881) equipado com amostrador automático (Metrohm, modelo 863 Compact Autosampler) com capacidade para 36 amostras, conforme a Figura 6. O cromatógrafo possui uma célula de ultra filtração equipada com um filtro de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , bomba quaternária, sistema de degaseificação de eluente, forno de coluna, sistema de supressão química (Metrohm Suppressor Module, MSM) e de  $\text{CO}_2$  (Metrohm  $\text{CO}_2$  Suppressor, MCS), em combinação com um detector digital de condutividade.

**Figura 6.** Cromatógrafo de íons utilizado na determinação dos halogênios.



Durante a otimização da VA-MSPD, para a separação dos ânions (fluoreto, cloreto, brometo e iodeto), foi empregada uma coluna cromatográfica de troca aniônica (150 mm x 4.0 mm d.i., 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula) de álcool polivinílico com grupos de amônio quaternário (Metrohm, modelo Metrosep A Supp 5 - 150) e uma coluna-guarda (5 mm x 4.0 mm d.i., 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula) com o mesmo material de preenchimento da coluna de troca aniônica (Metrohm, modelo

Metrosep A Supp 5 Guard/4.0). Para os últimos experimentos de otimização da MSPD e para a validação do método foi utilizada uma coluna cromatográfica (250 mm x 4.0 mm d.i., 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula) com o mesmo material de preenchimento da primeira coluna de troca aniônica (Metrohm, modelo Metrosep A Supp 5 - 250). Para todos os experimentos, a alça de amostragem usada foi de 20  $\mu\text{L}$ . A fase móvel foi composta por uma solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  3,4  $\text{mmol L}^{-1}$ , com vazão de 0,7  $\text{mL min}^{-1}$ . Para a desgaseificação da fase móvel foi utilizado um banho ultrassônico (Cristófoli, modelo CUS3203B). A coluna supressora foi regenerada durante as análises com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  50  $\text{mmol L}^{-1}$ . A aquisição e tratamento dos dados obtidos no cromatógrafo de íons foram feitas com o auxílio do programa MagIC Net™, versão 3.2 (Copyright© 2017, Metrohm AG).

As amostras foram trituradas com um processador de alimentos (Walita, modelo Mega Master Plus RI 3170), liofilizadas (liofilizador marca Liotop®, modelo L101) e cominuídas em moinho com almofariz e pistilo motorizado (Marconi, modelo MA590). A pesagem das amostras, suportes sólidos e reagentes foram feitas em uma balança analítica (Bioprecisa, modelo FA2104N), com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 210 g. Para a medição do pH das soluções foi utilizado um pHmetro (Hanna, modelo pH20/21). As soluções das amostras obtidas no procedimento de extração foram homogeneizadas com um agitador tipo vórtex (B. Braun Biotech International, modelo Certomat MV). A centrifugação dos extratos foi realizada com o auxílio de uma centrífuga (Quimis, modelo Q222T). Para a filtração das amostras foram utilizadas seringas com capacidade de 10 mL e membrana filtrante para seringa em PVDF de 0,45  $\mu\text{m}$ , com 25 mm de diâmetro (Allcrom). O preparo de soluções e lavagem das vidrarias foi feito com água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação (Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q UV3®), com resistividade 18,2  $\text{M}\Omega\text{ cm}$ .

Para a determinação do teor de cinzas totais foi utilizado um forno tipo mufla (Quimis, modelo Q318S). Neste procedimento foram utilizados cadinhos de porcelana com capacidade de 30 mL. Durante toda a realização do estudo foram utilizadas diversas vidrarias como béqueres, balões volumétricos de 10 a 2000 mL, tubos de polipropileno com capacidade de 15 e 50 mL (Sarstedt, Alemanha) e

micropipetadores automáticos com capacidade variável de 10 a 1000  $\mu\text{L}$  (Labmate, Polônia).

### 3.2 Reagentes

Todas as soluções aquosas utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram preparadas em água ultrapura com reagentes de elevada pureza. As soluções de referência de F, Cl, Br e I foram preparadas a partir da dissolução dos sais KCl (Merck, Alemanha), NaF (Merck), KBr (Merck) e KI (Merck) em solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol  $\text{L}^{-1}$ . Estas soluções foram utilizadas para as curvas de calibração preparadas a partir da diluição sucessiva das soluções estoque e também nos ensaios de recuperação realizados durante a otimização e validação do método.

A solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol  $\text{L}^{-1}$ , utilizada como solução extratora, foi preparada a partir da dissolução do respectivo sal (Sigma-Aldrich, Alemanha) em água ultrapura. O TMAH 25% (m/v) (Sigma Aldrich) também foi avaliado como solução extratora. Carbonato de sódio (Merck) e  $\text{NaHCO}_3$  (Merck) foram avaliados como solução extratora e utilizados para o preparo da fase móvel. O  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck) foi utilizado para regeneração da coluna supressora. Os suportes sólidos avaliados foram Florisil 100 - 200 mesh (Sigma Aldrich), alumina (Sigma Aldrich), terra diatomácea (Sigma Aldrich) (obtidos comercialmente), concha de mexilhão e areia, sendo os dois últimos obtidos na natureza. Nitrato de amônio (Merck) foi utilizado como iniciador de combustão e  $\text{NH}_4\text{OH}$  (Merck) como solução absorvedora na decomposição das amostras por MIC. Álcool etílico grau HPLC (J. T. Baker) foi utilizado na lavagem dos suportes sólidos. Ácido nítrico 65% (Merck) e detergente Extran<sup>®</sup> neutro (Merck) foram utilizados para a descontaminação e limpeza dos materiais utilizados neste trabalho.

### 3.3 Descontaminação das vidrarias

As vidrarias utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram descontaminadas com água e Extran. Em seguida, foram enxaguadas com água destilada e descontaminadas por imersão em um banho de  $\text{HNO}_3$  20% (v/v), por no

mínimo 24 h. Após este período, foram lavadas com água ultrapura e posteriormente secas em estufa antes da sua utilização, exceto os balões volumétricos e tubos de polipropileno que foram secos em temperatura ambiente.

### 3.4 Amostras

A amostra de alga do tipo Nori (*Porphyra spp.*) foi utilizada neste trabalho para os experimentos de otimização da VA-MSPD, por ser amplamente utilizada na culinária japonesa e de fácil aquisição no mercado local. Com as condições otimizadas, foram analisadas amostras de alga do tipo Wakame (*Undaria pinnatifida*), Kombu (*Laminaria ochroleuca*) e Hijiki (*Hizikia fusiformis*), as quais foram adquiridas em lojas virtuais especializadas. Para avaliar a exatidão do método, foi realizada a determinação dos halogênios no material de referência certificado (CRM) de folha de maçã (NIST 1515) e folha de pêssigo (NIST 1547).

#### 3.4.1 Tratamento preliminar das amostras

Foram adquiridos entre 26 e 100 g de cada uma das espécies de algas. As amostras foram inicialmente cortadas à mão, acondicionadas em recipientes de polipropileno e submetidas a congelamento em ultrafreezer a temperatura de -80 °C por 24 h. Após serem retiradas do ultrafreezer, as amostras foram liofilizadas por 48 h e, para facilitar a próxima etapa (moagem), foram homogeneizadas com o auxílio de um triturador de alimentos. Em seguida, as amostras foram moídas em moinho com almofariz e pistilo motorizado e, em seguida, peneiradas com peneira de 0,841 mm (20 mesh) para a uniformidade da amostra. É importante salientar, que os componentes do moinho foram descontaminados em banho de HNO<sub>3</sub> 20% por 24 h antes e depois da sua utilização e entre os diferentes tipos de amostras utilizadas. Posteriormente, as amostras foram identificadas e armazenadas em frascos de polipropileno.

### 3.4.2 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas nas amostras foi baseada no método oficial (AOAC 930.05, 2005) da Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) descrito para plantas, a fim de caracterizar a amostra quanto à sua composição inorgânica. Neste procedimento, 2 g de amostra das algas Nori, Wakame, Hijiki e Kombu foram pesadas (em triplicata) em cadinhos de porcelana, os quais foram colocados no interior de um forno tipo mufla até atingir a temperatura de 200 °C. Em seguida as amostras foram submetidas a um programa de aquecimento que consistiu em uma rampa de aquecimento de 200 a 600 °C, com taxa de aquecimento de 200 °C h<sup>-1</sup>, até atingir a temperatura de 600 °C, a qual permaneceu por 3 h. Depois de retirados da mufla, os cadinhos foram colocados em dessecador para resfriamento (até a temperatura de equilíbrio com o ambiente) e em seguida foram pesados até massa constante. O teor de cinzas foi calculado em porcentagem através da relação entre a massa inicial de amostra e a massa de cinzas obtida após o procedimento, conforme a equação a Equação 1.

$$\text{Teor de cinzas (\%)} = \left( \frac{m_c}{m_a} \right) \times 100\% \quad \text{Equação 1}$$

Onde:  $m_c$  e  $m_a$  representam as massas de cinzas e de amostra, descontadas da massa do cadinho, respectivamente.

### 3.4.3 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para uma melhor compreensão da morfologia das amostras e suportes sólidos em estudo, foram feitas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol, modelo SM 6610 LV Scanning Electron Microscope) localizado no Centro de Microscopia Eletrônica da Região Sul (CEME-Sul) da FURG.

### 3.5 Decomposição das amostras por MIC

Para a comparação dos resultados, foi feita a determinação de F, Cl, Br e I por ICP-MS, após decomposição da amostra de alga Nori por MIC. Aproximadamente 300 mg de amostra (em triplicata) foram pesados e prensados na forma de comprimidos utilizando uma prensa hidráulica (pressão de 3 ton por 1 min). Os comprimidos foram colocados sobre suportes de quartzo contendo um disco de papel filtro embebido em 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$ . Em seguida, os suportes de quartzo foram inseridos em frascos de quartzo contendo 6 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  100 mmol  $\text{L}^{-1}$  (solução absorvedora), os quais foram fechados, inseridos em um rotor e pressurizados com 20 bar de  $\text{O}_2$ . O programa de irradiação consistiu em uma etapa de 5 min com irradiação a uma potência de 1400 W e uma etapa de 20 min de resfriamento (até 50  $^\circ\text{C}$ ), sem irradiação. Após a MIC, os digeridos foram recolhidos em frascos de polipropileno e avolumados a 15 mL com água ultrapura.

### 3.6 Determinação de halogênios por ICP-MS e ISE

Para a determinação de Cl, Br e I, foi utilizada a técnica de ICP-MS, empregando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer, modelo Elan DRC II) equipado com um nebulizador concêntrico, câmara de nebulização ciclônica e tocha de quartzo. Na Tabela 3, estão apresentadas as condições operacionais do ICP-MS.

**Tabela 3.** Parâmetros operacionais para a determinação de Cl, Br e I por ICP-MS.

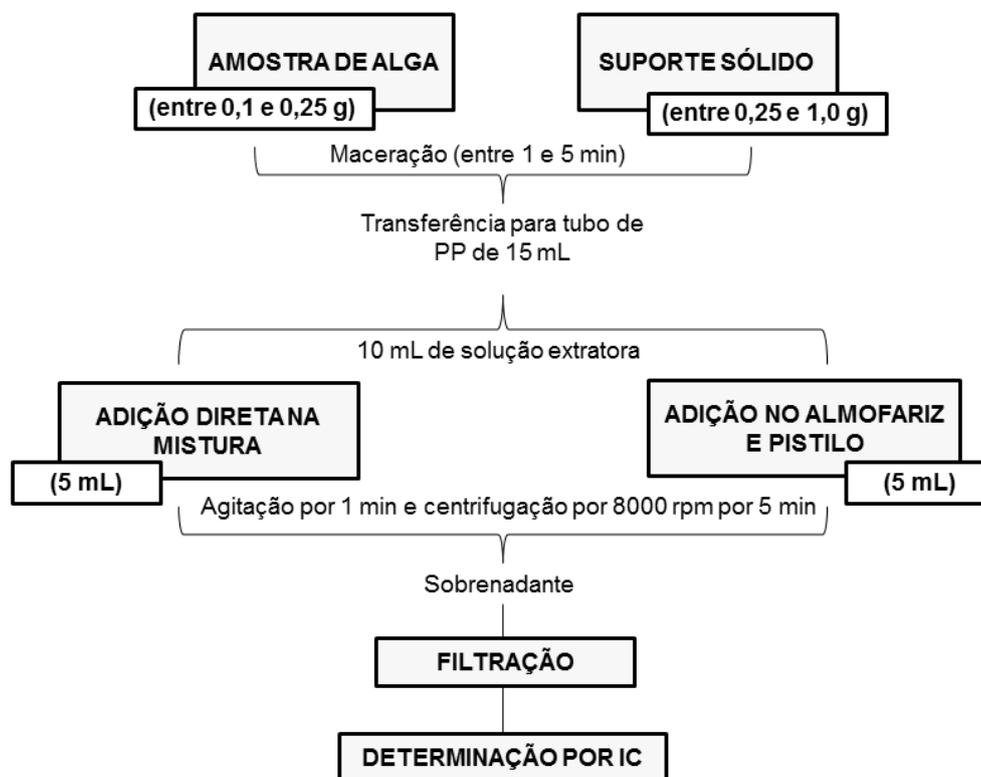
Parâmetro	ICP-MS
Potência do gerador de RF (W)	1400
Vazão de Ar: principal ( $\text{L min}^{-1}$ )	15
auxiliar ( $\text{L min}^{-1}$ )	1,2
nebulização ( $\text{L min}^{-1}$ )	1,11
Elemento monitorado	$^{35}\text{Cl}$ $^{79}\text{Br}$ $^{127}\text{I}$

A determinação de F foi feita em um potenciômetro digital (Metrohm, modelo 781 pH/Ion Meter) equipado com um eletrodo de íon seletivo (ISE) para fluoreto (Metrohm). As determinações de Cl, Br e I por ICP-MS e F por ISE foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

### **3.7 Extração dos halogênios empregando a VA-MSPD**

O método de extração empregando a VA-MSPD consistiu na pesagem da amostra (entre 0,1 e 1,0 g) e do suporte sólido (entre 0,25 e 1,0 g), sendo estas quantidades transferidas para almofariz de vidro e maceradas (entre 1 e 5 min) usando um pistilo também de vidro. Em seguida, a mistura foi transferida, com auxílio de espátula, para tubos de polipropileno (PP) de 15 mL, onde foram adicionados 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup> como solução extratora. O volume desta solução foi dividido em duas partes: *i*) 5 mL foram adicionados diretamente no tubo de PP de 15 mL e *ii*) 5 mL foram adicionados no almofariz, com o objetivo de lavar a superfície, realizando a transferência quantitativa da mistura para o tubo de PP de 15 mL. A mistura resultante (amostra, suporte sólido e solução extratora) foi agitada/homogeneizada em vórtex por 1 min e centrifugada por 5 min a 8000 rpm. Após estas etapas, o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta de Pasteur e transferido para um novo tubo de PP de 15 mL. Por fim, o extrato final foi filtrado em filtros de seringa com membrana de 0,45 µm, transferido para frascos de amostragem e introduzido no equipamento de IC. Na Figura 7, estão representadas as etapas envolvidas na extração por VA-MSPD.

**Figura 7.** Esquema das etapas envolvidas na extração por VA-MSPD.



### 3.8 Avaliação dos principais parâmetros da VA-MSPD

A fim de obter a melhor eficiência na VA-MSPD para os analitos em estudo, foram avaliados alguns dos principais parâmetros, os quais incluem o tipo de suporte sólido e solução extratora, massa de amostra, massa de suporte sólido e tempo de maceração na extração dos halogênios.

#### 3.8.1 Avaliação do tipo de suporte sólido

Para a extração dos halogênios foram avaliados 5 suportes sólidos, incluindo os suportes sólidos verdes, obtidos de fontes renováveis, como a concha de mexilhão e areia. A concha de mexilhão foi obtida a partir da moagem e secagem de conchas de mexilhão coletadas no Canal São Gonçalo e na Lagoa Mirim, na cidade

de Rio Grande - RS (ROMBALDI *et al.*, 2015). A areia foi coletada na Praia de Bojuru, na cidade de São José do Norte - RS (SANTOS *et al.*, 2019). Além dos suportes sólidos naturais, também foram avaliados suportes sólidos comerciais comumente utilizados na MSPD, como a terra diatomácea, florissil e alumina. Vale ressaltar ainda, que também foi avaliada a extração sem a presença de suporte sólido.

### 3.8.2 Avaliação do tipo de solução extratora

Visando selecionar a solução extratora mais eficiente para a extração de F, Cl, Br e I na VA-MSPD, foram avaliadas água, solução contendo carbonato de sódio  $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$  e bicarbonato de sódio  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , carbonato de amônio  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 25% (m/v). O volume foi fixado em 10 mL conforme a capacidade do tubo de amostra do auto amostrador (aproximadamente 11 mL). Foram observadas as condições que proporcionaram maiores valores de recuperação e melhor resolução dos picos cromatográficos na separação dos halogênios, até o momento.

### 3.8.3 Avaliação da massa de suporte sólido

Após a definição do tipo de suporte sólido e solução extratora, foi avaliada a massa de suporte sólido. Foram avaliadas as massas de 0,25; 0,50 e 1,0 g, sendo todas as medidas em triplicata. Além disso, foram realizados experimentos sem a utilização do suporte sólido.

### 3.8.4 Avaliação do tempo de maceração

Devido à complexidade da estrutura das algas, os halogênios podem permanecer fortemente ligados à matriz e apresentar baixa eficiência de extração. A maceração na presença do suporte sólido quebra a estrutura da matriz e aumenta a superfície de contato, o que facilita a extração. Assim, foram realizados

experimentos utilizando 1, 3 e 5 min de tempo de maceração. Além disso, também foi avaliada a extração sem maceração.

### 3.8.5 Avaliação da massa de amostra

A massa de amostra (0,10 e 0,25 g) foi avaliada, de acordo com o procedimento representado na Figura 7. Todas as medições foram feitas em triplicata e a massa de amostra escolhida foi a que apresentou maiores recuperações. Além disso, estes experimentos também foram utilizados para avaliar a robustez do método.

## 3.9 Descontaminação dos suportes sólidos

Durante a avaliação do tipo de suporte sólido na VA-MSPD, foram avaliados procedimentos de descontaminação a fim de reduzir os valores dos brancos analíticos, onde foi avaliado o uso de água ultrapura, álcool etílico 20% e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup>, conforme o procedimento: pesou-se 10 g de suporte sólido em tubos de polipropileno de 50 mL e adicionou-se 20 mL de água ultrapura. Em seguida, agitou-se em vórtex por 3 min e centrifugou-se por 5 min a 6000 rpm. O procedimento foi repetido por 5 vezes e em cada uma das vezes, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e analisado por IC. Repetiu-se o mesmo procedimento de limpeza com álcool etílico 20% e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup>. O suporte sólido foi colocado em placa de Petri e seco em estufa durante 24 h em temperatura de 50 °C.

## 3.10 Determinação de halogênios por IC

Após passar pelo procedimento de extração, as amostras foram analisadas por IC seguindo os parâmetros instrumentais recomendados pelo fabricante para a determinação de ânions. As condições operacionais estão apresentadas na Tabela 4 e foram ajustadas antes da determinação. Outros parâmetros envolvendo a separação dos halogênios, como o tempo de separação e a concentração da fase

móvel foram otimizados a fim de obter a melhor separação cromatográfica com o menor tempo de análise.

**Tabela 4.** Condições instrumentais utilizadas para a determinação de F, Cl, Br e I por IC.

Parâmetro	Descrição
<sup>a</sup> Coluna 1	<sup>a</sup> Metrosep A Supp 5 – 150
<sup>b</sup> Coluna 2	<sup>b</sup> Metrosep A Supp 5 – 250
<sup>a</sup> Pré-coluna	<sup>a</sup> Metrosep A Supp 4/5 Guard column
Eluente	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 3,6 mmol L <sup>-1</sup> e NaHCO <sub>3</sub> 3,4 mmol L <sup>-1</sup>
Vazão do sistema	0,7 mL min <sup>-1</sup>
Volume de injeção	20 µL
Pressão do sistema	12 a 13 MPa
Detector	850 Professional - IC Detector
Amostrador automático	881 Compact autosampler

<sup>a</sup> Utilizada nos experimentos de otimização da separação cromatográfica e nos experimentos iniciais de otimização da MSPD (tipo de suporte sólido e tipo de solução extratora).

<sup>b</sup> Utilizada nos últimos experimentos de otimização da MSPD (massa de suporte sólido, tempo de maceração e massa de amostra) e para a validação do método.

### 3.11 Otimização da separação cromatográfica

Para otimizar a separação de F, Cl, Br e I por IC, a avaliação da separação cromatográfica foi realizada com soluções de referência injetadas separadamente no cromatógrafo, bem como uma mistura dos halogênios. Para a identificação dos tempos de retenção, foram preparadas soluções nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup> a partir da dissolução dos sais dos analitos em (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mmol L<sup>-1</sup>. Além disso, também foram adicionadas concentrações conhecidas das soluções de referência no extrato da VA-MSPD para verificar o comportamento dos halogênios na presença da matriz. Para identificar os tempos de retenção, foi observado o acréscimo de sinal analítico com a concentração. É importante salientar que na Tabela 4, estão apresentadas duas colunas cromatográficas com tamanhos

diferentes (150 e 250 mm). A coluna de 150 mm foi utilizada durante a otimização da VA-MSPD. Em função do desgaste da coluna de 150 mm, foi utilizada uma segunda coluna de 250 mm durante os experimentos finais da otimização da MSPD e durante a etapa de validação do método.

A fase móvel empregada na cromatografia por troca aniônica é uma solução com propriedades tamponantes, escolhida de acordo com a compatibilidade com o trocador iônico. Neste trabalho, foram avaliadas as soluções tampão da fase móvel nas contrações de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  1,7 mmol L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,7 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  2,55 mmol L<sup>-1</sup>;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  1,0 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  3,4 mmol L<sup>-1</sup>. As soluções da fase móvel foram preparadas diariamente em um balão volumétrico de 1 L a partir da dissolução dos respectivos sais em água ultrapura e desgaseificadas por 24 min em banho ultrassônico. Os valores de pH das soluções tampão da fase móvel foram determinados em pHmetro digital.

### 3.12 Análise estatística

Todos os tratamentos de dados referentes à avaliação dos parâmetros da MSPD e durante a validação do método foram realizados com o auxílio do programa *Microsoft Excel 2010*. Alguns dos tratamentos estatísticos foram realizados com auxílio do programa *InStat, GraphPad* versão 3.10. Durante a otimização da VA-MSPD e na comparação dos resultados obtidos na validação do método, foi utilizado o teste *t-student* para a comparação entre duas médias considerando um nível de significância de 95%. Para a comparação entre três ou mais médias, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), optando-se pelo teste de múltiplas comparações de *Tukey-Kramer*, com nível de confiança de 95%. Além disso, também foi utilizado o teste Z para eliminação de *outliers*.

### 3.13 Validação do método

A validação analítica é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que

os requisitos específicos para seu uso pretendido sejam atendidos. A validação deve ser realizada a fim de garantir que as características de desempenho do método sejam atendidas e demonstrar que estas características estejam coerentes sob as condições nas quais este será aplicado (ANVISA, 2017). Assim, as características de desempenho avaliadas foram linearidade, efeito de matriz, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, precisão e robustez.

### 3.13.1 Limites de detecção e quantificação

O LOD de um procedimento analítico corresponde a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). Quando são realizadas medições em amostras com baixos níveis do analito é importante saber qual o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectada pelo método (INMETRO, 2018). O LOQ é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

O LOD e o LOQ foram estimados a partir dos parâmetros da curva de calibração, considerando a estimativa do sinal analítico a partir da equação de regressão, a qual apresenta um erro padrão e o produto deste erro pelo valor apropriado do parâmetro  $t$  da distribuição de *Student* permite calcular o intervalo de confiança da curva de calibração. O método de estimativa do LOD e LOQ baseado em parâmetros da curva de calibração apresenta maior confiabilidade estatística, pois leva em consideração o intervalo de confiança da regressão, além de ser um método robusto. O LOD e o LOQ neste caso é definido como a concentração mínima de um composto que pode ser detectado e quantificado, respectivamente, com 99% ou 95% de intervalo de confiança (RIBEIRO e FERREIRA, 2008).

### 3.13.2 Linearidade

A linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade (dentro de uma dada faixa) em obter respostas às quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra. Deve-se avaliar a relação linear em toda a faixa estabelecida para o método, o intervalo entre a menor e a maior concentração do analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

A linearidade do método foi avaliada através de uma curva de calibração externa (preparada em  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup>) e uma curva de adição de padrão, na qual foram adicionadas concentrações conhecidas das soluções de referência em amostras de alga do tipo Nori (*Porphyra spp.*), antes da extração. Em ambas as curvas, as faixas de concentração avaliadas foram de 0,1 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> para F, de 1,0 a 100,0 mg L<sup>-1</sup> para Cl e de 0,1 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> para Br e I. A partir destas curvas, foi avaliada a correlação linear através das equações de regressão e os seus respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ).

### 3.13.3 Efeito de matriz

O efeito de matriz é caracterizado como o efeito dos componentes da matriz na resposta analítica, o qual ocorre especialmente em matrizes complexas. O estudo da influência do efeito de matriz ocorre por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com soluções de referência preparadas no solvente apropriado e no extrato da amostra (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). Esta influência pode ser observada com o aumento ou diminuição da resposta do detector, em comparação com a resposta produzida pelas soluções (SANTE, 2017). A ausência de interferentes na matriz é indicada pelo paralelismo aproximado das curvas de regressão linear e avaliação estatística adequada. Caso exista diferença entre as inclinações das duas curvas, é observado efeito de matriz e a curva de calibração deve ser preparada na matriz (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018).

Desta maneira, as mesmas curvas de calibração que foram utilizadas na avaliação da linearidade, também foram utilizadas na avaliação do efeito de matriz, o qual foi determinado pela comparação entre os coeficientes angulares (sensibilidade) das curvas de calibração preparadas na matriz e no solvente, conforme a Equação 2.

$$EM(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s}\right) \quad \text{Equação 2}$$

Onde:  $EM(\%)$  representa o efeito de matriz, em porcentagem;  $S_m$  e  $S_s$  representam os coeficientes angulares das curvas de calibração por adição de padrão (preparada na matriz) e por calibração externa (preparada em solução de  $\text{NH}_4\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup>), respectivamente.

De acordo com Economou *et al.* (2009), considera-se o efeito de matriz nas seguintes faixas: baixo (-20% < EM < 20%); médio (-50% < EM < -20% ou 20% > EM > 50%) e alto (EM < -50% ou EM > 50%).

#### 3.13.4 Exatidão e precisão

A exatidão de um método analítico deve ser avaliada por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro (ANVISA, 2017). Para a determinação da exatidão, considera-se a abordagem mais adequada de acordo com o método analítico e a disponibilidade de materiais, podendo ser avaliada através do uso de CRM, ensaios de recuperação, comparação entre técnicas distintas e comparação com métodos de referência/oficiais.

A exatidão do método proposto foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, aplicação do método proposto em CRMs de folhas de maçã (NIST 1515) e folhas de pêssigo (NIST 1547), além da comparação dos resultados obtidos pelo método proposto com os obtidos por ICP-MS após decomposição das amostras por MIC. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e avaliadas de acordo com as concordâncias entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores certificados pelos CRMs e com o método de referência (MIC/ICP-MS).

A precisão expressa a concordância entre os resultados obtidos por meio de ensaios independentes executados sob as mesmas condições, conforme o método analítico (ANVISA, 2017). As três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (RSD) da série de medições (ANVISA, 2017; INMETRO, 2018). A precisão do método proposto foi avaliada pela repetibilidade, utilizando como critério o desvio padrão relativo (RSD) entre as medições.

#### 3.13.5 Robustez

A robustez é um parâmetro que indica a capacidade do método em não ser afetado por pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (ANVISA, 2017). A robustez fornece uma indicação da confiança do método durante uma aplicação rotineira, sendo um procedimento opcional dentro dos estudos de validação, muitas vezes estando mais associado a estudos de otimização (INMETRO, 2018).

A robustez do método foi avaliada através da utilização de diferentes valores de massa de amostra (0,1 e 0,25 g), observando o efeito desta variável através de ensaios de recuperação. Convém salientar ainda, que quanto mais robusto for um método, maior é a confiança com relação à sua precisão (INMETRO, 2018).

### 3.14 Tratamento de resíduos

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento desse trabalho foram armazenados em frascos devidamente rotulados de acordo com as normas definidas pela Comissão de Resíduos da FURG, sendo posteriormente guardados em local adequado para posterior recolhimento pela Instituição e envio a uma empresa contratada com o objetivo de realizar o seu tratamento.

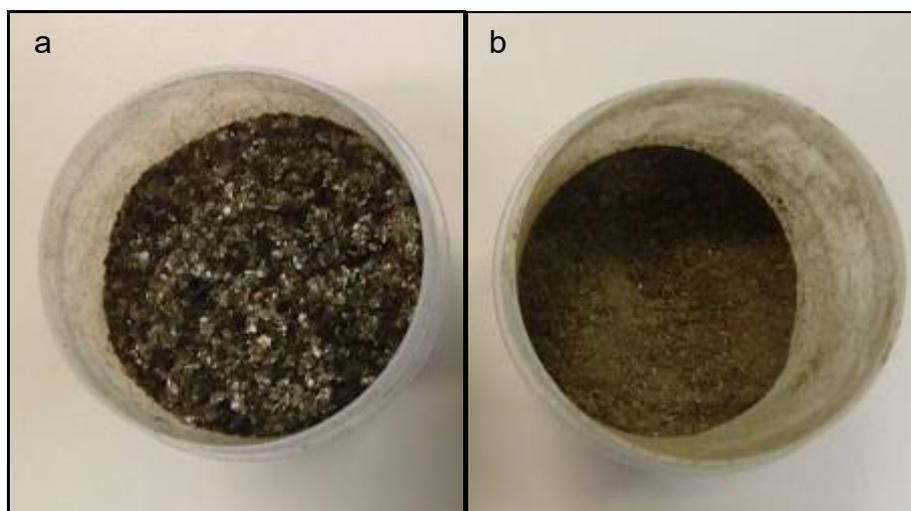
## 4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

---

### 4.1 Tratamento preliminar das amostras

Embora as amostras tenham sido adquiridas na forma de folhas secas, elas foram liofilizadas para garantir a eliminação total de água. Com o objetivo de garantir a homogeneidade das amostras, foi realizado um teste inicial em que uma pequena porção da amostra foi triturada em processador de alimentos e macerada com gral e pistilo, porém a maceração não foi eficiente, e a amostra permaneceu heterogênea. Portanto, as amostras foram moídas em almofariz e pistilo motorizado e, em seguida, peneiradas. O aspecto físico das amostras trituradas e moídas, após terem sido submetidas à liofilização pode ser observado na Figura 8.

**Figura 8.** Amostras de alga trituradas (a) e após moagem e peneiramento (b).



### 4.2 Determinação do teor de cinzas

A fim de obter informações acerca da composição inorgânica das amostras, foram determinados os teores de cinzas presentes nas diferentes espécies de algas. Na Tabela 5, estão mostrados os resultados obtidos neste trabalho em comparação

com os valores reportados na literatura para as mesmas espécies de algas estudadas.

**Tabela 5.** Determinação do teor de cinzas (%) em amostras de algas e a comparação com trabalhos da literatura.

Algas (espécie)	Neste trabalho	RUPÉREZ, 2002	RIOUX; BEAULIEU; TURGEON, 2017	SÁNCHEZ-MACHADO <i>et al.</i> , 2004
Nori ( <i>Porphyra</i> spp.)	9,3 ± 0,21	20,6 ± 0,16	7,0-21,0	19,1 ± 0,61
Wakame ( <i>Undaria pinnatifida</i> )	27,6 ± 0,00	39,3 ± 0,24	27,0-40,0	31,2 ± 0,22
Kombu ( <i>Laminaria ochroleuca</i> )	24,4 ± 0,02	37,6 ± 0,40	15,0-45,0	29,5 ± 1,05
Hijiki ( <i>Hizikia fusiforme</i> )	19,5 ± 0,39	-	-	-

De acordo com os teores de cinzas determinados, foram obtidos valores entre 9,3 e 27,6%. Essa diferença deve-se à composição química das algas marinhas que pode variar de acordo com as espécies, maturidade, habitat e condições ambientais (TABOADA; MILLÁN; MIGUEZ, 2013).

A espécie de alga *Undaria pinnatifida* apresentou o maior teor de cinzas (27,6%), enquanto que a espécie *Porphyra* spp., o menor valor (9,3%). Considerando que a espécie *Porphyra* spp., é uma microalga conhecida popularmente como Nori e as demais espécies apresentadas, são macroalgas, esta diferença pode ser explicada pelo fato da composição elementar inorgânica de microalgas (excluindo diatomáceas) geralmente ser muito inferior comparado às macroalgas (TIBBETTS; MILLEY; LALL, 2015). Outro fato que pode justificar os resultados apresentados, é que a *Porphyra* spp., é uma espécie de alga vermelha, enquanto que as espécies *Undaria pinnatifida*, *Laminaria ochroleuca* e *Hizikia fusiforme* são algas marrons, as quais são mais abundantes em cinzas.

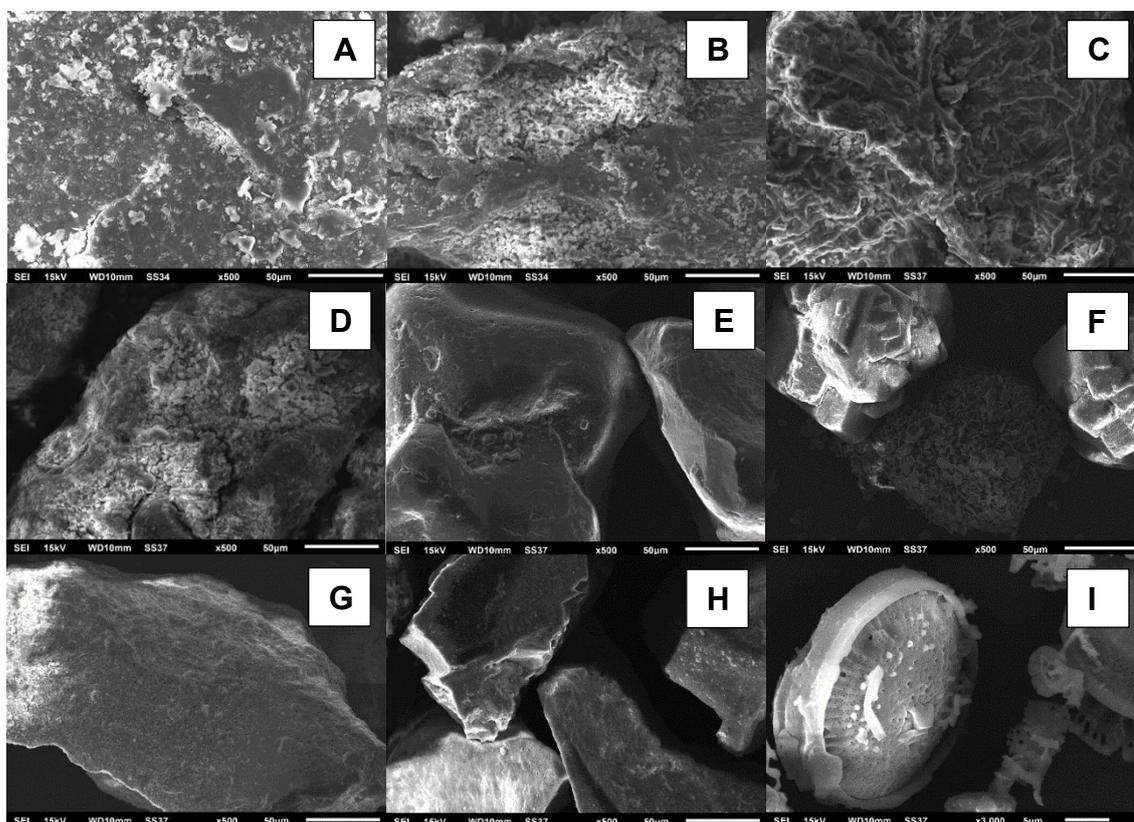
Esses resultados estão de acordo com os reportados na literatura e foram semelhantes aos obtidos por SÁNCHEZ-MACHADO *et al.* (2004), os quais determinaram o teor de cinzas em algas da espécie *Porphyra* spp. (19,1%), *Undaria pinnatifida* (31,2%) e *Laminaria ochroleuca* (29,5%). RIOUX; BEAULIEU e TURGEON (2017) compararam a composição de diferentes espécies de algas

marinhas e observaram que os valores de cinzas variam entre 7,0 e 21,0% para a alga *Porphyra* spp., entre 27,0 e 40,0% para a alga *Undaria pinnatifida* e entre 15 e 45% para a alga *Laminaria ochroleuca*. Também é possível observar na Tabela 5, que no trabalho de RUPÉREZ (2002) os valores de cinzas estiveram de acordo com essa faixa de porcentagem. Além disso, a maioria das espécies analisadas apresentou um elevado teor de cinzas o que comprova que elas são uma boa fonte de minerais.

### 4.3 Caracterização por microscopia eletrônica de varredura

A caracterização por MEV foi utilizada para obter informações acerca da morfologia das amostras e dos suportes sólidos utilizados neste estudo. As imagens destes materiais foram geradas com ampliação do microscópio de 500x e 3000x conforme a Figura 9.

**Figura 9.** Imagens obtidas por MEV para as amostras Nori (A), Kombu (B), Hijiki (C), Wakame (D); os suportes sólidos areia (E), alumina (F), concha de mexilhão (G), florissil (H) e terra diatomácea (I).



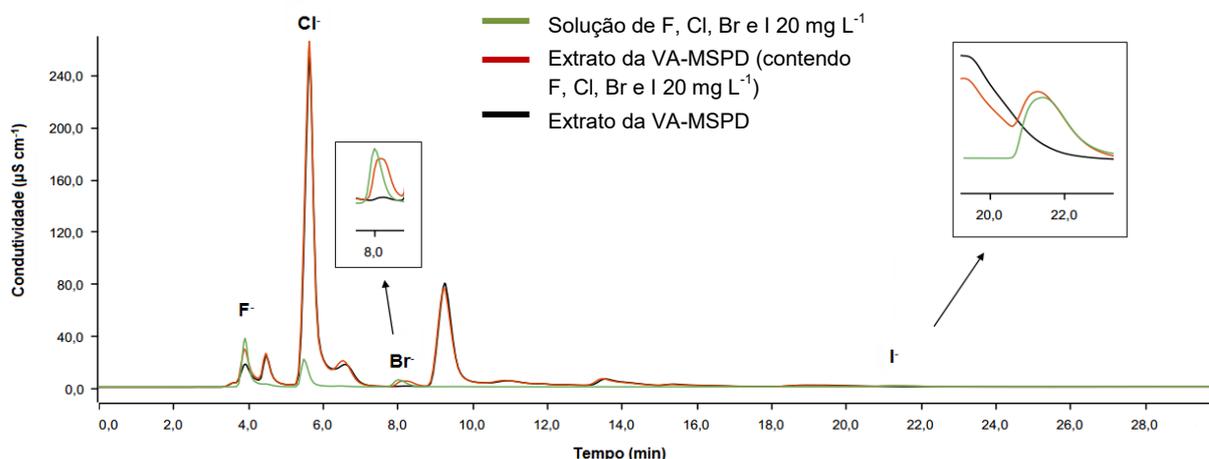
Através das imagens obtidas pelas análises por MEV, pode-se observar que as amostras apresentaram formas irregulares com superfície rugosa e variabilidade de tamanho. Todos os suportes sólidos apresentam partículas de característica heterogênea e formas irregulares. A areia, a concha de mexilhão e o florissil apresentaram partículas com superfícies mais polidas e menos porosas. Já a alumina e a terra diatomácea apresentaram partículas com superfícies mais porosas, com uma elevada superfície de contato. As partículas de terra diatomácea apresentam um formato peculiar por ser uma rocha sedimentar biogênica formada a partir da deposição dos restos microscópicos das carapaças de algas diatomáceas (CPRM, 2020). O florissil, dentre os materiais testados foi o que apresentou partículas mais pontiagudas.

#### **4.4 Otimização da separação cromatográfica**

A fase móvel usualmente empregada na cromatografia de íons é uma solução com propriedades tamponantes, escolhida de acordo com a compatibilidade com o trocador iônico, selecionado conforme os analitos que se pretende determinar. Geralmente, para a determinação de halogênios por cromatografia de íons, utiliza-se como fase móvel uma solução com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2 mmol L<sup>-1</sup> e  $\text{NaHCO}_3$  1,0 mmol L<sup>-1</sup>, (CAUDURO *et al.*, 2019; MESKO *et al.*, 2020), a qual foi avaliada inicialmente.

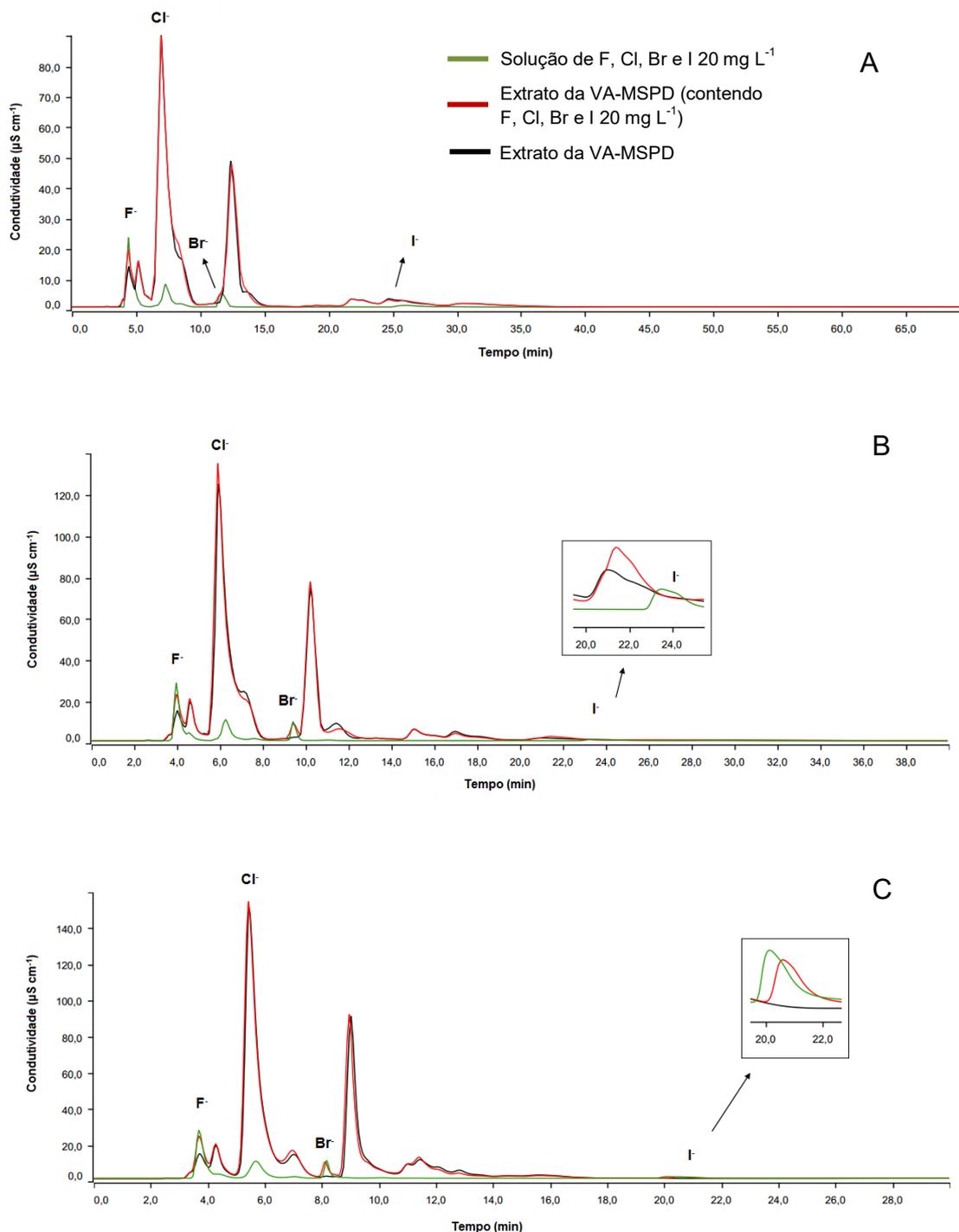
Para avaliar a condição ideal de fase móvel para a separação dos halogênios, foi feita a sobreposição dos cromatogramas de uma solução aquosa contendo 20 mg L<sup>-1</sup> dos halogênios e dos extratos oriundos da VA-MSPD (com e sem a adição de 20 mg L<sup>-1</sup> dos halogênios). As condições da VA-MSPD foram fixadas utilizando 0,25 g de amostra de alga Nori e 1,0 g de terra diatomácea como suporte sólido. Esta condição da VA-MSPD foi utilizada inicialmente por apresentar boa recuperação dos analitos em experimentos preliminares. Na Figura 10, estão apresentados os cromatogramas utilizando a condição de fase móvel recomendada pelo fabricante.

**Figura 10.** Otimização da separação de F, Cl, Br e I por IC utilizando a fase móvel  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ . Condições: 0,25 g de amostra; 1,0 g de terra diatomácea (suporte sólido); 5 min de maceração; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50  $\text{mmol L}^{-1}$ , 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 – 150.



Na condição de fase móvel representada pela Figura 10, observa-se que a separação cromatográfica para os halogênios não foi completa para F, Cl e I, pois na comparação dos cromatogramas, ambos apresentaram picos cromatográficos adjacentes aos sinais dos analitos, comprometendo a seletividade. Por outro lado, este problema não foi verificado para o Br. Apesar de alguns ânions eluírem com tempos de retenção próximos aos dos analitos, com ajustes da força iônica do eluente ou do seu pH, é possível otimizar a separação cromatográfica. Assim, foram avaliadas outras proporções entre  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$  nas soluções tampão da fase móvel. Cabe destacar, que para estes experimentos e para os demais experimentos realizados durante a otimização da VA-MSPD, foi utilizada uma coluna cromatográfica modelo Metrosep A Supp 5 - 150, com 150 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro interno e 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro de partícula. Posteriormente, foram avaliadas as proporções:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  1,7  $\text{mmol L}^{-1}$ ;  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,7  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  2,55  $\text{mmol L}^{-1}$ ; e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  3,4  $\text{mmol L}^{-1}$ , como mostrado na Figura 11.

**Figura 11.** Otimização da separação de F, Cl, Br e I por IC utilizando eluentes contendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  1,7  $\text{mmol L}^{-1}$  (A),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,7  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  2,55  $\text{mmol L}^{-1}$  (B) e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  3,4  $\text{mmol L}^{-1}$  (C). Condições: 0,25 g de amostra; 1,0 g de terra diatomácea como suporte sólido; 5 min de maceração; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50  $\text{mmol L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.



De acordo com a análise dos cromatogramas da Figura 11, representando as proporções de fase móvel  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  1,7  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2,7  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  2,55  $\text{mmol L}^{-1}$  com força iônica 0,0071 e 0,01065  $\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, foi possível observar baixa seletividade para todos os halogênios, indicando baixa eficiência na separação cromatográfica. No entanto, a análise do cromatograma evidencia uma melhora na separação dos picos para a condição de fase móvel utilizando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  3,4  $\text{mmol L}^{-1}$  (força iônica de 0,0142  $\text{mol L}^{-1}$ ). Observou-se que a variação da concentração de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$  e, conseqüentemente, o aumento da força iônica do eluente, influenciou na seletividade dos picos cromatográficos, principalmente para Br e I. Além disso, o aumento da força iônica da fase móvel proporcionou menor interação dos halogênios com a fase estacionária, diminuindo os tempos de retenção e, conseqüentemente o tempo de análise. Portanto, a fase móvel contendo  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,6  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  3,4  $\text{mmol L}^{-1}$  foi escolhida para os experimentos posteriores.

## 4.5 Avaliação dos principais parâmetros da VA-MSPD

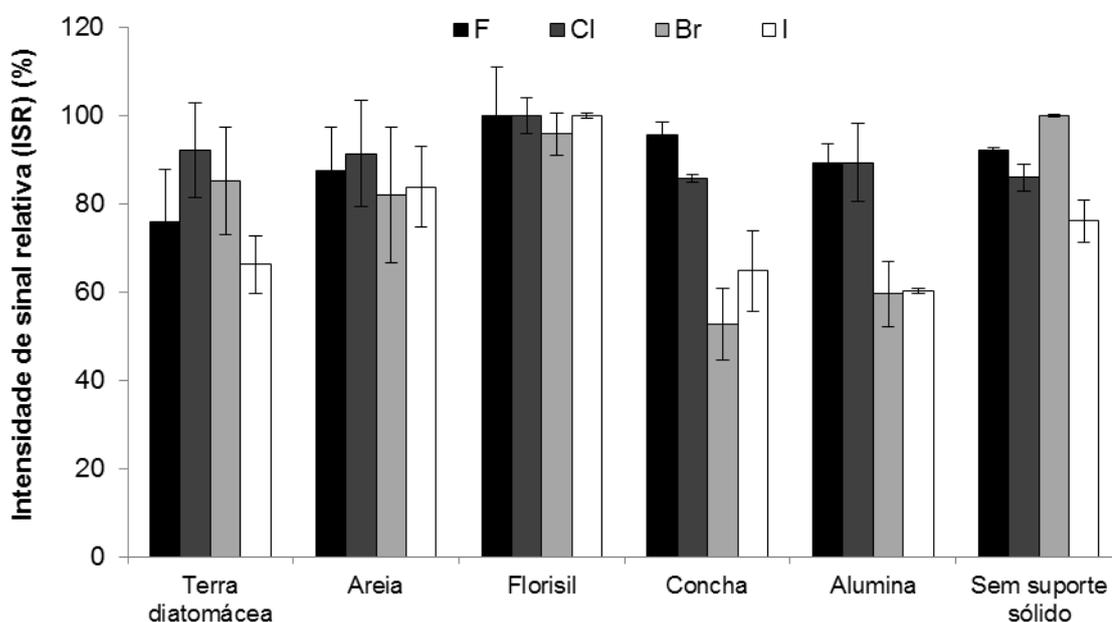
### 4.5.1 Avaliação do tipo de suporte sólido

A natureza do suporte sólido é um parâmetro importante que afeta a eficiência da extração no desenvolvimento da MSPD (PENG *et al.*, 2016). Durante o procedimento de mistura, o suporte sólido é utilizado não apenas para a adsorção e rompimento da estrutura física da matriz visando a separação dos analitos, mas também para a dispersão da amostra (CAO *et al.*, 2016).

Neste trabalho, foram avaliados cinco suportes sólidos com diferentes propriedades físicas e químicas. Cabe salientar, que durante todo o desenvolvimento do método foi utilizada a alga do tipo Nori. Além disso, com a finalidade de verificar o efeito do suporte sólido na extração por VA-MSPD, a maceração da amostra foi realizada com e sem a presença dos suportes sólidos. Os suportes sólidos selecionados foram alumina, florissil e terra diatomácea, tradicionalmente utilizados na MSPD, assim como a areia e concha de mexilhão

como suportes sólidos verdes. Na Figura 12, estão apresentados os resultados obtidos em função da intensidade de sinal relativo (ISR) dos halogênios para cada suporte sólido avaliado.

**Figura 12.** Avaliação do tipo de suporte sólido representada pela intensidade de sinal relativo (ISR) (%) (n=3). As barras de erro representam o RSD (%). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  dos halogênios); 5 min de maceração; 1,0 g de suporte sólido; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.



Os resultados demonstram a intensidade de sinal (área integrada de cada pico cromatográfico) relativa à maior área obtida, para cada tipo de suporte sólido, em porcentagem. Comparando a areia e a concha de mexilhão (suportes sólidos verdes), é possível perceber que a areia apresentou melhores resultados com ISR na faixa de 82 a 91%. Já a concha de mexilhão esteve entre 53 e 96%, com baixa eficiência especialmente na extração de Br (53%) e I (60%). Em relação aos suportes sólidos tradicionais, o mesmo pode ser observado para a alumina que esteve entre 60 e 89%, apresentando valores inferiores também para Br e I (ambos com 60%). No entanto, no experimento realizado sem a utilização do suporte sólido foram obtidos valores de ISR entre 76 e 100%, valores semelhantes aos obtidos

com a terra diatomácea (entre 66 e 92%). Os bons resultados verificados para a maioria dos halogênios, sem o uso de suporte sólido pode estar associado à composição inorgânica da alga Nori, verificada através da determinação do teor de cinzas (9,3%). A presença de minerais na forma de óxidos pode auxiliar no processo de maceração e extração na VA-MSPD, mesmo sem a presença de suporte sólido. Embora tenham sido observados valores promissores de ISR para a maioria dos halogênios, os resultados para I evidenciam uma eficiência de extração inferior à areia e florissil (entre 96 e 100%), mostrando o efeito do suporte sólido durante a maceração para este elemento. Na comparação entre a ISR do I entre a condição onde não foi utilizado suporte sólido com a condição onde foi utilizado florissil, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os resultados. As maiores eficiências de extração foram obtidas para florissil e areia. Embora os valores de ISR tenham sido superiores para florissil, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na comparação com a areia.

A areia utilizada neste trabalho já tem sido empregada em outros trabalhos que estudaram a MSPD para a extração de pesticidas em frutas e vegetais (SANTOS *et al.*, 2019). No trabalho de Salcedo e colaboradores (2020), este mesmo material foi caracterizado empregando a espectroscopia de energia dispersiva (EDS), a difração de raios-X (DRX) e através da determinação dos principais elementos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). A areia, que foi coletada na praia de Bojuru, no município de São José do Norte-RS, apresentou na sua composição, principalmente os elementos Al, Ca, Fe, Mn, Na, Mg, Ti e V, após determinação por ICP OES, estando presente em altas concentrações os elementos Ti (11,4%) e Fe (11,3%). Adicionalmente, através da técnica de EDS, os autores identificaram, além da presença dos elementos já mencionados, o elemento Si e através da técnica de DRX, a presença de CaO, TiO<sub>2</sub> e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. A presença destes elementos, principalmente na forma de óxidos, conferem à areia a sua propriedade abrasiva proporcionando uma ruptura mais eficiente da amostra, rompendo sua estrutura em partes menores, homogêneas e dispersas no suporte sólido. A eficiência na extração pode ocorrer, provavelmente, pela combinação de dois fatores: ruptura eficiente da amostra e interações entre o suporte sólido e a matriz, especialmente para o I, visto que o

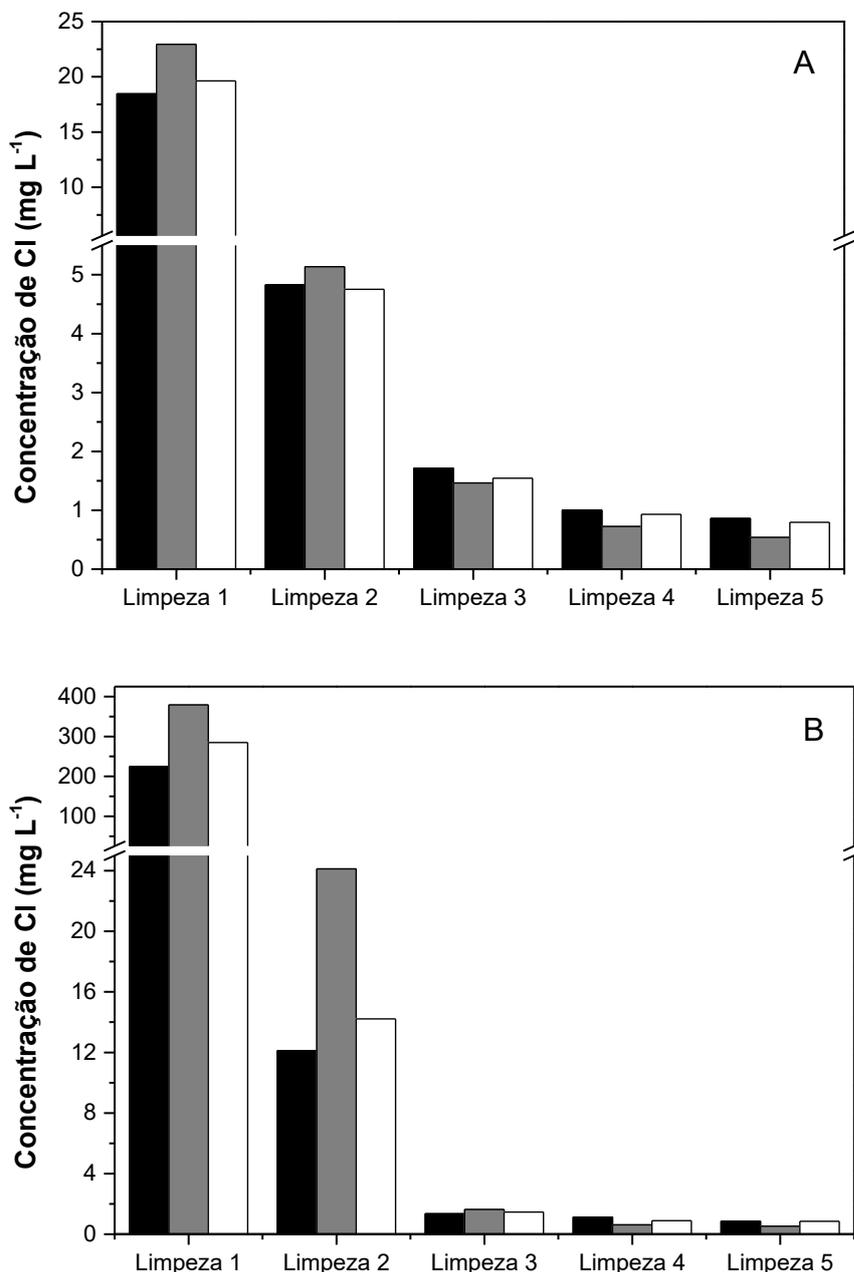
efeito do suporte sólido foi observado para este elemento quando o material não foi usado durante a maceração. Como a areia e o florisil foram os materiais que forneceram os melhores resultados, para estes foi avaliado um processo de descontaminação, a fim de reduzir o valor dos brancos analíticos visando a posterior quantificação dos halogênios.

#### 4.5.1.1 Descontaminação dos suportes sólidos

Para a determinação de halogênios por IC, após extração por VA-MSPD empregando suportes sólidos verdes, faz-se necessário a descontaminação dos suportes para diminuir o sinal analítico dos brancos e também de possíveis íons que podem estar presentes em concentrações elevadas e que possam vir a interferir na etapa de determinação. A descontaminação dos suportes sólidos foi realizada após verificar a presença de alguns halogênios nos brancos analíticos, especialmente Cl, além de outros íons desconhecidos que poderiam ser interferentes. É importante salientar, que a contaminação dos brancos não afetou a comparação entre os tipos de suporte sólido no experimento anterior, pois os valores dos brancos obtidos para cada suporte sólido foram descontados. Como soluções de limpeza foram utilizadas: água ultrapura, álcool etílico 20% e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup> separadamente, conforme descrito anteriormente. Para cada solução de limpeza foram realizadas 5 limpezas sucessivas. Os sobrenadantes foram analisados por IC e a concentração de Cl determinada, de acordo com a Figura 13.

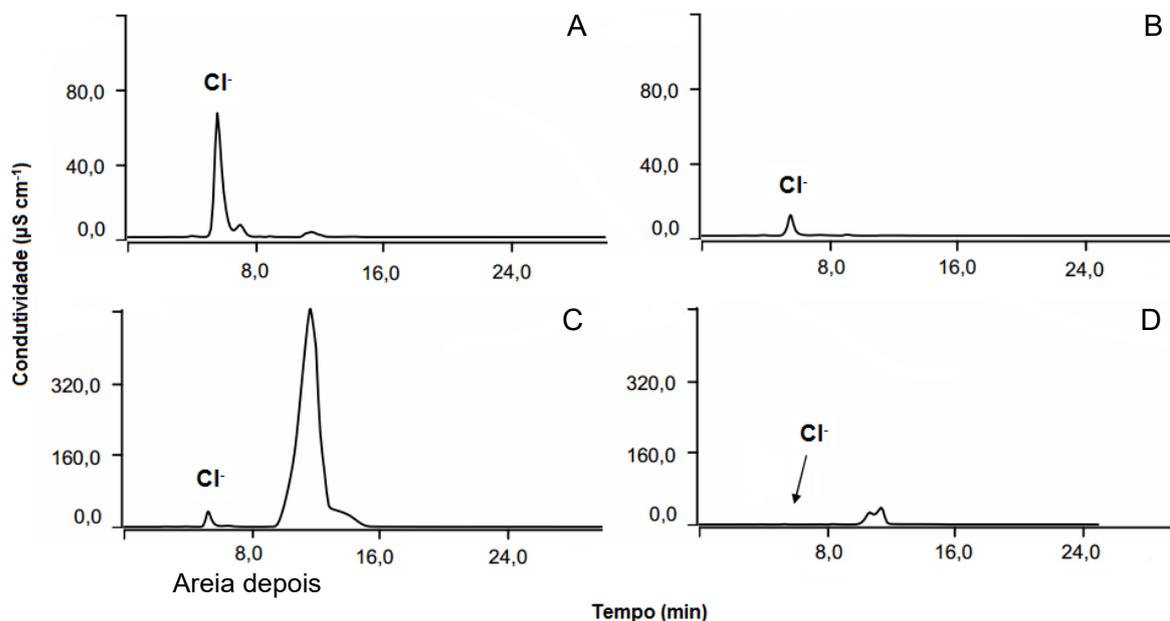
É possível observar que a concentração de Cl diminuiu durante a limpeza para ambos os suportes sólidos. No entanto, os melhores resultados foram observados para a limpeza da areia com a solução de carbonato de amônio, visto que com três limpezas foi possível observar a diminuição significativa da concentração de Cl. Para o florisil, também houve diminuição da concentração de Cl, porém menor que para a areia e apenas na quarta limpeza foi possível obter uma concentração constante. Para todas as limpezas, o carbonato foi o solvente mais eficiente, promovendo a redução da concentração de Cl e diminuindo consideravelmente os brancos analíticos.

**Figura 13.** Estudo da concentração de Cl após 5 limpezas para florissil (A) e areia (B) com água ultrapura (■);  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50  $\text{mmol L}^{-1}$  (▒) e álcool etílico 20% (□). Condições: 10 g de florissil (A); 10 g de areia (B); 20 mL de água ultrapura;  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 20 mL de 50  $\text{mmol L}^{-1}$ ; 20 mL de álcool etílico 20%; 3 min de agitação em vórtex e centrifugação por 5 min a 6000 rpm. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.



Para uma melhor visualização dos resultados, foram feitas análises de brancos com os suportes sólidos descontaminados e com os suportes supostamente contaminados, de acordo com a Figura 14.

**Figura 14.** Cromatogramas para areia (A) e florissil (C), ambos antes da descontaminação e para a areia (B) e florissil (D), após a descontaminação.



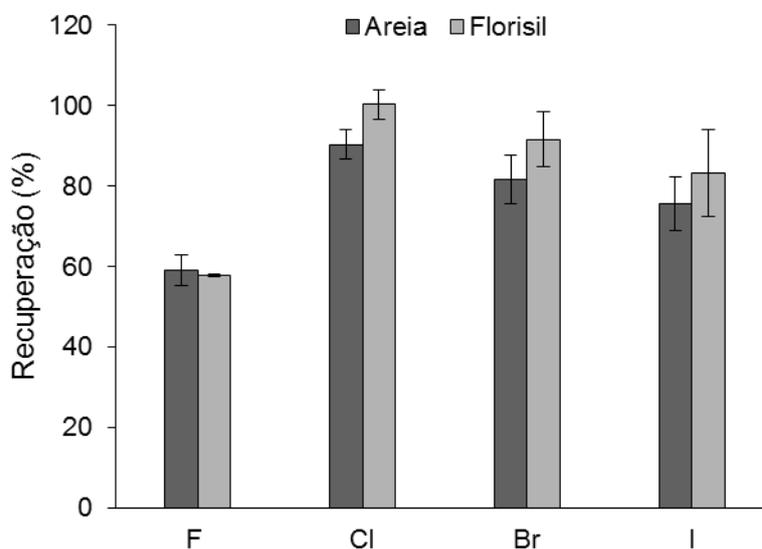
Os cromatogramas representam os brancos para a areia e florissil, antes e após a descontaminação com as 5 limpezas sucessivas com carbonato de amônio 50 mmol L<sup>-1</sup>. A partir dos cromatogramas, foi possível observar uma redução de 99.86% e 97.64% na área do Cl para areia e florissil respectivamente, assim como a redução de outros íons interferentes para os suportes sólidos descontaminados, diminuindo o valor dos brancos para os experimentos posteriores. Após a descontaminação dos suportes sólidos, foi feito um ensaio de recuperação para comparar a areia e o florissil, conforme a Figura 15.

Um aspecto observado a partir dos ensaios de recuperação foi a baixa recuperação obtida para o F. Sabe-se que a maioria dos suportes sólidos empregados neste trabalho são constituídos a base de óxidos e no caso do florissil, o SiO<sub>2</sub> é predominante na sua composição. O íon fluoreto é um poderoso ânion complexante capaz de formar fluoretos estáveis e fluorocomplexos com muitos elementos, especialmente elementos que formam óxidos refratários como Si, Sn, Ti, Zr, Hf, Nb e Ta (KRUG, 2008). Outro aspecto interessante, é que a areia de Bojuru

possui  $\text{TiO}_2$  como um dos seus principais componentes (SALCEDO, *et al.*, 2020). Portanto, as baixas recuperações de F obtidas nestas condições, podem estar associadas com uma possível interação entre o halogênio e a superfície da areia e florissil, dificultando a extração para a solução de  $\text{NH}_4(\text{CO}_3)_2$ .

Ao realizar o teste comparativo de significância estatística, não houve diferença significativa para os valores de recuperação para a areia e o florissil para nenhum dos halogênios. Como o objetivo do trabalho é o desenvolvimento e validação de um método empregando a VA-MSPD para a extração de halogênios, que seja eficiente, simples, rápido, de baixo custo e que atenda os princípios da Química Analítica Verde, a areia foi selecionada como suporte sólido para os experimentos posteriores.

**Figura 15.** Recuperações dos halogênios utilizando areia e florissil como suporte sólido (n=3). As barras de erros representam o RSD(%). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de  $2000 \mu\text{g g}^{-1}$  dos halogênios); 5 min de maceração; 1,0 g de suporte sólido; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.



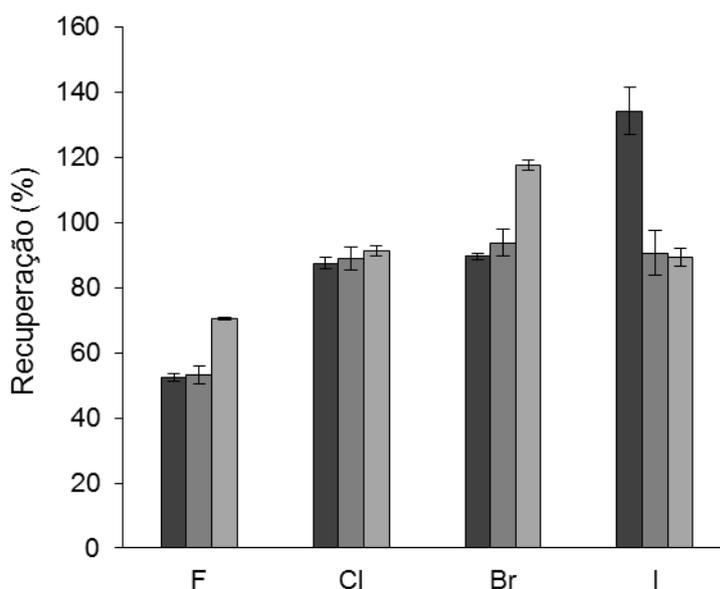
Em outros trabalhos, a areia tem sido avaliada como suporte sólido na MSPD, como no trabalho de Santos *et al.* (2019), os quais utilizaram a areia do mar como suporte sólido alternativo para extrair pesticidas de frutas e vegetais para posterior

determinação por GC-MS e LC-MS/MS. Dawidowicz e Rado (2010) avaliaram a substituição do C18 pela areia para a extração de óleo essencial a partir de hortelã, sálvia, camomila, manjerona, segurelha e orégãos para posterior determinação por GC-MS e GC-FID. Os autores compararam os resultados com a extração com líquido pressurizado (PLE) mostrando que a MSPD com areia é adequada para a extração de óleos essenciais de ervas. Outra aplicação da areia é a sua utilização como suporte sólido na MSPD para a extração de espécies de As em frutos do mar visando a determinação por LC-ICP-MS (MOREDA-PINERO *et al.*, 2008).

#### 4.5.2 Avaliação do tipo de solução extratora

As soluções extratoras avaliadas foram água, solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  1,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , carbonato de amônio 50  $\text{mmol L}^{-1}$  e TMAH 50% (m/v), de acordo com a Figura 16.

**Figura 16.** Recuperações dos halogênios utilizando como solução extratora água (■);  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  3,2  $\text{mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$  1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  (■) e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50  $\text{mmol L}^{-1}$  (■). As barras de erros representam o RSD(%) (n = 3). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de 2000  $\mu\text{g g}^{-1}$  dos halogênios); 1,0 g de areia; 5 min de maceração; 10 mL de solução extratora e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 150.



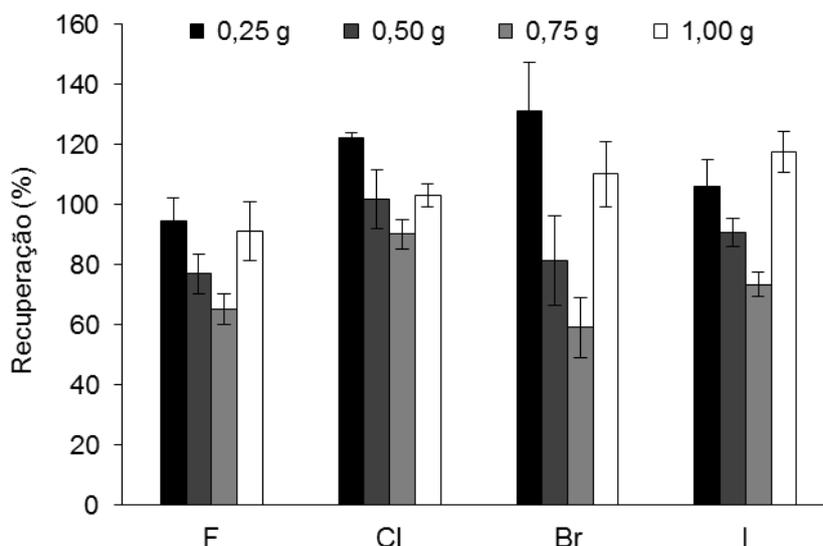
A natureza da solução extratora é um dos principais parâmetros da MSPD, pois é fundamental que a solução tenha maior afinidade pelos analitos, do que a afinidade existente entre os analitos e o conjunto matriz e suporte sólido. Embora alguns trabalhos reportem o uso do TMAH como solução empregada na extração assistida por micro-ondas (MAE) de Br e I em algas (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2011), e a sua utilização como solução extratora de halogênios utilizando aquecimento convencional (MESKO *et al.*, 2010), no presente trabalho o extrato apresentou uma coloração escura intensa, mesmo com a filtração. Portanto, optou-se por não analisar extrato por IC a fim de garantir a integridade do instrumento.

Para as demais soluções avaliadas, observou-se que a influência da solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  é significativa principalmente para o F (70%). As recuperações utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  estiveram entre 70 e 117%. Na avaliação da água como solução extratora, as recuperações estiveram na faixa de 52 a 134% e para o F (52%), houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em comparação com as demais soluções. A solução tampão de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $3,2 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $\text{NaHCO}_3$   $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  foi avaliada por estar na mesma concentração da fase móvel recomendada pelo fabricante. No entanto, a recuperação variou de 53 a 93% e para o F (53%), houve uma significativa diferença ( $p < 0,05$ ) na comparação com a recuperação obtida com a utilização de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (70%). Portanto, a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  foi escolhida para os próximos experimentos. O carácter alcalino da solução aumenta a capacidade de extração, como já observado em alguns trabalhos da literatura para a extração alcalina de halogênios, principalmente soluções de TMAH (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2009; 2011; 2012). Da mesma forma, soluções absorvedoras de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , (PICOLOTO *et al.*, 2014), solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e  $\text{NaHCO}_3$  (TAFLIK *et al.*, 2012), e  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  (COELHO JUNIOR *et al.*, 2017) também tem sido utilizadas na MIC. Mesko *et al.* (2014), determinaram Br e I por ICP-MS em alga marinha comestível empregando a MIC para a decomposição das amostras e a solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  foi utilizada como solução absorvedora. Também é possível encontrar procedimentos baseados no uso de água (RONDAN *et al.*, 2019), e soluções ligeiramente ácidas (YANG *et al.*, 2014; BADOCCO *et al.*, 2016).

#### 4.5.3 Avaliação da massa de suporte sólido

Barker (2007) recomenda a razão 1:4 como a ideal para o desenvolvimento da MSPD. No entanto, não existe uma proporção definida entre a quantidade de amostra e quantidade de suporte sólido, assim como também não há definição para o tempo de maceração. Esses fatores dependem do tipo de analito e da natureza da matriz. A otimização da massa de areia foi feita utilizando a alga Nori, 0,25 g de massa de amostra, 5 min de maceração e a massa de areia foi avaliada entre 0,25 e 1,0 g, nas proporções de 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4, de acordo com a Figura 17.

**Figura 17.** Recuperação dos halogênios utilizando diferentes massa de areia. As barras de erros representam o RSD(%) ( $n = 3$ ). Condições: 0,25 g de amostra (com adição de  $1500 \mu\text{g g}^{-1}$  de F,  $2000 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cl,  $250 \mu\text{g g}^{-1}$  de Br e I); 5 min de maceração; 1,0 g de areia; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.



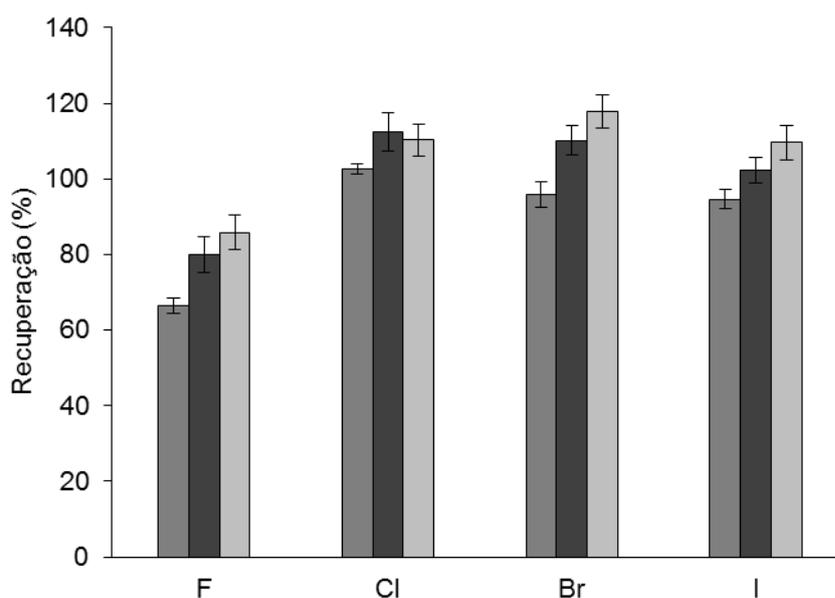
Para o F, as maiores recuperações foram obtidas para as massas de areia de 0,25 g (95%) e 1,00 g (91%) em comparação com os valores de 0,50 g (76%) e 0,75 g (65%). Já o Cl apresentou recuperações aceitáveis (entre 88 e 122%), e praticamente não houve diferença significativa entre as condições avaliadas. Para o Br e I foram verificados comportamentos semelhantes ao F, onde as condições de

0,25 e 1,0 g apresentaram os maiores valores de recuperação em comparação às demais condições. Este comportamento é difícil de explicar, pois parece haver uma tendência na diminuição da recuperação, para todos os halogênios, até 0,75 g. No entanto, as recuperações aumentam com 1,0 g e são muito semelhantes à condição na qual foi utilizada 0,25 g. Considerando a variabilidade na composição das matrizes de algas, optou-se por utilizar a maior massa de suporte sólido avaliada (1,0 g), a fim de garantir a dispersão e a quebra da estrutura física da matriz. Além disso, na condição em que foi utilizado 0,25 g de areia, o RSD para o Br foi muito elevado (12,4%)

#### 4.5.4 Avaliação do tempo de maceração

Os tempos de maceração avaliados foram 1, 3 e 5 min, utilizando 0,25 g de amostra e 1,0 g de areia. Na Figura 18, estão apresentadas as recuperações para os tempos de maceração avaliados.

**Figura 18.** Recuperação dos halogênios utilizando 1 min (■), 3 min (■) e 5 min (■) de maceração. As barras de erros representam o RSD(%) (n=3). Condições: 0,1 g de amostra (com adição de 1500  $\mu\text{g g}^{-1}$  de F, 2000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Cl, 250  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Br e I); 1,0 g de areia; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , 50 mmol  $\text{L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.



Como pode ser observado, foram obtidas as maiores recuperações para a maioria dos halogênios quando foi utilizado o maior tempo de maceração, 5 min. No tempo de 1 min de maceração, o F (66%) não apresentou bons resultados de recuperação, o que pode ser explicado pelo fato de 1 min não ser tempo suficiente para a quebra da estrutura física da amostra e dispersão da matriz. Para Cl, Br e I, neste mesmo tempo de maceração, as recuperações foram aceitáveis, na faixa de 95 a 103%. Em relação ao tempo de 3 min, as recuperações não apresentaram diferença significativa em comparação com o tempo de 5 min. Além disso, é importante notar que as recuperações para F foram mais baixas quando comparada com as recuperações dos demais halogênios para os três tempos avaliados. Em virtude do que pode ser observado, foi considerado o tempo de 5 min para os experimentos posteriores, visando a garantia da completa homogeneização da amostra e rompimento da estrutura da matriz.

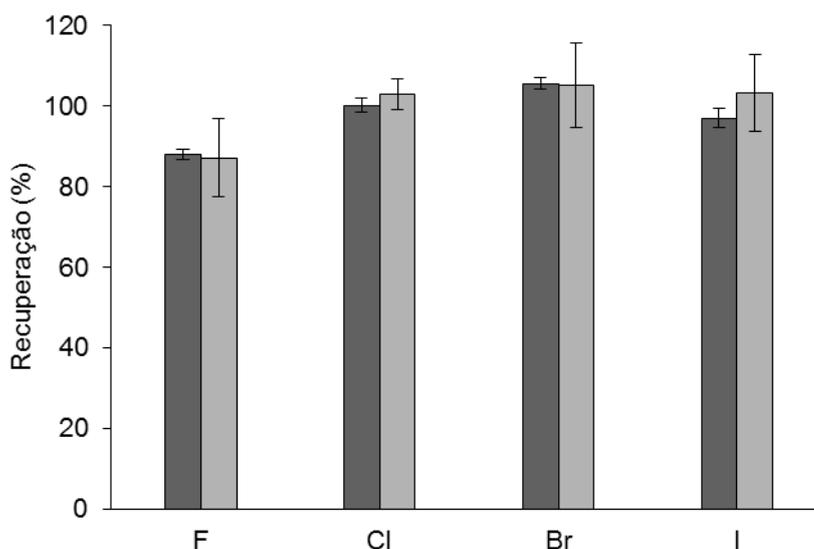
#### 4.5.5 Avaliação da massa de amostra

Os métodos de preparo de amostras baseados em extração, são suscetíveis à presença de interferentes nos extratos e massas de amostra elevadas podem produzir extratos com maior concentração de interferentes e comprometer a vida útil dos equipamentos de quantificação. Por outro lado, menores massas de amostra podem prejudicar os LODs do método. Com o intuito de verificar a possibilidade de reduzir a massa de amostra, foram empregadas as quantidades de 0,1 e 0,25 g de amostra para 1,0 g de areia, na proporção de 1:10 e 1:4 entre massa de amostra e massa de areia, de acordo com a Figura 19.

Comparando os valores de recuperação obtidos para 0,1 e 0,25 g de amostra, nota-se que para todos os halogênios, não foi verificada diferença significativa. Portanto, optou-se em utilizar 0,1 g de amostra visando um extrato com uma menor quantidade de íons interferentes e, conseqüentemente, um menor consumo de filtros para a limpeza dos extratos. Adicionalmente, a condição de 0,1 g de amostra forneceu menores RSDs (inferiores a 2,4%). Também é importante salientar, que a concentração de halogênios em amostras de alga estão, geralmente, na ordem de

$\mu\text{g g}^{-1}$  e a utilização de menores valores de massa de amostra não comprometem a aplicação do método.

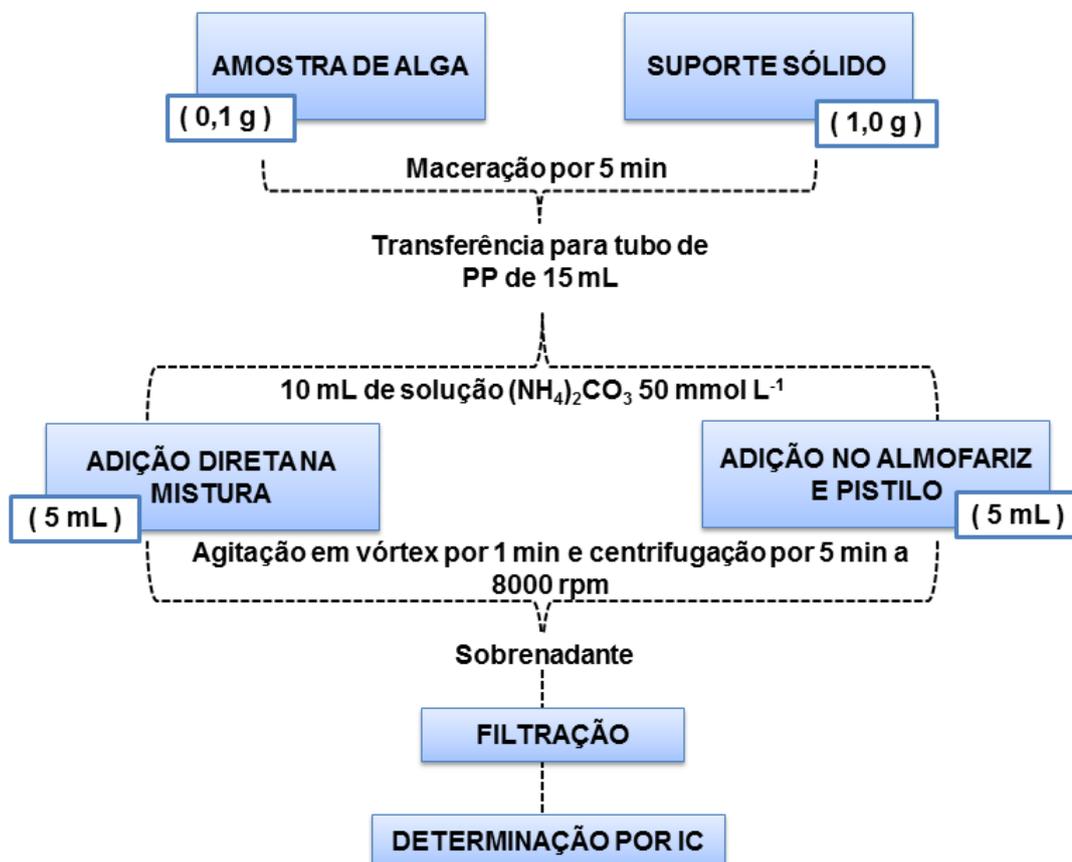
**Figura 19.** Recuperação dos halogênios utilizando 0,1 g de amostra (■) e 0,25 g de amostra (▒). As barras de erro representam RSD(%) (n=3). Condições: amostra com adição de  $1500 \mu\text{g g}^{-1}$  de F,  $2000 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cl,  $250 \mu\text{g g}^{-1}$  de Br e I; 5 min de maceração; 1,0 g de areia; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. Coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.



Alguns autores utilizaram diferentes proporções de massa de amostra e suporte sólido sem comprometer a eficiência da extração, como observado no trabalho de DAWIDOWICZ e RADO (2010), que empregaram a MSPD como método de preparo de amostras e utilizando 0,2 g de amostra, com uma proporção de 1:24 entre amostra e suporte sólido na determinação de óleos essenciais por GC-MS e GC-FID (DAWIDOWICZ e RADO, 2010). Duarte *et al.* (2013), utilizaram a proporção de 0,2 g de amostra para 0,5 g na proporção 1:2,5 de suporte sólido para a determinação de espécies de mercúrio em amostras de peixe por GC-MS.

Após a otimização da VA-MSPD como método de preparo de amostras para a posterior determinação de halogênios por IC, as condições otimizadas foram: 0,1 g de amostra; 1,0 g de areia (descontaminada) como suporte sólido, 5 min de maceração e 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$   $50 \text{ mmol L}^{-1}$  como solução extratora. Na Figura 20, está demonstrado um fluxograma que resume a VA-MSPD otimizada.

Figura 20. Fluxograma da VA-MSPD otimizada.



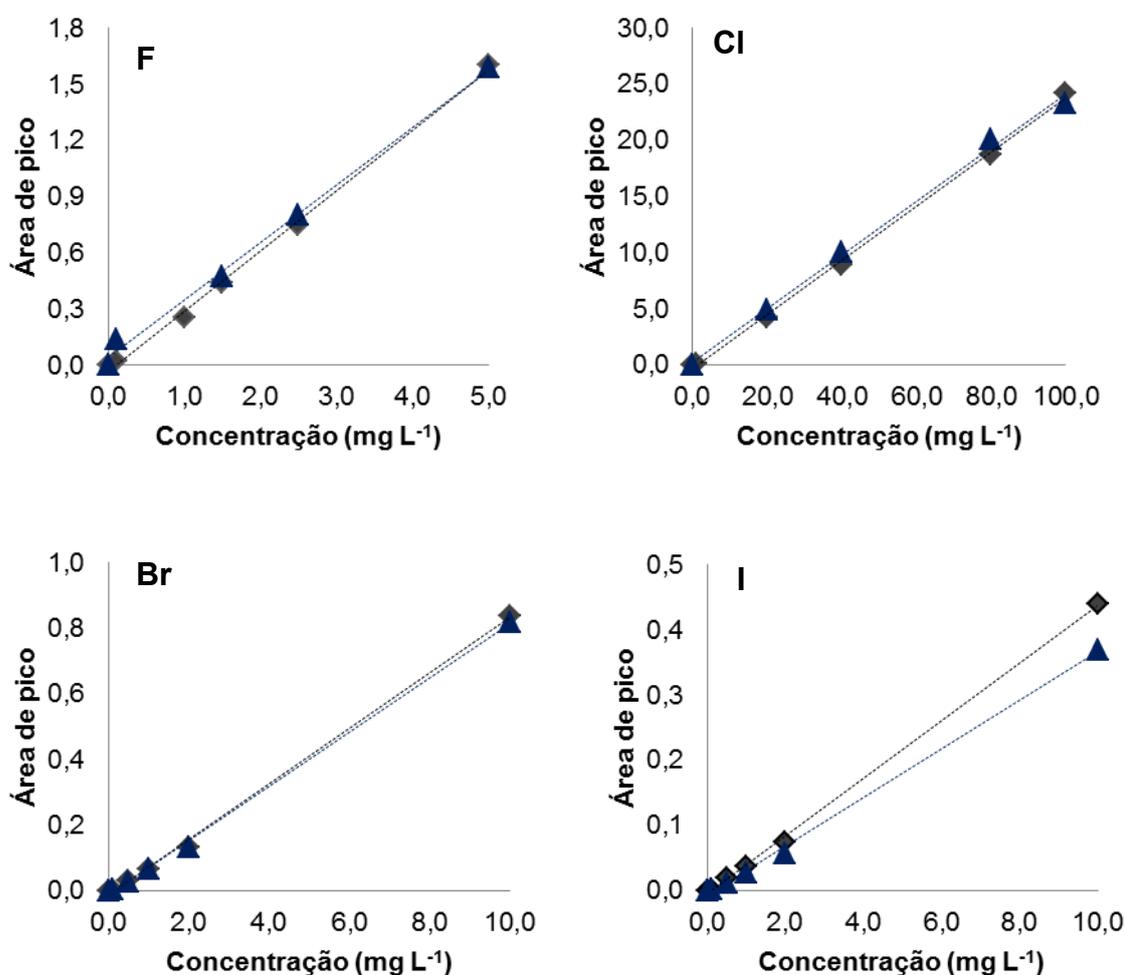
## 4.6 Validação do método

### 4.6.1 Linearidade e efeito de matriz

A linearidade do método foi avaliada utilizando curvas de calibração na faixa de concentração de 0,1 a 5,0 mg L<sup>-1</sup> para F, de 1,0 a 100,0 mg L<sup>-1</sup> para Cl e de 0,1 a 10,0 mg L<sup>-1</sup> para Br e I em amostras de alga do tipo Nori. Estas faixas de concentração estão de acordo com as concentrações dos halogênios comumente encontradas em amostras de algas. O estudo foi realizado tanto com curvas de calibração externa em solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  50 mmol L<sup>-1</sup>, como com curvas de

adição de padrão, através da adição dos analitos na amostra, antes da extração com as condições da VA-MSPD otimizadas, ambas na mesma faixa de concentração, com no mínimo 5 níveis de concentração. Na Figura 21, estão apresentadas as curvas de calibração externa e de adição de padrão e na Tabela 6 os parâmetros de regressão das curvas de calibração.

**Figura 21.** Curvas de calibração externa ( ■ ) e por adição de padrão ( ▲ ) para F, Cl, Br, I. Condições: 0,1 g de amostra; 1,0 g de areia; 5 min de maceração; 10 mL de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ,  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  e 1 min de agitação em vórtex. coluna cromatográfica: Metrosep A Supp 5 - 250.



**Tabela 6.** Parâmetros de regressão para as curvas de calibração externa e de adição de padrão.

Elementos	Faixa de concentração (mg L <sup>-1</sup> )	Curva de calibração externa	R <sup>2</sup>	Curva de adição de padrão	R <sup>2</sup>
F	0,1-5,0	$y = 0,3216x - 0,0301$	0,9978	$y = 0,3067x + 0,8896$	0,9954
Cl	1,0-100,0	$y = 0,2412x - 0,3061$	0,9987	$y = 0,2382x + 20,827$	0,9967
Br	0,1-10,0	$y = 0,0847x - 0,0133$	0,9983	$y = 0,0828x + 0,0581$	0,9985
I	0,1-10,0	$y = 0,0443x - 0,0045$	0,9992	$y = 0,0373x + 0,0066$	0,9982

Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram maiores que 0,9954 para ambas as curvas de calibração, o que é considerado adequado para a linearidade da curva de calibração segundo as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2018), os quais estabelecem como parâmetro de linearidade os coeficientes de determinação maiores ou iguais a 0,99 e 0,90, respectivamente. Portanto, para ambas as curvas de calibração, o método mostrou-se linear dentro dos intervalos de concentração estudados.

O efeito de matriz também foi avaliado por meio das curvas de calibração anteriormente demonstradas, através da comparação dos coeficientes angulares das duas curvas de calibração. Com isso, foi possível verificar a influência dos componentes da matriz na possibilidade de supressão ou enriquecimento de sinal no sistema de detecção. Com o intuito de minimizar qualquer efeito na variação da resposta instrumental, as curvas analíticas foram preparadas no mesmo dia. Na Figura 21, estão mostradas as mesmas curvas apresentadas anteriormente, mas com as curvas de adição de padrão com os valores dos sinais analíticos subtraídos dos valores dos sinais dos analitos presentes nas amostras para uma melhor comparação visual da inclinação das duas curvas.

Pode-se verificar através da comparação do coeficiente angular das duas curvas que não há influência dos componentes da matriz no sistema de detecção para F, Cl, Br e I, pois praticamente não existe diferença nas inclinações das duas curvas. A presença do efeito de matriz na determinação dos analitos pode ser observada de forma positiva (enriquecimento de sinal) ou negativa (supressão de sinal) (LANÇAS, 2009). Utilizando as equações propostas por Economou *et al.*

(2009) para a quantificação do efeito de matriz, observa-se que houve baixo efeito de matriz, com valores de -3,28% para F, -3,40% para Cl, -0,121% para Br e -13,6% para I. Estes valores são considerados efeitos de matriz baixos.

Na literatura não há discussão a respeito do efeito de matriz para a determinação de halogênios em amostras de algas por IC. No entanto, os efeitos de matriz mostraram-se baixos, não ocasionando prejuízos para a quantificação dos halogênios, a qual foi realizada através de curva de calibração externa preparadas em solução de carbonato de amônio 50 mmol L<sup>-1</sup>.

#### 4.6.2 Limite de detecção e quantificação

Os valores de LOD e LOQ foram estabelecidos a partir dos parâmetros da curva de calibração externa, utilizando o intervalo de confiança de 99%. Foram preparadas curvas de calibração nas faixas de concentração variando entre 0,1 e 2,5 mg L<sup>-1</sup> para todos os halogênios, utilizando 5 pontos, em triplicata para cada ponto, conforme a Tabela 7.

**Tabela 7.** Resultados determinados para o LOD e LOQ do instrumento e do método.

Halogenios	LOD <sup>a</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	LOD <sup>b</sup> (µg g <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>c</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	LOQ <sup>d</sup> (µg g <sup>-1</sup> )
F	0,27	27	0,33	33
Cl	0,26	26	0,32	32
Br	0,19	19	0,24	24
I	0,28	28	0,35	35

<sup>a</sup>LOD do instrumento; <sup>b</sup>LOD do método; <sup>c</sup>LOQ do instrumento; <sup>d</sup>LOQ do método

Os valores de LOD do método estiveram entre 19 e 28 µg g<sup>-1</sup> e os valores de LOQ entre 24 e 35 µg g<sup>-1</sup>. Estes valores estão de acordo com as faixas de concentração determinadas nas amostras, permitindo a quantificação da maioria dos elementos nas amostras analisadas. Após a definição dos valores de LOQ instrumental, este foi inserido como o primeiro ponto das curvas de calibração externa utilizadas nos experimentos posteriores.

#### 4.6.3 Exatidão e precisão

A exatidão e precisão do método foi avaliada de três formas: *i*) através da aplicação do método otimizado em CRMs de folhas de maçã (NIST 1515) e folhas de pêssego (NIST 1547); *ii*) através da comparação de métodos utilizando como método comparativo a determinação dos halogênios por ICP-MS e ISE, após decomposição das amostras por MIC e *iii*) através de ensaios de recuperação utilizando a amostra de alga Nori. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade.

##### 4.6.3.1 Análise dos CRMs

Na Tabela 8, estão apresentadas as concentrações determinadas e certificadas para os CRMs, após determinação dos halogênios por IC e extração por VA-MSPD.

**Tabela 8.** Determinação dos halogênios por IC, após extração por VA-MSPD em CRMs (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n = 3$ )

Elemento	NIST 1547		NIST 1515	
	Valor determinado	Valor certificado	Valor determinado	Valor certificado
Cl	364 $\pm$ 20	361 $\pm$ 14	562 $\pm$ 41	582 $\pm$ 15
Br	< 24	11	< 24	1,8
I	< 35	0,3	< 35	0,3

Para a concentração de F não foi possível avaliar a exatidão com os CRMs, pois estes continham apenas as concentrações certificadas para Cl e informadas para Br e I. De acordo com os resultados, é possível observar que após a extração e quantificação, os valores para Cl apresentaram boa concordância (101% para NIST 1547 e 97% para NIST 1515) com os valores de referência, com RSDs inferiores a 6%. Além disso, também não foi verificada diferença significativa entre os valores

determinados e de referência. Para Br e I, os valores determinados estiveram abaixo do LOQ do método e não foi possível comparar com os valores de referência. Por isso, foram avaliadas outras duas formas de avaliação da exatidão e precisão.

#### 4.6.3.2 Comparação de métodos

O método comparativo consistiu na determinação de Cl, Br e I por ICP-MS e a determinação de F por ISE em amostras de alga Nori, após decomposição por MIC. Estes resultados foram comparados com os obtidos pelo método proposto neste estudo. Na Tabela 9, estão apresentados os resultados obtidos pelos dois métodos.

**Tabela 9.** Estudo de comparação de métodos utilizando o método proposto (VA-MSPD/IC) para a determinação de F, Cl, Br e I e o método comparativo (MIC/ISE para F e MIC/ICP-MS para Cl, Br e I) (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n = 3$ ).

Elemento	Método proposto	Método comparativo*
F	161 $\pm$ 4	129 $\pm$ 1
Cl	6528 $\pm$ 300	6310 $\pm$ 230
Br	60 $\pm$ 4	55 $\pm$ 3
I	< 35	37 $\pm$ 1

\* Método empregando MIC-ISE para F e MIC-ICP-MS para Cl, Br e I.

A partir da comparação dos métodos, foi possível observar que os valores obtidos pelo método proposto foram concordantes para a maioria dos halogênios (concordância entre 103 e 124%), com RSDs inferiores a 6,5%. Para o F (124%), o valor obtido pelo método proposto foi ligeiramente superior ao obtido pelo método comparativo, mas para os demais elementos determinados não houve diferença significativa nos resultados obtidos, enquanto que para o I os valores ficaram abaixo do LOQ para o método proposto.

#### 4.6.3.3 Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação foram realizados através da adição de concentrações conhecidas dos halogênios em amostras de alga Nori, nas concentrações de  $200 \mu\text{g g}^{-1}$  para F;  $2500 \mu\text{g g}^{-1}$  para Cl e  $100 \mu\text{g g}^{-1}$  para Br e I. Após 24 h, as amostras foram submetidas a extração pelo método proposto nas condições otimizadas. É importante ressaltar, que estas concentrações adicionadas foram escolhidas com base nas concentrações comumente encontradas na literatura para amostras de alga. Na Tabela 10, estão apresentados os resultados para os ensaios de recuperação.

**Tabela 10.** Ensaio de recuperação com a determinação de halogênios por IC, após extração por MSPD (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ ,  $n = 3$ ).

Elemento	Valor adicionado	Valor determinado	Recuperação (%)
F	0	$161 \pm 4$	108
	200	$378 \pm 46$	
Cl	0	$6528 \pm 300$	93
	2500	$8853 \pm 790$	
Br	0	$60 \pm 4$	100
	100	$160 \pm 8$	
I	0	$< 35$	92
	100	$92 \pm 10$	

Os valores obtidos para os ensaios de recuperação de F, Cl, Br e I estiveram entre 92 e 108%, com RSDs inferiores a 12%, sendo considerados valores aceitáveis para a avaliação da exatidão e precisão do método.

#### 4.6.4 Determinação dos halogênios em amostras de algas

As condições da MSPD foram otimizadas para a amostra de alga Nori e, posteriormente, o método foi aplicado em amostras de algas Wakame, Kombu e Hijiki. Os valores de concentração estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Determinação de halogênios por IC, após extração por MSPD em amostras de algas comestíveis (resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , n = 3).

Amostras	F	Cl	Br	I
Nori	161 $\pm$ 4	6528 $\pm$ 300	60 $\pm$ 4	< 35
Wakame	< 33	101596 $\pm$ 11263	129 $\pm$ 18	< 35
Kombu	< 33	93692 $\pm$ 9755	395 $\pm$ 64	3542 $\pm$ 432
Hijiki	427 $\pm$ 32	29707 $\pm$ 2013	99 $\pm$ 3	61 $\pm$ 11

De acordo com os resultados, é possível perceber bastante diferença nas concentrações de F, Cl, Br e I para as espécies de algas analisadas. Essa diferença na composição nutricional entre as espécies de algas pode ser justificada pela influência das condições ambientais, origem geográfica e tempo de colheita (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2012). O Cl foi o elemento que apresentou maiores concentrações em todas as espécies, sendo a menor concentração observada na alga Nori, uma espécie de alga vermelha, enquanto que as espécies Wakame, Kombu e Hijiki são algas marrons. Em geral, o teor de I é mais baixo nas algas verdes e vermelhas do que nas algas marrons (ROMARÍS-HORTAS *et al.*, 2009). Entre as algas marrons, a Wakame é a espécie que possui um teor mais baixo de I (MOURITSEN e MOURITSEN, 2013), o que está de acordo com os valores encontrados para I neste estudo, visto que a concentração de I nas algas Wakame esteve abaixo do LOQ.

ROMARÍS-HORTAS *et al.* (2009), determinaram a concentração de Br e I em diferentes espécies de algas comestíveis colhidas na Galiza (Noroeste da Espanha) e observaram que as maiores concentrações desses elementos foram encontradas nas algas Kombu, o que está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho,

pois as maiores concentrações de Br ( $395 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e I ( $3542 \mu\text{g g}^{-1}$ ) determinadas pelo método proposto foram encontradas nesta espécie. Para a alga Nori, os autores obtiveram valores entre 59 e  $116 \mu\text{g g}^{-1}$  para Br e entre 35 e  $102 \mu\text{g g}^{-1}$  para I. Em comparação com os resultados obtidos pelo método proposto, as concentrações destes elementos estão de acordo,  $60 \mu\text{g g}^{-1}$  para Br e menor que o LOQ ( $35 \mu\text{g g}^{-1}$ ) para I.

#### 4.6.5 Robustez

A robustez foi avaliada durante a etapa de otimização da extração por MSPD, avaliando a massa de amostra com os valores de 0,1 e 0,25 g. Os resultados mostraram que para todos os halogênios em estudo, as recuperações não foram influenciadas pela massa de amostra e não foi observada diferença significativa entre os resultados, mostrando que o método é robusto frente a variações de massa de amostra.

## 5. CONCLUSÕES

---

O método de preparo de amostras empregando a VA-MSPD mostrou-se adequado para a determinação de F, Cl, Br e I por IC em algas comestíveis do tipo Nori (*Porphyra spp.*), Wakame (*Undaria pinnatifida*), Kombu (*Laminaria ochroleuca*) e Hijiki (*Hizikia fusiformis*). Os principais parâmetros da VA-MSPD foram avaliados e foram obtidas recuperações quantitativas para todos os halogênios.

A proposta do uso da areia como suporte sólido, um material natural, em combinação com a extração alcalina na VA-MSPD, mostrou-se eficiente para a extração dos halogênios em amostras de algas, contribuindo com os princípios da Química Analítica Verde e com redução do custo do procedimento. Mostra-se assim, que é possível utilizar um suporte sólido verde, como a areia, na VA-MSPD para a determinação de F, Cl, Br e I em diferentes espécies de algas, com eficiência de extração comparável com suportes sólidos comerciais.

Através do estudo da linearidade e do efeito de matriz, foi possível comparar as curvas de calibração externa com as curvas de adição de padrão, verificando baixo efeito de matriz. Os LODs do método foram de 27, 26, 19 e 28  $\mu\text{g g}^{-1}$  para F, Cl, Br e I, respectivamente, enquanto que os LOQs foram de 33, 32, 24 e 35  $\mu\text{g g}^{-1}$  para F, Cl, Br e I, respectivamente. O procedimento de extração apresentou exatidão e precisão adequada na análise dos CRMs, na comparação entre métodos e nos ensaios de recuperação.

Desta forma, o método proposto contribuiu com o desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a determinação de halogênios de forma inédita, visto que é a primeira aplicação da VA-MSPD para a extração de halogênios em amostras de algas, além de propor a utilização de um suporte sólido verde, a areia. Além disso, o método apresentou também vantagens como eficiência na extração, simplicidade na operação, baixo custo, redução de etapas, diminuição da massa de amostra e o emprego de soluções aquosas de extração, atendendo aos princípios da Química Analítica Verde.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

ANSARI, F. A.; GUPTA, S. K.; NASR, M.; RAWAT, I.; BUX, F. Evaluation of various cell drying and disruption techniques for sustainable metabolite extractions from microalgae grown in wastewater: A multivariate approach. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 634-643, 2018.

ANSARI, F. A.; NASR, M.; GULDHE, A.; GUPTA, S. K.; RAWAT, I.; BUX, F. Techno-economic feasibility of algal aquaculture via fish and biodiesel production pathways: A commercial-scale application. **Science of the Total Environment**, v. 704, p. 135-259, 2020.

ANTES, F. G.; DUARTE, F. A.; FLORES, É. L.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, É. M.; DRESSLER, V. L. Preparo de amostras de combustíveis fósseis por pirolíse para a determinação de flúor e cloro. **Química Nova**, v. 33, p. 1130-1134, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166 - Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.

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

BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; BISPO, L. D. S.; LYRA, F. H.; DAVID, J. M.; KORN, M. D. 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**, v. 6, p. 1065-1070, 2013.

BARBOT, Y. N.; AL-GHAILI, H.; BENZ, R. A review on the valorization of macroalgal wastes for biomethane production. **Marine drugs**, v. 14, p. 120, 2016.

BARKER, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). **Journal of iochemical and biophysical methods**, v. 70, p. 151-162, 2007.

BARKER, S. A. Matrix solid-phase dispersion. **Journal of chromatography A**, v. 885, p. 115-127, 2000.

BARKER, S. A.; LONG, A. R.; SHORT, C. R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. **Journal of Chromatography A**, v. 475, p. 353-361, 1989.

BECHLIN, M. A.; FERREIRA, E. C.; NETO, J. A. G. Determination of chlorine in cement via CaCl molecule by high-resolution continuum source graphite furnace

molecular absorption spectrometry with direct solid sample analysis. **Microchemical Journal**, v. 132, p. 130-135, 2017.

BELITZ, I. H. D.; GROSCH, I. W. **Food chemistry**. Springer Science & Business Media, 2013.

BHATTACHARYYA, L.; ROHRER, J. S. Applications of ion chromatography for pharmaceutical and biological products. **John Wiley & Sons**, 2012.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. As algas do Brasil. Catálogo de plantas e fungos do Brasil, v. 1, p. 49-60, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável**, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia de recomendação para uso de fluoretos no Brasil. 2009.

CACHO, F.; MACHYNAK, L.; NEMECEK, M.; BEINROHR, E. Determination of bromide in aqueous solutions via the TIBr molecule using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 144, p. 63-67, 2018.

CALDAS, S. S.; BOLZAN, C. M.; MENEZES, E. J. D.; ESCARRONE, A. L. V.; MARTINS, C. D. M. G.; BIANCHINI, A.; PRIMEL, E. G. A vortex-assisted MSPD method for the extraction of pesticide residues from fish liver and crab hepatopancreas with determination by GC-MS. **Talanta**, v. 112, p. 63-68, 2013.

CALDAS, S. S.; ROMBALDI, C.; CERQUEIRA, M. B. R.; SOARES, B. M.; PRIMEL, E. G. Avanços recentes da MSPD para extração de resíduos de agrotóxicos, PPCPs, compostos inorgânicos e organometálicos. **Scientia Chromatographica**, v. 5, p. 190-213, 2013.

CAO, J.; PENG, L. Q.; XU, J. J.; DU, L. J.; ZHANG, Q. D. Simultaneous microextraction of inorganic iodine and iodinated amino acids by miniaturized matrix solid-phase dispersion with molecular sieves and ionic liquids. **Journal of Chromatography A**, v. 1477, p. 1-10, 2016.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; FOGLIA, P.; SAMPERI, R.; STAMPACHIACCHIERE, S.; VENTURA, S.; LAGANÀ, A. Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 186-193, 2015.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; GIANANTI, P.; GUBBIOTTI, R.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. **Journal of chromatography A**, v. 1217, p. 2521-2532, 2010.

CARVALHO, D. P.; DUPUY, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 458, p. 6-15, 2017.

CHEN, Q.; LIN, Y.; TIAN, Y.; WU, L.; YANG, L.; HOU, X.; ZHENG, C. Single-drop solution electrode discharge-induced cold vapor generation coupling to matrix solid-phase dispersion: A robust approach for sensitive quantification of total mercury distribution in fish. **Analytical chemistry**, v. 89, p. 2093-2100, 2017.

CHEW, K. W.; YAP, J. Y.; SHOW, P. L.; SUAN, N. H.; JUAN, J. C.; LING, T. C.; LEE, D. J. e CHANG, J. S. Microalgae biorefinery: high value products perspectives. **Bioresource technology**, v. 229, p. 53-62, 2017.

CHOUDHARY, P.; ASSEMAN, P. P.; NAAZ, F.; BHATTACHARYA, A.; CASTRO, J. D. S.; COUTO, E. D. A. D. C.; CALIJURI, M. L.; PANT, K. K.; MALIK, A. A review of biochemical and thermochemical energy conversion routes of wastewater grown algal biomass. **Science of The Total Environment**, v.726, p. 137961, 2020.

COELHO JUNIOR, G. S.; PEREIRA, R. M.; HARTWIG, C. A.; TORALLES, I. G.; PEREIRA, C. M. P.; COSTA, V. C.; MESKO, M. F. Determinação de Cl e S em Algas Marinhas Comestíveis por Cromatografia de Íons após Decomposição por Combustão Iniciada por Micro-ondas. **Revista Virtual de Química**, v. 9, p. 492-501 2017.

COUTO, R. D. R.; FAVERSANI, J.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; MARCHEZAN, C.; FACCO, D. B.; GARLET, L. P.; SILVA, J. S.; COMIN, J. J.; BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BRUNETTO, G. Health risk assessment and soil and plant heavy metal and bromine contents in field plots after ten years of organic and mineral fertilization. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 153, p. 142-150, 2018.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**, Unicamp: Campinas, p. 453-453, 2006.

COSTA, V. C.; PICOLOTO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. e MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, p. 7957-7964, 2015.

CPRM. SERVIÇO GEOLÓGICO DO BRASIL. Disponível em: <http://www.cprm.gov.br/publique/Redes-Institucionais/Rede-de-Bibliotecas---Rede-Ametista/Os-Muitos-Usos-do-Diatomito-1296.html>. Acesso: 27/06/20.

DASAN, Y. K., LAM, M. K., YUSUP, S., LIM, J. W., & LEE, K. T. Life cycle evaluation of microalgae biofuels production: Effect of cultivation system on energy, carbon emission and cost balance analysis. **Science of the total environment**, v. 688, p. 112-128, 2019.

DAWIDOWICZ, A. L.; RADO, E. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) in chromatographic analysis of essential oils in herbs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 52, p. 79-85, 2010.

DENG, D.; ZHANG, S.; CHEN, H.; YANG, L.; YIN, H.; HOU, X.; ZHENG, C. Online solid sampling platform using multi-wall carbon nanotube assisted matrix solid phase dispersion for mercury speciation in fish by HPLC-ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 30, p. 882-887, 2015.

DIMITRAKAKIS, E.; JANZ, A.; BILITEWSKI, B.; GIDARAKOS, E. Determination of heavy metals and halogens in plastics from electric and electronic waste. **Waste Management**, v. 29, p. 2700-2706, 2009.

DOLPHIN, A. E.; NAFTEL, S. J.; NELSON, A. J.; MARTIN, R. R.; WHITE, C. D. Bromine in teeth and bone as an indicator of marine diet. **Journal of archaeological Science**, v. 40, p. 1778-1786, 2013.

DOWNS, A. J.; ADAMS, C. J. The Chemistry of Chlorine, Bromine, Iodine and Astatine: Pergamon Texts in Inorganic Chemistry. Elsevier, 2017.

DRESSLER, V. L.; POZEBON, D.; FLORES, É. L.; PANIZ, J. N.; FLORES, É. M. Determination of fluoride in coal using pyrohydrolysis for analyte separation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 334-338, 2003.

DRUZIAN, G. T.; NASCIMENTO, M. S.; SANTOS, R. F.; PEDROTTI, M. F.; BOLZAN, R. C.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. New possibilities for pharmaceutical excipients analysis: Combustion combined with pyrohydrolysis system for further total chlorine determination by ICP-OES. **Talanta**, v. 199, p. 124-130, 2019.

DUARTE, F. A.; SOARES, B. M.; VIEIRA, A. A.; PEREIRA, E. R.; MACIEL, J. V.; CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Assessment of modified matrix solid-phase dispersion as sample preparation for the determination of  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  and  $\text{Hg}^{2+}$  in fish. **Analytical chemistry**, v. 85, p. 5015-5022, 2013.

ECONOMOU, A.; BOTITSI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography A**, v. 1216, p. 5856-5867, 2009.

EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. Práticas em Cromatografia de íons-uma introdução. Monografia Metrohm, 2006.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. Saudi Pharmaceutical Journal, v. 18, p. 1-25, 2010.

ENSMINGER, M. E.; ENSMINGER, A. H. Foods & Nutrition Encyclopedia, Two Volume Set. CRC press, 1993.

FERDOUSE, F.; HOLDT, S. L.; SMITH, R.; MURUA, P.; YANG, Z. The global status of seaweed production, trade and utilization. **Globefish Research Programme**, v. 124, p. 1, 2018.

FLORES, E. M.; MESKO, M. F.; MORAES, D. P.; PEREIRA, J. S.; MELLO, P. A.; BARIN, J. S.; KNAPP, G. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 1865-1870, 2008.

FLÓREZ, M. R.; RESANO, M. Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 88, p. 32-39, 2013.

FORTI, M. C.; ALCAIDE, R. L. M. Protocolo de determinação de ânions inorgânicos em soluções aquosas por cromatografia iônica, INPE, São José dos Campos, 2012.

FRENZEL, W.; MICHALSKI, R. Sample preparation techniques for ion chromatography. **Application of IC-MS and IC-ICP-MS in Environmental Research**, p. 210-266, 2016.

MICHALSKI, Rajmund (Ed.). Application of IC-MS and IC-ICP-MS in environmental research. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2016.

FRITZ, J. S.; GJERDE, D. T. **Ion chromatography**, Willey, 2009.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78-84, 2013.

GANJALI, M. R.; NOROUZI, P.; GHOMI, M.; SALAVATI-NIASARI, M. Highly selective and sensitive monohydrogen phosphate membrane sensor based on molybdenum acetylacetonate. **Analytica chimica acta**, v. 567, p. 196-201, 2006.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. Chemistry of the Elements. Elsevier, 2012.

GUERRA, R. Cadernos CB Virtual 2 do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Paraíba, Biologia e Sistemática de Fungos, Algas e Briófitas, 2011.

GULERI, S.; TIWARI, A. Algae and Ageing. In: Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products. Springer, Singapore, p. 267-293, 2020.

HADDAD, P. R.; JACKSON, P. E. **Ion chromatography**. Elsevier, 1990.

HADDAD, P. R.; JACKSON, P. E.; SHAW, M. J. Developments in suppressor technology for inorganic ion analysis by ion chromatography using conductivity detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 725-742, 2003.

HALKA, M.; NORDSTROM, B. Halogens and Noble Gases. Infobase publishing, 2010.

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa, 7ª Edição. LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora SA, Rio de Janeiro-RJ, 2008.

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**, v. 6, p. 7540-7546, 2014.

HEROD, M. N.; CORNETT, R. J.; CLARK, I. D.; KIESER, W. E.; JEAN, G. S. Extraction of <sup>129</sup>I and <sup>127</sup>I via combustion from organic rich samples using <sup>125</sup>I as a quantitative tracer. **Journal of environmental radioactivity**, v. 138, p. 323-330, 2014.

HERTZOG, G. I.; SOARES, K. L., CALDAS, S. S.; PRIMEL, E. G. Study of vortex-assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4793-4803, 2015.

HOFMANN, N. R.; PANIZ, J. N. G.; FLORES, E. M. D. M.; PEDROTTI, M. F.; DRESSLER, V. L. Determination of halogens in cardboard gaskets using pyrohydrolysis. **Analytical Letters**, v. 49, p. 1903-1916, 2016.

HOLMAN, J. S. e STONE, P., Chemistry. Nelson Thornes. 2ª ed. 2001.

HORWITZ, W.; LATIMER, G. W. **Official Methods of Analysis of Association of Analytical Chemists International**. 18º ed, Gaythersburg: AOAC International, 2005.

HOU, X.; CHAI, C.; QIAN, Q.; LI, C.; WANG, K. Determination of bromine and iodine in biological and environmental materials using epithermal neutron activation analysis. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 357, p. 1106-1110, 1997.

HOU, X.; LI, C.; DING, W.; QIAN, Q.; CHAI, C. Determination of 24 elements in four algae reference materials by neutron activation analysis and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 360, p. 423-426, 1998.

HOU, X.; YAN, X. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. **Science of the Total Environment**, v. 222, p. 141-156, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL-INMETRO. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: 07- Julho de 2018.

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

KOŃCZYK, J.; MUNTEAN, E.; GEGA, J.; FRYMUS, A.; MICHALSKI, R. Major inorganic anions and cations in selected European bottled waters. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 197, p. 27-36, 2019.

KRAWCZYK-CODA, M.; STANISZ, E. Determination of fluorine in herbs and water samples by molecular absorption spectrometry after preconcentration on nano-TiO<sub>2</sub> using ultrasound-assisted dispersive micro solid phase extraction. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 409, p. 6439-6449, 2017.

KRUG, J. F. Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Edição rev. 2010.

KÜHN, M.; NIEWÖHNER, C.; ISENBECK-SCHRÖTER, M.; SCHULZ, H. D. Determination of major and minor constituents in anoxic thermal brines of deep sandstone aquifers in Northern Germany. **Water Research**, v. 32, p. 265-274, 1998.

KÜPPER, F. C.; CARPENTER, L. J.; LEBLANC, C.; TOYAMA, C.; UCHIDA, Y.; MASKREY, B. H.; ROBINSON, J.; VERHAEGHE, E. F.; MALIN, G.; LUTHER III, G. W.; KRONECK, P. M. H.; KLOAREG, B.; MEYER-KLAUCKE, W.; MURAMATSU, Y.; MEGSON, I. L.; POTIN, P.; FEITERS, M. C. In vivo speciation studies and antioxidant properties of bromine in *Laminaria digitata* reinforce the significance of iodine accumulation for kelps. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 2653-5664, 2013.

LA GUARDIA, M. D.; GARRIGUES, S. **Handbook of mineral elements in food**. John Wiley & Sons, 2015.

LANÇAS, Fernando Mauro. Cromatografia Líquida moderna: HPLC/CLAE. 2009.

LEANDRO, A.; PEREIRA, L.; GONÇALVES, A.M.M. Diverse Applications of Marine Macroalgae. **Marine Drugs**, v. 18, p. 17, 2020.

LEE, John David. Química inorgânica não tão concisa. Editora Blucher, 1999.

LIMCHOOWONG, N.; SRICHAROEN, P.; TECHAWONGSTIEN, S.; KONGSRI, S.; CHANTHAI, S. A green extraction of trace iodine in table salts, vegetables, and food products prior to analysis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 540-546, 2017.

MACHYŇÁK, L.; ČACHO, F.; NĚMEČEK, M.; BEINROHR, E. Determination of trace concentrations of chlorine in aqueous solutions by high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 125, p. 140-145, 2016.

MARELLA, T. K.; LÓPEZ-PACHECO, I. Y.; PARRA-SALDÍVAR, R.; DIXIT, S.; TIWARI, A. Wealth from waste: Diatoms as tools for phycoremediation of wastewater and for obtaining value from the biomass. **Science of The Total Environment**, p. 137960, 2020.

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

MENDES, A. L. G.; NASCIMENTO, M. S.; PICOLOTO, R. S.; FLORES, E. M.; MELLO, P. A. A sample preparation method for fluoride detection by potentiometry with ion-selective electrode in medicinal plants. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 231, p. 109459, 2020.

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

MESKO, M. F., BALBINOT, F. P., SCAGLIONI, P. T., NASCIMENTO, M. S., PICOLOTO, R. S., & DA COSTA, V. C. Determination of halogens and sulfur in honey: a green analytical method using a single analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 1-10, 2020.

MESKO, M. F.; COSTA, V. C.; SILVA, J. S.; SCAGLIONI, P. T.; FROHLICH, A. C.; DUARTE, F. A.; FLORES, E. M. A Novel Method for Chlorine and Sulfur Determination in Gluten-Free and Gluten-Containing Edible Flours from Different Raw Materials and Countries. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 1799-1805, 2020

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

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

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

MESKO, M. F.; TORALLES, I. G.; COELHO JUNIOR, G. S.; RONDAN, F. S.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A.; SCAGLIONI, P. T. Ion chromatography coupled to mass spectrometry as a powerful technique for halogens and sulfur determination in

egg powder and its fractions. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, p. e8775, 2020.

MESKO, M. F.; TORALLES, I. G.; CRIZEL, M. G.; COSTA, V. C.; PIRES, N. R. X.; PEREIRA, C. M. P. D.; 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**, v. 37, p. 964-968, 2014.

MESKO, M. F.; TORALLES, I. G.; HARTWIG, C. A.; COELHO JR, G. S.; MULLER, A. L.; BIZZI, C. A.; MELLO, P. A. Bromine and iodine contents in raw and cooked shrimp and its parts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, p. 1817-1822, 2016.

MICHALSKI, R. Applications of ion chromatography for the determination of inorganic cations. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, p. 230-250, 2009.

MICHALSKI, R. Ion chromatography as a reference method for determination of inorganic ions in water and wastewater. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 36, p. 107-127, 2006.

MICHALSKI, R.; PECYNA-UTYLSKA, P.; KERNERT, J. Ion Chromatography and Related Techniques in Carboxylic Acids Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1-16, 2020.

MISHRA, V. G.; DAS, M. K.; SHAH, D. J.; JEYAKUMAR, S.; TOMAR, B. S.; RAMAKUMAR, K. L. Simultaneous determination of borate, chloride and molybdate in pyrohydrolysis distillates of plant and soil samples by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1532, p. 144-149, 2018.

MISHRA, V. G.; JEYAKUMAR, S. Pyrohydrolysis, a clean separation method for separating non-metals directly from solid matrix. **Open Access J Sci**, v. 2, p. 389-393, 2018.

MITRA, S.; BRUKH, R. Sample preparation: an analytical perspective. **CHEMICAL ANALYSIS-NEW YORK-INTERSCIENCE THEN JOHN WILEY-**, p. 1-36, 2003.

MO, W.; SOH, L.; WERBER, J. R.; ELIMELECH, M.; ZIMMERMAN, J. B. Application of membrane dewatering for algal biofuel. **Algal research**, v. 11, p. 1-12, 2015.

MOREDA-PINEIRO, J.; ALONSO-RODRI, E.; LÓPEZ-MAHI, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRI, D.; ROMARIS-HORTAS, V.; MIGUEZ-FRAMIL, M.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Matrix solid-phase dispersion of organic compounds and its feasibility for extracting inorganic and organometallic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 110-116, 2009.

MOURITSEN, O. G.; MOURITSEN, J. D. Algas: comestíveis, disponíveis e sustentáveis. Universidade de Chicago Press, 2013.

MUHAMMAD, N.; ZHANG, Y.; INTISAR, A.; MINGLI, Y.; CUI, H.; ZHU, Y. Comparative steam distillation based digestion of complex inorganic copper concentrates samples followed by ion chromatographic determination of halogens. **Microchemical Journal**, v. 158, p. 105176, 2020.

MULLER, E. I.; SOUZA, J. P.; MULLER, C. C.; MULLER, A. L.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A. Microwave-assisted wet digestion with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP OES and ICP-MS. **Talanta**, v. 156, p. 232-238, 2016.

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

NITSCHKE, U.; STENGEL, D. B. A new HPLC method for the detection of iodine applied to natural samples of edible seaweeds and commercial seaweed food products. **Food Chemistry**, v. 172, p. 326-334, 2015.

OMAR, Wan Maznah Wan. Perspectives on the use of algae as biological indicators for monitoring and protecting aquatic environments, with special reference to Malaysian freshwater ecosystems. **Tropical life sciences research**, v. 21, p. 51, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE et al. Prevenção de doenças em ambientes saudáveis: fluoreto inadequado ou excessivo: uma grande preocupação de saúde pública . Organização Mundial da Saúde, 2019.

PAULL, B.; MICHALSKI, R. Ion Exchange| Ion Chromatography Principles and Applications. 2018.

PAVELKA, S. Metabolism of bromide and its interference with the metabolism of iodine. **Physiological research**, v. 53, p. S81-90, 2004.

PAVELKA, S. **Iodine transfer through mother's milk: the influence of bromide**. Academic Press, Oxford, 2009.

PAVELKA, S. Use of <sup>82</sup>Br and <sup>131</sup>I radionuclides in studies of goitrogenic effects of exogenous bromide. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 291, p. 379-383, 2012.

PENG, B. X.; WU, D. S. Simultaneous rapid determination of halogens in clay using pyrohydrolysis combined with ion chromatography. **Chinese journal of analytical chemistry**, v. 41, p. 1499-1504, 2013.

PEREIRA, J. S. F.; ANTES, F. G.; DIEHL, L. O.; KNORR, C. L.; MORTARI, S. R.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Microwave-induced combustion of carbon

nanotubes for further halogen determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 1268-1274, 2010.

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

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

PEREIRA, L. S. F.; PEDROTTI, M. F.; ENDERS, M. S. P.; ALBERS, C. N.; PEREIRA, J. S. F.; FLORES, E. M. M. Multitechnique determination of halogens in soil after selective volatilization using microwave-induced combustion. **Analytical chemistry**, v. 89, p. 980-987, 2017.

PEREIRA, L. Uma revisão da composição de nutrientes de algas comestíveis selecionadas. Em *Algas: Ecologia, Nutriente Composição e usos medicinais*; Pomin, V.H., Ed.; Nova Science Publishers Inc.: Nova Iorque, NY, EUA; Capítulo 2; p.15-47, 2011.

PEREIRA, L. *Algas comestíveis do mundo*. CRC Press, 2016.

PEREIRA, L. *Characterization of Bioactive Components in Edible Algae*. 2020.

PHANG, H. K.; CHU, C. M.; KUMARESAN, S.; RAHMAN, M. M.; YASIR, S. M. Preliminary study of seaweed drying under a shade and in a natural draft solar dryer. **International Journal of Science and Engineering**, v. 8, p. 10-14, 2015.

PICOLOTO, R. S.; CRUZ, S. M.; MELLO, P. A.; MULLER, E. I.; SMICHOWSKI, P.; FLORES, E. M. Combining pyrohydrolysis and ICP-MS for bromine and iodine determination in airborne particulate matter. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 225-229, 2014.

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

PICOLOTO, R. S.; ENDERS, M. S.; DONEDA, M.; IOP, G. D.; DUARTE, F. A.; BARIN, J. S.; KRUG, F.J; FLORES, E. M. An *in situ* pre-concentration method for fluorine determination based on successive digestions by microwave-induced combustion. **Talanta**, v. 194, p. 314-319, 2019.

RIBEIRO, F. A. D. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; SILVA, L. R. D.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RIOUX, L. E.; BEAULIEU, L.; TURGEON, S. L. Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food hydrocolloids*, v. 68, p. 255-265, 2017.

RISHER, J.; KEITH, L. Samuel. Iodine and inorganic iodides: human health aspects. World Health Organization, 2009.

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

ROMARÍS-HORTAS, V.; BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis for iodinated amino acid extraction from edible seaweed before reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Journal of Chromatography a**, v. 1309, p. 33-40, 2013.

ROMARÍS-HORTAS, V.; BIANGA, J.; MOREDA-PINEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P.; SZPUNAR, J. Speciation of iodine-containing proteins in Nori seaweed by gel electrophoresis laser ablation ICP–MS. **Talanta**, v. 127, p. 175-180, 2014.

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

ROMARÍS-HORTAS, V.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Microwave assisted extraction of iodine and bromine from edible seaweed for inductively coupled plasma-mass spectrometry determination. **Talanta**, v. 79, p. 947-952, 2009.

ROMBALDI, C.; DE OLIVEIRA ARIAS, J. L.; HERTZOG, G. I.; CALDAS, S. S.; VIEIRA, J. P.; PRIMEL, E. G. New environmentally friendly MSPD solid support based on golden mussel shell: characterization and application for extraction of organic contaminants from mussel tissue. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 4805-4814, 2015.

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

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

ROSSI, R.; VIZZARRI, F.; CHIAPPARINI, S.; RATTI, S.; CASAMASSIMA, D., PALAZZO, M.; CORINO, C. Effects of dietary levels of brown seaweeds and plant polyphenols on growth and meat quality parameters in growing rabbit. **Meat science**, v. 161, p. 107987, 2020.

RUPÉREZ, P. Mineral content of edible marine seaweeds. **Food chemistry**, v. 79, p. 23-26, 2002.

RUSSEL, John Blair. Química geral. Vol. Makron Books. 1994.

SAIZ-LOPEZ, A.; VON GLASOW, R. Reactive halogen chemistry in the troposphere. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 6448-6472, 2012.

SALCEDO, G. M.; KUPSKI, L.; ARIAS, J. L. D. O; BARBOSA, S. C.; PRIMEL, E. G. Bojuru sand as a novel catalyst for refinery wastewater treatment and phenol degradation by heterogeneous photo catalysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 402, p. 112796, 2020.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I.; LÓPEZ-CERVANTES, J.; LOPEZ-HERNANDEZ, J.; PASEIRO-LOSADA, P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. **Food chemistry**, v. 85, p. 439-444, 2004.

SANTE 11813/. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Rev 0, 2017.

SANTOS, E. O. D.; GONZALES, J. O.; ORES, J. C.; MARUBE, L. C.; CALDAS, S. S.; FURLONG, E. B.; PRIMEL, E. G. Sand as a solid support in ultrasound-assisted MSPD: A simple, green and low-cost method for multiresidue pesticide determination in fruits and vegetables. **Food chemistry**, v. 297, p. 124926, 2019.

SASSO, S.; POHNERT, G.; LOHR, M.; MITTAG, M.; HERTWECK, C. Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products. **Revisões da microbiologia do FEMS**, v. 36, p. 761-785, 2012.

SEBASTIA, N.; SOLER, C.; SORIANO, J. M.; MANES, J. Occurrence of aflatoxins in tigernuts and their beverages commercialized in Spain. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, p. 2609-2612, 2010.

SHANNON, E.; ABU-GHANNAM, N. Seaweeds as nutraceuticals for health and nutrition. **Phycologia**, v. 58, p. 563-577, 2019.

SHINODA, T.; MIYAMOTO, N.; KUROMOTO, T.; ITO, K.; MORIKAWA, H.; OKAMOTO, Y.; FUJIWARA, T.; HIROKAWA, T. Pyrohydrolysis coupled to ion chromatography for sensitive determination of iodine in food-related materials. **Analytical letters**, v. 45, p. 862-871, 2012.

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

SIMÕES, M. A.; SANTOS, S. D.; DANTAS, D. de. M. de. M.; GALVÉZ, A. O. Algas cultiváveis e sua aplicação biotecnológica. 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**, 8ª ed. norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

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

SMALL, Hamish. **Ion chromatography**. Springer Science & Business Media, 2013.

TABOADA, M. C.; MILLÁN, R.; MIGUEZ, M. I. Nutritional value of the marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements. **Journal of applied phycology**, v. 25, p. 1271-1276, 2013.

TAFLIK, T.; DUARTE, F. A.; FLORES, É. L.; ANTES, F. G.; PANIZ, J. N.; FLORES, É. M.; DRESSLER, V. L. Determination of bromine, fluorine and iodine in mineral supplements using pyrohydrolysis for sample preparation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 488-495, 2012.

TIBBETTS, S. M.; MILLEY, J. E.; LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 1109-1119, 2015.

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

TU, X.; CHEN, W. A review on the recent progress in matrix solid phase dispersion. **Molecules**, v. 23, p. 2767, 2018.

TURAN, G.; CIRIK, S. Sea Vegetables. **Vegetables: Importance of Quality Vegetables to Human Health**, p. 85, 2018.

VANDER HOOGERSTRAETE, T.; JAMAR, S.; WELLENS, S.; BINNEMANS, K. Determination of halide ions in solution by total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. **Analytical chemistry**, v. 86, p. 1391-1394, 2014.

VIEIRA, A. A.; CALDAS, S. S.; ESCARRONE, A. L. V.; ARIAS, J. L. D. O.; PRIMEL, E. G. Environmentally friendly procedure based on VA-MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue. **Food chemistry**, v. 242, p. 475-480, 2018.

WANG, H. M. D.; CHEN, C. C.; HUYNH, P.; CHANG, J. S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource technology**, v. 184, p. 355-362, 2015.

WEISS, J. **Handbook of Ion Chromatography, 3 Volume Set**. John Wiley & Sons, 2016.

WIANOWSKA, D.; GIL, M. New insights into the application of MSPD in various fields of analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 112, p. 29-51, 2019.

WHO. World Health Organization. Iodine status worldwide: WHO global database on iodine deficiency. 2004.

WHO. World Health Organization. WORLD HEALTH ORGANISATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE. Fluorides. Environmental health criteria, v. 227, p. 268, 2002.

WHO. World Health Organization. Alternative drinking-water disinfectants: bromine, iodine and silver. 2018.

WHO. World Health Organization. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. World Health Organization, 2019.

YANG, M.; HER, N.; RYU, J.; YOON, Y. Determination of perchlorate and iodide concentrations in edible seaweeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 565-570, 2014.

YOGANANDHAM, S. T.; RAGURAMAN, V.; MUNISWAMY, G.; SATHYAMOORTHY, G.; RENUKA, R. R.; CHIDAMBARAM, J.; RAJENDRAN, T.; CHANDRASEKARAN, K.; RAVINDRANATH, R. R. S. Mineral and trace metal concentrations in seaweeds by microwave-assisted digestion method followed by Quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometry. **Biological trace element research**, v. 187, p. 579-585, 2019.