

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



Dissertação de Mestrado

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A SUBSEQUENTE DETERMINAÇÃO DE METAIS EM MACROALGAS

Lizângela Rosa Ferreira

PELOTAS, RS

2013

Lizângela Rosa Ferreira

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS
PARA A SUBSEQUENTE DETERMINAÇÃO DE METAIS EM
MACROALGAS**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko

PELOTAS, RS

2013

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

F384d Ferreira, Lizângela Rosa
 Desenvolvimento de Métodos de Preparo de Amostras
 para a Subsequente Determinação de Metais em Macroalgas
 / Lizângela Rosa Ferreira; Márcia Foster Mesko,
 orientador. – Pelotas, 2013.
 148 f.: il.

 Dissertação (Mestrado em Bioquímica e
 Bioprospecção), Centro de Ciências Químicas,
 Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de
 Pelotas. Pelotas, 2013.

 1.Preparo de amostra. 2.Metais. 3.Macroalgas. I.
 Mesko, Márcia Foster , orient. II. Título.

CDD: 574.192

Catálogo na Fonte: Marlene Cravo Castillo CRB:10/744
Universidade Federal de Pelotas

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada “Desenvolvimento de Métodos de Preparo de Amostras para a Subsequente Determinação de Metais em Macroalgas”, de autoria de Lizângela Rosa Ferreira.

Banca examinadora:

.....

Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko (Orientadora)

.....

Prof. Dr. Edson Irineu Müller - UFSM-RS

.....

Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto - USP-SP

Dedico este trabalho a minha filha Ana Carolina, pelo amor e compreensão pelas muitas horas que não pude estar contigo. Ao meu marido Jaison, que com grande sabedoria soube muitas vezes ser pai e mãe, sem nunca ter deixado de ser esposo.

Amo muito vocês.

**"Quem fica no vale jamais
atingirá o topo da colina."
(Thomas Fuller)**

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos Profs. Drs. **Edson Irineu Müller** e **Pio Colepicolo Neto**, pela participação na banca examinadora, e pelas sugestões que contribuíram para esta dissertação.

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

Ao Prof. Dr. **Claudio Martin Pereira de Pereira**, por participar do programa PROANTAR em 2012, concedendo as amostras para a execução deste trabalho.

Aos integrantes do LAQIA (UFSM), em especial a **Rochele Sogari Picoloto**, pela disposição e colaboração constante durante toda a execução deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais, da UFPel, **Carla A. Hartwig, Vanize C. Costa, Natanael Rodrigo X. Pires, Marcelo G. Crizel, Isis G. Toralles, Fernanda B. B. Schiavon e Angélica S. Reis** por toda a ajuda, apoio e amizade.

Aos colegas de mestrado, em especial ao **Marcelo Z. Costa, Gabriela H. Alves e Daiane E. Blank** pelos dias de estudos, onde construímos conhecimento.

Aos colegas e amigos **Vanize Caldeira da Costa e Natanael Rodrigo Xavier Pires** pelo apoio, incentivo, ajuda, conhecimento construído junto e pela imensa amizade que jamais vai deixar de existir.

A minha mãe (*in memorian*) pelo amor incondicional e pelos ensinamentos de ética, respeito e perseverança.

Agradeço ainda à minha família por todo o apoio, incentivo e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Contaminação ambiental por metais - aspectos gerais.....	22
2.2 Macroalgas - Generalidades.....	24
2.3 Principais aspectos ambientais e toxicológicos dos elementos químicos	25
2.4 Preparo de amostras	28
2.4.1 Decomposição por via úmida.....	31
2.4.1.1 Decomposição por via úmida em sistema aberto assistida por radiação micro-ondas	36
2.4.1.2 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas.....	37
2.4.1.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio.....	41
2.4.1.4 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta	45
2.5 Determinação de metais em macroalgas	47
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Instrumentação	54
3.2 Reagentes	59
3.3 Materiais diversos.....	60
3.4 Amostras.....	60
3.5 Calibração do forno de micro-ondas.....	65

3.6 Métodos de preparo de amostras	66
3.6.1 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas (MWAD)	66
3.6.2 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O ₂ -AD)	67
3.6.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD)	68
3.7 Determinação do teor de carbono residual	71
3.8 Determinação da acidez residual	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1 Calibração do forno de micro-ondas	73
4.2 Caracterização das amostras de macroalgas	73
4.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas (MWAD) e subsequente determinação de metais por ICP-MS e ICP OES	75
4.4 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O ₂ -AD) e subsequente determinação de metais por ICP-MS	82
4.5 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD) e subsequente determinação de metais por ICP-MS	97
4.5.1 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta com solução diluída de HNO ₃	98
4.5.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta com solução diluída de HNO ₃ e H ₂ O ₂	104
4.6 Brancos analíticos e limites de detecção	111
4.7 Determinação de metais em algas por ICP-MS após a decomposição utilizando MWAD, MW-O ₂ -AD e MW-UV-AD	114
4.8 Comparação entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras avaliados	123
4.9 Comparação dos valores obtidos neste estudo com os resultados relatados na literatura	125

5 CONCLUSÃO	131
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação dos procedimentos de decomposição de amostras, adaptado de Knapp, 1991.....	31
Tabela 2 -	Principais propriedades dos ácidos utilizados para a digestão, adaptado de Mermet, 1997.....	34
Tabela 3 -	Trabalhos publicados que envolvem a determinação de metais em macroalgas e em outros materiais biológicos por diferentes técnicas analíticas.....	50
Tabela 4 -	Condições operacionais para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, V e Zn por ICP-MS e ICP OES.....	57
Tabela 5 -	Condições operacionais para a determinação de carbono residual por ICP OES nas amostras decompostas.....	58
Tabela 6 -	Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para a descontaminação dos frascos de quartzo.....	60
Tabela 7 -	Programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras de alga por MWAD (HNO ₃), (n=3).....	67
Tabela 8 -	Programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras de alga por MW-O ₂ -AD, (n=3).....	68
Tabela 9 -	Programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras de alga por MW-UV-AD, (n=3).....	69
Tabela 10 -	Constituição elementar das amostras de macroalgas, (CHN, %).	73
Tabela 11 -	Determinação de metais na alga <i>Desmarestia anceps</i> por ICP-MS e ICP OES, após decomposição por MWAD com HNO ₃ 14,4 mol l ⁻¹ , (µg g ⁻¹ , n=3).....	76
Tabela 12 -	Determinação de metais em material de referência certificado (BCR 060 - <i>Aquatic plant</i>), por ICP-MS e ICP OES, após decomposição por MWAD, utilizando HNO ₃ 14,4 mol l ⁻¹ ,	

	($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	77
Tabela 13 -	Determinação de metais em material de referência certificado (NIST 1515 - <i>Apple leaves</i>), por ICP-MS e ICP OES, após decomposição por MWAD, utilizando HNO_3 14,4 mol l^{-1} , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	79
Tabela 14 -	Determinação de metais na alga <i>Desmarestia anceps</i> por ICP-MS, com calibração por curva de adição de analito e com calibração externa, após decomposição por MWAD com HNO_3 14,4 mol l^{-1} , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	81
Tabela 15 -	Determinação de metais na alga <i>Desmarestia anceps</i> por ICP-MS após decomposição com HNO_3 conc. e com HNO_3 2 mol l^{-1} sob diferentes pressões de O_2 , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	85
Tabela 16 -	Determinação de metais na alga <i>Desmarestia anceps</i> por ICP-MS após decomposição com HNO_3 conc. e com HNO_3 3 mol l^{-1} sob diferentes pressões de O_2 , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	87
Tabela 17 -	Determinação de metais na alga <i>Desmarestia anceps</i> por ICP-MS após decomposição com HNO_3 conc. e com HNO_3 7 mol l^{-1} sob diferentes pressões de O_2 , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	90
Tabela 18 -	Teor de carbono residual e acidez residual determinados nos digeridos da alga <i>Desmarestia anceps</i> após MW- O_2 -AD, utilizando diferentes concentrações de HNO_3 com diferentes pressões de O_2 , ($n=3$).....	93
Tabela 19 -	Determinação de metais em materiais de referência certificados BCR 060 (<i>Aquatic plant</i>) e NIST 1515 (<i>Apple leaves</i>) por ICP-MS, após decomposição com HNO_3 3 mol l^{-1} e pressão de 5 bar de O_2 , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	96
Tabela 20 -	Determinação de metais por ICP-MS na alga <i>Desmarestia anceps</i> , após decomposição por MWAD com HNO_3 conc. e por MW-UV-AD com o emprego de soluções de HNO_3 nas concentrações de 1, 2, 3 e 7 mol l^{-1} , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	101
Tabela 21 -	Determinação de metais nos CRMs BCR 060 (<i>Aquatic plant</i>) e NIST 1515 (<i>Apple leaves</i>) por ICP-MS, após decomposição	

	por MW-UV-AD com HNO_3 2 mol l^{-1} , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	103
Tabela 22 -	Determinação de metais na alga <i>Desmarestia anceps</i> por ICP-MS, após decomposição com HNO_3 conc. e com HNO_3 0,5 e 1 mol l^{-1} , H_2O_2 1 e 4 ml com lâmpada de emissão de radiação UV assistida por radiação micro-ondas, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).	109
Tabela 23 -	Determinação dos brancos analíticos por ICP-MS após os procedimentos de decomposição por MWAD, MW- O_2 -AD, MW-UV-AD somente com HNO_3 e com HNO_3 e H_2O_2 , ($\mu\text{g l}^{-1}$)..	112
Tabela 24 -	Limites de detecção obtidos por ICP-MS após os métodos de preparo de amostra MWAD, MW- O_2 -AD, MW-UV-AD somente com HNO_3 e MW-UV-AD com HNO_3 e H_2O_2 , considerando 500 mg de amostra, ($\mu\text{g g}^{-1}$).....	114
Tabela 25 -	Resultados obtidos para a concentração de metais na alga <i>Iridaea cordata</i> por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW- O_2 -AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	115
Tabela 26 -	Resultados obtidos para a concentração de metais na alga <i>Palmaria decipiens</i> por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW- O_2 -AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	116
Tabela 27 -	Resultados obtidos para a concentração de metais na alga <i>Prasiola crispa</i> por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW- O_2 -AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	118
Tabela 28 -	Resultados obtidos para a concentração de metais na alga <i>Pyropia endiviifolia</i> por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW- O_2 -AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	121
Tabela 29 -	Resultados dos valores médios determinados utilizando os métodos de preparo MWAD com HNO_3 conc., MW- O_2 -AD com HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 e MW-UV-AD com HNO_3 2 mol l^{-1} , aplicados as 5 espécies de algas, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).....	129

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Sistema comercial para a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta.....	46
Figura 2 -	(a) Forno de micro-ondas comercial Multiwave 3000® e (b) rotor equipado com 8 frascos de quartzo utilizados para a decomposição de amostras.....	54
Figura 3 -	(a) Lâmpada de Cd de baixa pressão e os dispositivos de PTFE utilizados para posicionar a lâmpada de emissão UV no frasco de decomposição por MW-UV-AD e (b) frasco de quartzo do forno micro-ondas com a lâmpada de Cd para a emissão de radiação ultravioleta.....	55
Figura 4 -	Identificação do local de coleta: Demay, Ilha Rei George, Antártica.....	61
Figura 5 -	Amostras de algas <i>in natura</i> (a) <i>Desmarestia anceps</i> , (b) <i>Iridaea cordata</i> , (c) <i>Palmaria decipiens</i> , (d) <i>Prasiola crispa</i> e (e) <i>Pyropia endiviifolia</i> , coletadas na Antártica.....	63
Figura 6 -	Aspecto das algas após o processo de liofilização (a) <i>Desmarestia anceps</i> , (b) <i>Iridaea cordata</i> , (c) <i>Palmaria decipiens</i> , (d) <i>Prasiola crispa</i> e (e) <i>Pyropia endiviifolia</i>	64
Figura 7 -	Representação esquemática dos procedimentos de preparo das amostras de algas para posterior determinação dos metais estudados neste trabalho.....	70
Figura 8 -	Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga <i>Desmarestia anceps</i> com soluções de HNO ₃ concentrado e com HNO ₃ diluído (0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l ⁻¹) em diferentes pressões de O ₂ : (a) 1 bar, (b) 5 bar e (c) 10 bar	84
Figura 9 -	Teores de carbono residual para as soluções obtidas após decomposição da alga <i>Desmarestia anceps</i> por MWAD com HNO ₃ 14,4 mol l ⁻¹ e MW-O ₂ -AD com HNO ₃ nas concentrações de 2, 3 e 7 mol l ⁻¹ : RCC obtido após decomposição com  HNO ₃ conc.;  1 bar de O ₂ ;  5 bar de O ₂ e  10 bar de O ₂ .	

	Acidez residual após decomposição com ■ HNO ₃ conc.; ■ 1 bar de O ₂ ; ■ 5 bar de O ₂ e ■ 10 bar de O ₂	94
Figura 10 -	Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga <i>Desmarestia anceps</i> com HNO ₃ conc. por MWAD e com soluções de HNO ₃ em diferentes concentrações e com a lâmpada de emissão de radiação UV assistida por radiação micro-ondas.....	99
Figura 11 -	Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga <i>Desmarestia anceps</i> com soluções de HNO ₃ 1 mol l ⁻¹ (a) decomposição por MW-O ₂ -AD e (b) decomposição por MW-UV-AD.....	100
Figura 12 -	(a) e (b) Decomposição do disco de PTFE no interior do frasco reacional, (c) amostra depositada entre o disco de PTFE e a antena da lâmpada de emissão de radiação UV, vista superior do disco de PTFE (d) danificado e (e) sem danos.....	106
Figura 13 -	Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga <i>Desmarestia anceps</i> com HNO ₃ conc. por MWAD e com soluções de HNO ₃ 0,5 e 1 mol l ⁻¹ , H ₂ O ₂ 1 e 4 ml e com a lâmpada de emissão de radiação UV.....	107
Figura 14 -	Aspecto dos digeridos após a decomposição por MW-UV-AD da alga <i>Desmarestia anceps</i> (a) somente com solução de HNO ₃ 1 mol l ⁻¹ e (b) com HNO ₃ 1 mol l ⁻¹ + H ₂ O ₂ 1 ml.....	108
Figura 15 -	Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga <i>Prasiola crispera</i> pelo método (a) MWAD com solução de HNO ₃ conc. e pelo método (b) MW-UV-AD com solução de HNO ₃ 2 mol l ⁻¹	119
Figura 16 -	Teores de carbono para as soluções obtidas após decomposição de 500 mg das algas por ■ MWAD, ■ MW-O ₂ -AD e ■ MW-UV-AD. Acidez residual após decomposição das algas por ■ MWAD, ■ MW-O ₂ -AD e ■ MW-UV-AD.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS - espectrometria de absorção atômica, do inglês, *atomic absorption spectrometry*

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

ATSDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

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

CVG AAS - espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio, do inglês, *cold vapor generation coupled to atomic absorption spectrometry*

d.i. - diâmetro interno

ENAA - análise por ativação neutrônica epitérmico, do inglês *epithermal neutron activation analysis*

ET AAS - espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, do inglês, *electrothermal atomic absorption spectrometry*

F AAS - espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, *flame atomic absorption spectrometry*

GF AAS - espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*

HG AAS - espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês *hydride-generation atomic absorption spectrometry*

ICP-MS - espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*

ICP OES - espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*

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

ips - impactos por segundo

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

LOQ - limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

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

MW - micro-ondas, do inglês *microwave*

MWAD - decomposição assistida por radiação micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted digestion*

MW-O₂-AD - decomposição assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio, do inglês, *microwave pressure of oxygen assisted digestion*

MW-UV-AD - decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, do inglês, *microwave-assisted UV-digestion*

m/m - massa por massa

m/v - massa por volume

m/z - razão massa/carga

NAA - análise por ativação neutrônica, do inglês *neutron activation analysis*

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

p.a. - para análise

PTFE - politetrafluoretileno, do inglês, *polytetrafluoroethylene*

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

RSD - desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*

TFM - politetrafluoretileno quimicamente modificado

UV - ultravioleta

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

v/v - volume por volume

XRF - fluorescência de raios-X, do inglês, *X-ray fluorescence*

RESUMO

Título: Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras para a subsequente determinação de metais em macroalgas

Autor: Lizângela Rosa Ferreira

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko

Neste trabalho foi proposta a utilização de dois métodos de preparo de amostras: a decomposição assistida por radiação micro-ondas sob pressão de O₂ (MW-O₂-AD) e a decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD), para macroalgas oriundas da Antártica visando a subsequente determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Na MW-O₂-AD foram avaliadas as soluções de HNO₃ 0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹ sob pressões de 1, 5 e 10 bar de O₂. Estas mesmas soluções foram empregadas na MW-UV-AD, onde também foi avaliado o uso de HNO₃ 0,5 e 1 mol l⁻¹ com H₂O₂. Como parâmetro de referência para os métodos desenvolvidos foi realizada a decomposição assistida por radiação micro-ondas (MWAD) com HNO₃ conc., quando foram obtidas concordâncias acima de 91% para quase todos os analitos nos métodos MW-O₂-AD (HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar) e MW-UV-AD (HNO₃ 2 mol l⁻¹). A exatidão foi avaliada através da decomposição dos materiais de referência certificados BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*), as concordâncias com os valores certificados foram acima de 92% para todos os analitos. A eficiência da digestão foi avaliada através da determinação do teor de carbono residual (menor que 10%). O limite de detecção foi entre 0,001 e 1,45 µg g⁻¹. Desta forma, a utilização de HNO₃ diluído, reduziu o consumo de reagentes, o valor para os brancos e proporcionou menores LODs.

Palavras-chave: Preparo de amostra, metais, macroalgas

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Bioprospecção

Pelotas, Março de 2013.

ABSTRACT

Title: Development of methods of sample preparation for subsequent determination of metals in macroalgae

Author: Lizângela Rosa Ferreira

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Márcia Foster Mesko

In this work was proposed the use of two methods for sample preparation: oxygen pressurized microwave radiation assisted digestion (MW-O₂-AD) and microwave radiation assisted UV-digestion (MW-UV-AD) for macroalgae from the Antarctic for further determination of As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V and Zn by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). For MW-O₂-AD method were evaluated 0.5, 1, 2, 3 and 7 mol l⁻¹ HNO₃ solutions at pressures of 1, 5 and 10 bar of O₂. These same solutions were used in the MW-UV-AD and for 0.5 and 1 mol l⁻¹ HNO₃ was evaluated the use of H₂O₂. To compare the performance of proposed methods, the samples were also digested with concentrated HNO₃ by microwave radiation assisted digestion (MWAD). Using MW-O₂-AD (3 mol l⁻¹ HNO₃ and 5 bar of O₂) and MW-UV-AD (2 mol l⁻¹ HNO₃) methods the metals concentration was in agreement (above 91%) with the results obtained for digesteds using concentrated HNO₃ for almost analytes. The accuracy of the proposed methods was evaluated using certified reference materials BCR 060 (Aquatic plant) and NIST 1515 (Apple leaves) and the agreements with certified values were above 92% for all analytes. Using the proposed methods the residual carbon content was always lower than 10% and the limit of detection was between 0.001 and 1.45 µg g⁻¹ for all analytes. Additionally, the use of dilute HNO₃ in both methods reduced the blank values and improved the LODs.

Key-words: sample preparation, metals, macroalgae.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

Master Dissertation in Biochemistry and Bioprospection

Pelotas, March 2013.

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A determinação de elementos traço tóxicos em amostras ambientais é de suma importância a fim de avaliar os impactos oriundos de atividades antropogênicas (BARGAGLI, 2008). Neste sentido, tem-se evidenciado um aumento da utilização de organismos aquáticos como ferramentas indicadoras da qualidade ambiental devido a resposta destes organismos vivos em relação a estímulos naturais ou antropogênicos (RUNCIE; RIDDLE, 2004).

A Antártica ainda é considerada um continente primitivo, de posição geográfica isolada dos demais continentes, e mesmo assim é crescente a presença humana, devido ao desenvolvimento da pesquisa científica, do turismo e da pesca (BARGAGLI, 2008). Para monitorar a contaminação ambiental, diferentes espécies de macroalgas vêm sendo empregadas como ferramentas de análise do impacto das atividades desenvolvidas na Antártica (RUNCIE; RIDDLE, 2004; BARGAGLI, 2008).

Neste contexto, é necessário o desenvolvimento de métodos analíticos altamente eficientes e confiáveis para a determinação de metais em amostras biológicas. Na literatura tem sido relatada a determinação de metais por meio das técnicas de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (FARÍAS et al., 2002; ROCHA et al., 2009). Entretanto, estas técnicas de determinação multielementar, apesar de apresentarem elevada sensibilidade e baixo limite de detecção, geralmente, requerem a completa dissolução da amostra para evitar possíveis interferências da matriz na etapa de determinação dos metais (MOREDA-PIÑEIRO et al., 2007). Cabe ressaltar que a etapa de preparo de amostra, em muitos casos, pode ser considerada a etapa mais demorada, de maior custo, e onde se cometem mais erros, os quais frequentemente limitam a exatidão que pode ser alcançada em uma análise (KRUG; NÓBREGA, 2010). Assim, o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostras compatíveis à técnica de determinação, é de grande relevância para garantir que os resultados de determinada análise sejam precisos e exatos, além de melhorar o limite de detecção (KRUG; NÓBREGA, 2010).

A técnica de preparo de amostra usualmente empregada visando a determinação de metais em amostras biológicas, é a decomposição assistida por radiação micro-ondas (MWAD) em sistema fechado. Esta técnica tem se mostrado

bastante eficiente e segura, além de apresentar outras vantagens se comparada às decomposições por via úmida com aquecimento por convecção, das quais pode ser citada a diminuição do tempo de decomposição devido à absorção direta de energia pelo material que está sendo aquecido pela radiação micro-ondas (NOGUEIRA et al., 2010). Neste procedimento de preparo de amostra o HNO_3 é um dos reagentes mais utilizados, por ser um forte agente oxidante da matéria orgânica, além de ser possível a obtenção deste ácido com alto grau de pureza em relação aos outros ácidos inorgânicos (COSTA et al., 2010). Contudo, é importante enfatizar que a utilização de ácidos concentrados pode interferir na etapa de determinação por ICP-MS e ICP OES, causando supressão do sinal do analito, além de interferir na etapa de introdução da amostra e também alterar as características do plasma (STEWART; OLESIK, 1998a; STEWART; OLESIK, 1998b).

Neste contexto, muitos estudos têm sido realizados com o intuito de trabalhar em condições de preparo de amostra que utilizem reagentes mais diluídos, das quais podem ser destacadas a decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW- O_2 -AD) e a decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD). A MW- O_2 -AD utiliza ácidos diluídos e por isso diminui o risco de contaminação e conseqüentemente menores valores dos brancos analíticos. A decomposição de amostras orgânicas e biológicas em que o ácido nítrico é utilizado como agente oxidante, tem a sua ação potencializada com uma quantidade mínima de oxigênio dentro do frasco reacional, possibilitando assim as reações de regeneração do ácido (TREVIZAN et al., 2007; GONZALEZ et al., 2009; BIZZI et al., 2010). Para a técnica de MW-UV-AD foi desenvolvida uma lâmpada que pode ser imersa dentro do frasco reacional. A emissão da radiação na região UV, ocorre por meio da interação com a radiação micro-ondas, que é transmitida para a antena da lâmpada liberando uma descarga elétrica no interior do bulbo desta, que se encontra preenchida com vapor de Cd a baixa pressão (FLORIAN; KNAPP, 2001). Esta técnica tem como vantagem o uso de pequenas quantidades de reagentes, o que evita a diluição da amostra após a decomposição, além de melhorar os limites de detecção.

Desta forma, este trabalho tem por objetivo desenvolver e avaliar diferentes métodos de preparo de amostras de macroalgas para a determinação de metais por ICP-MS. Os métodos desenvolvidos foram aplicados para amostras de macroalgas

da localidade de Demay na Ilha do Rei George, na Antártica, podendo ser utilizadas como bioindicadores da poluição ambiental. Estas amostras foram selecionadas pelo fato deste trabalho estar vinculado ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta revisão bibliográfica está dividida em três partes principais. Na primeira delas, serão abordados alguns aspectos gerais sobre contaminação ambiental por metais e o monitoramento destes ambientes empregando principalmente espécies de organismos aquáticos como as macroalgas, além disso, tratar-se-á nesse espaço sobre as principais características toxicológicas de alguns elementos químicos. Na segunda parte, serão apresentados os principais procedimentos de preparo de amostras, com ênfase nos procedimentos envolvendo a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas, a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio e a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, ambos empregados para a subsequente determinação de metais em amostras biológicas. Na terceira e última parte, serão abordados aspectos relacionados à determinação de metais por ICP-MS e ICP OES.

2.1 Contaminação ambiental por metais - aspectos gerais

Dentre os principais problemas globais no que abrange a contaminação ambiental destaca-se as causadas por metais tóxicos que como afirmam Phillips (1995) e Rosa et al. (2008), está diretamente relacionado a ações antropogênicas. A poluição ocasionada em razão da liberação destes metais a partir de fontes industriais e domésticas resulta em sérias mudanças nos ecossistemas, incluindo o aquático, provocando a perda da biodiversidade que vive neste habitat (AKCALI; KUCUKSEZGIN, 2011).

Alguns metais de modo geral possuem sua toxicidade atrelada a entrada destes nas células através dos sistemas de transporte que, originalmente, são designados para o transporte dos metais essenciais. Por meio deste processo, os metais essenciais são deslocados pelos metais tóxicos gerando uma competição entre os mesmos, diminuindo assim a disponibilidade dos metais essenciais na célula (SUNDA; HUNTSMAN, 1998; PINTO et al., 2003).

Outro aspecto de extrema relevância dentro deste contexto, é que alguns metais essenciais que são metabolicamente importantes para muitos organismos vivos em baixas concentrações, em níveis mais elevados podem ser potencialmente tóxicos. Dentre eles podem-se mencionar alguns exemplos como Ni, Cu e Zn (ALLAN, 1997; SUNDA; HUNTSMAN, 1998).

Através da leitura de Pinto et al. (2003) e Torres et al. (2008) evidencia-se que a exposição a elementos tóxicos pode atuar como uma barreira para o desenvolvimento de diversos organismos marinhos, e esta barreira pode em algumas situações resultar numa diminuição da biodiversidade. Destaca-se neste processo que a toxicidade dos metais pode estar diretamente associada ao estresse oxidativo nos organismos vivos. Esta toxicidade tanto pode ocasionar um aumento na concentração de espécies reativas de oxigênio ou uma redução na capacidade antioxidante celular, resultando na inibição da fotossíntese e consequentemente uma diminuição na produção de clorofila (PINTO et al., 2003).

Em função de todos os fatores mencionados, tem-se estudado amplamente o enfoque químico, toxicológico e ecológico para a avaliação dos impactos ocasionados por estes poluentes. No ecossistema aquático, tem-se empregado os organismos aquáticos com a finalidade de monitorar os efeitos da poluição e

também para ajudar a localizar as fontes dos agentes tóxicos (HE; WANG; TANG, 1998).

Como aludem Lourie, Patil e Gjengedal (2010), em pesquisas atuais, algumas bactérias, fungos, organismos aquáticos como mexilhões, peixes e algas possuem o potencial de absorver metais traço e, assim, tem potencial de servir como materiais biológicos economicamente viáveis para a detecção da poluição ambiental. Além disso, segundo Rajfur, Klos e Waclawek (2010) e Anastasakis, Ross e Jones (2011) em diversos sistemas ambientais há uma enorme abundância de algas e estas apresentam capacidade de acumular grandes quantidades de metais tóxicos como Cd, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn e por esta razão são amplamente empregados no monitoramento da poluição ambiental. Ressalta-se ainda, que a composição química das algas é responsável pelo acúmulo de metais nessas espécies, devido a constituição da parede celular desses organismos ser composta por polissacarídeos e proteínas que apresentam grupos aniônicos, que possibilitam aos metais facilidade de ligação (FARÍAS et al., 2002).

Dentre os fatores ambientais que podem influenciar o acúmulo de metais pelas algas destaca-se a atividade celular, o tempo de exposição, espécies quelantes, pH, salinidade, matéria orgânica e temperatura. Outro aspecto relevante quando se faz menção à absorção de metais em algas, é que as diferenças estruturais entre espécies influenciam na sua capacidade de absorção (RUNCIE; RIDDLE, 2004). Assim, cada vez mais, as macroalgas têm sido utilizadas como ferramenta para monitorar ambientes marinhos contaminados por metais tóxicos devido as suas propriedades especiais que podem servir como um poderoso método para indicar os índices de contaminação ambiental.

Em razão da realização de pesquisa científica, turismo e pesca, acentua-se a presença humana na Antártica, além deste fato a maioria das estações estão localizadas em áreas costeiras, onde ocorre a queima de combustíveis para transporte e produção de energia, incineração de resíduos, causando derramamento de óleo e esgoto, e inevitavelmente produzindo impactos ambientais localizados (BARGAGLI, 2008). Como forma de mensurar as ações supracitadas, as macroalgas vêm sendo empregadas para avaliar o padrão global de contaminantes antropogênicos no meio ambiente antártico a fim de avaliar o impacto das atividades desenvolvidas nesta região (BARGAGLI, 2008).

Estudos realizados por Runcie e Riddle (2004) utilizaram diferentes espécies de macroalgas da Antártica como *Desmarestia menziesii*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crispa*, entre outras para avaliar a concentração de metais neste ambiente. Os metais avaliados foram Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb e Zn. Estes foram determinados entre as espécies coletadas no mesmo local e de diferentes locais de amostragem, entre os meses de novembro e dezembro nos anos de 2001 e 2002, com o intuito de controlar a disponibilidade destes metais tanto em regiões próximas como em regiões afastadas de atividades antropogênicas. Neste trabalho, os autores relacionam a concentração de metais com as diferenças ambientais como salinidade, irradiação e movimentos da água e diferenças fisiológicas entre as diferentes espécies de macroalgas.

2.2 Macroalgas - Generalidades

As macroalgas são organismos fotossintetizantes, capazes de transformar a energia luminosa em energia química. Através deste mecanismo combinam o dióxido de carbono da atmosfera, água e luz no interior dos cloroplastos para formar o seu alimento e emitir oxigênio (ANASTASAKIS; ROSS; JONES, 2011). Estes organismos marinhos representam os produtores primários de todos os ecossistemas aquáticos, por isso são de fundamental importância para a manutenção e sustentação da vida em oceanos e mares (HORTA et al., 2010; WIJESINGLE; JEON, 2011). Desta forma, estes organismos representam a base da cadeia alimentar do sistema aquático (ANASTASAKIS; ROSS; JONES, 2011).

De acordo com Wijesingle e Jeon (2011), constituintes químicos isolados a partir de diversas classes de macroalgas exercem uma grande variedade de atividades nutricionais, funcionais e biológicas. Deste modo é importante ressaltar que, estas macroalgas são importantes do ponto de vista econômico, pois muitos metabólitos exclusivos possuem propriedades biológicas específicas que os tornam ingredientes potenciais de inúmeras aplicações na indústria. Como exemplo tem-se os produtos farmacêuticos como cápsulas que contém alto teor de proteínas, produtos cosmeceúticos como cremes anti-rugas, fixadores de perfumes, produtos para a área de microbiologia como meio de cultura para crescimento de micro-organismos, produtos alimentícios como estabilizantes, conservantes e emulsionantes de sorvetes e cremes, além de serem consumidas *in natura* como

nos sushis e nas rações balanceadas para animais (PEDRINI, 2010; WIJESINGLE; JEON, 2011). Além disso, as algas desempenham um papel fundamental na dispersão química, transformação e bioacumulação de muitos compostos tóxicos (TORRES et al., 2008).

Dentre os vários grupos de algas eucariontes, três são amplamente conhecidas e comumente designadas pelo seu pigmento predominante como algas verdes (Chlorophyta), as quais aparecem em grande quantidade no meio aquático e são responsáveis por boa parte do oxigênio produzido a partir da fotossíntese, as algas vermelhas (Rhodophyta) são quase que exclusivamente marinhas de mares quentes e as algas pardas (Phaeophyta) são predominantemente marinhas de mares frios, vivem fixadas ou flutuando (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004).

As espécies de macroalgas *Desmarestia anceps* (Montagne) alga parda (Phaeophyta), *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent alga vermelha (Rhodophyta), *Palmaria decipiens* (Reinsch) R. W. Ricker alga vermelha (Rhodophyta), *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützing alga verde (Chlorophyta) e *Pyropia endiviifolia* (A. Gepp & E. Gepp) H. G. Choi & M. S. Hwang alga vermelha (Rhodophyta) (ALGAEBASE) são algumas das espécies amplamente distribuídas na Antártica e por isso são utilizadas como objetos de estudo para avaliar alterações das condições ambientais (FAIRHEAD et al., 2006; RUNCIE; TOWNSEND; SEEN, 2009; BECKER et al., 2011).

2.3 Principais aspectos ambientais e toxicológicos dos elementos químicos

De suma relevância, a presença dos metais afeta todas as formas de vida. Todavia, alguns destes elementos configuram-se como essenciais aos metabolismos e outros como tóxicos dependendo da dose e da forma química em que se encontram (TAVARES; CARVALHO, 1992). Embora, os elementos traço sejam componentes essenciais de estruturas biológicas, em concentrações superiores as necessárias para as funções biológicas tornam-se tóxicos. Com relação à substituição dos elementos essenciais pelos não essenciais, a configuração eletrônica e as propriedades similares, acarretam em alterações indesejáveis ao sistema biológico, possibilitando a ocorrência de inibição das suas funções (SALGADO, 2008). Como exemplos podem ser citados alguns metais como o Cu,

Mo e Zn que são micronutrientes essenciais para vários processos fisiológicos e bioquímicos, e que passam a ser considerados tóxicos quando a concentração ultrapassa os limites essenciais. Por outro lado, os metais Cd e Pb são tóxicos mesmo em concentrações muito baixas, não apresentando importância conhecida para o metabolismo (RAI; GAUR; KUMAR, 1981; ALLAN, 1997; SUNDA; HUNTSMAN, 1998).

A capacidade de alguns elementos químicos de reagirem com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas provoca sua bioacumulação e biomagnificação, ocasionando a sua persistência no ambiente e distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos (SALGADO, 2008). Os metais podem se ligar as algas provavelmente devido a presença de sítios de ligação aos quais os metais são adsorvidos na superfície da célula como na parede celular, na membrana externa e em polissacarídeos, e a ligantes citoplasmáticos como, por exemplo, as metalotioneínas (MEHTA; GAUR, 2005).

Alguns metais como Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e V são capazes de formar espécies reativas de oxigênio, ocasionando a deterioração oxidativa de macromoléculas biológicas (STOHS; BAGCHI, 1995; LIVINGSTONE, 2001).

A presença de As no meio ambiente está, geralmente relacionada a contaminação ambiental, é considerado um potente veneno e uma substância cancerígena para os seres humanos e sua toxicidade varia de acordo com a espécie química. Na forma orgânica, especialmente na forma metilada, o arsênio é menos tóxico e bastante comum, particularmente em organismos marinhos, como peixes, algas ou crustáceos como a lagosta (KAIN; SCHWEDERSKI, 1994a).

O Cd é encontrado na crosta terrestre e faz parte da constituição natural da água do mar, onde níveis mais elevados podem ser observados perto de áreas costeiras, o que pode ocasionar um acúmulo nos organismos aquáticos, sendo a sua absorção por esses organismos influenciada pela dureza da água (Ca^{+2} e Mg^{+2}), quanto maior a concentração do íon Ca menor a captação de Cd pelas guelras dos peixes, conseqüentemente menor acúmulo e toxicidade do metal (ATSDR, 2008a; SALGADO, 2008). Além disso, o Cd altera o metabolismo de alguns bioelementos necessários ao organismo como o Ca, Cu, Fe, Se e Zn, podendo substituí-los em vários processos bioquímicos devido a competição pela captação no interior das células (SALGADO, 2008).

O Pb é um dos contaminantes mais comuns do ambiente, considerado como um elemento que possui efeitos tóxicos sobre os seres vivos, e sem nenhuma função fisiológica no organismo (MOREIRA; MOREIRA, 2004). Apresenta a capacidade de interagir com outros bioelementos como o Ca, Fe, P e Zn alterando os processos bioquímicos dependentes destes elementos. Tem sido observado que a deficiência desses elementos aumenta a toxicidade de Pb, devido a sua maior absorção e deposição (SALGADO, 2008).

O Cr tem como principais fatores que regulam a sua toxicidade o estado de oxidação e a solubilidade (ATSDR, 2008b). O cromo trivalente é um elemento essencial que desempenha papel importante no metabolismo da glicose, lipídeos e proteínas (WHO, 1996). Por outro lado, o cromo hexavalente é um potente agente oxidante, tóxico, irritante e corrosivo, além disso, é móvel na maioria dos sistemas, solo e água e apresenta facilidade de penetração nas membranas celulares (ATSDR, 2008b). Ademais, a fitotoxicidade do cromo pode resultar na degradação do conteúdo de pigmentos, no balanço de nutrientes, no aumento da atividade de enzimas antioxidantes e na indução de estresse oxidativo em algas (ÜNAL; IŞIK; SUKATAR, 2010).

O Cu é um metal essencial utilizado como cofator de diversas enzimas celulares, como catalase, citocromo oxidase, dopamina- β -hidroxilase e peroxidases. Contudo, níveis excessivos de Cu inibem os grupos sulfidrilas das enzimas como da glicose-6-fosfatase e glutathione redutase. O Cu também é considerado essencial para toda a biota, e estudos nutricionais demonstraram que é necessário para o bom crescimento de plantas e animais (WHO, 1998).

A toxicidade do Cu geralmente diminui com o aumento da dureza da água, provavelmente pela competição entre Ca e Cu pelos sítios de adsorção em superfícies biológicas (WHO, 1998).

O Mn não ocorre no ambiente como um metal puro, mas sim combinado com outras substâncias como Cl, O e S (ATSDR, 2008c). É considerado um nutriente essencial, que tem a sua função bem estabelecida na fotossíntese na sua forma bivalente, além de ser importante como centro das enzimas hidrolítica e fosfato transferrina. Também está associado ao metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos. Além disso, desempenha papel como centro redox de várias enzimas, das quais podem ser citadas a ribonucleotídeo redutase, catalase e peroxidase (KAIN; SCHWEDERSKI, 1994b).

O Mo é um elemento natural encontrado em vários minérios. Em plantas e organismos inferiores, as enzimas dependentes de molibdênio estão envolvidas na fixação de nitrogênio molecular atmosférico no ciclo de nitrogênio e também numa série de outras reações de oxi-redução (WHO, 1996). A primeira evidência da essencialidade do Mo foi quando descobriram a sua participação na enzima xantina oxidase/desidrogenase na conversão das purinas em ácido úrico (WHO, 1996).

O Ni tem como funções mais prováveis como cofatores em metaloenzimas ou metaloproteínas. Alguns tipos de enzimas contendo níquel que foram identificadas são urease, hidrogenase, metilcoenzima M redutase e desidrogenase de monóxido de carbono. Além disso, pode também ter um papel na função da glândula endócrina, tal como sugerido pelo seu efeito sobre os níveis de prolactina (ATSDR, 2005a).

O V é um elemento de transição que age como inibidor de algumas enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ nas membranas plasmáticas, fosfatase alcalina, glicose-6-fosfatase, ribonuclease. Outros estudos provam que esse elemento estimula a absorção de glicose, a oxidação e síntese do glicogênio e a capacidade de induzir a proliferação celular (ATSDR, 2009).

O Zn é um componente essencial que está presente em todos os organismos, é importante para a atividade de várias enzimas, além de atuar como estabilizador de estruturas moleculares. Além disso, participa da síntese de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (KAIN; SCHWEDERSKI, 1994c). Este elemento também tem um papel essencial na manutenção da estrutura do ácido nucleico (ATSDR, 2005b). É importante destacar que a presença do Zn no meio aquático é dependente do pH, da salinidade e de agentes complexantes, sendo estes fatores os principais responsáveis pela adsorção e mobilidade do zinco (ATSDR, 2005b).

2.4 Preparo de amostras

A etapa de preparo de amostra, visando à determinação de elementos traço em materiais orgânicos e inorgânicos, merece destaque dentro da sequência analítica uma vez que, trata-se da etapa mais crítica, mais demorada e de maior custo. De maneira geral, é onde ocorre a maior parte dos erros, os quais frequentemente limitam a exatidão que pode ser alcançada em uma análise

(SKOOG et al., 2006a; SNEDDON et al., 2006; GONZALEZ et al., 2009; KRUG; NÓBREGA, 2010).

O método de preparo de amostra consiste em submeter a amostra a um tratamento adequado de forma que seja compatível com a instrumentação para a determinação dos analitos. A maneira de se decompor a amostra para a análise depende de sua natureza, do elemento a ser determinado e sua concentração, da técnica de determinação, da precisão e exatidão desejadas (KRUG; NÓBREGA, 2010). Além disso, o procedimento escolhido deve ser eficiente, apresentar uma considerável frequência analítica e sempre que possível ser rápido, simples de ser realizado e utilizar pequenos volumes de reagente (ARRUDA; SANTELLI, 1997; FLORES et al., 2007).

Os erros mais comuns durante o preparo de amostra estão relacionados à dissolução incompleta dos analitos, perdas de analito por volatilização, introdução de um analito como um contaminante do solvente, ou contaminação a partir da reação do solvente com as paredes do frasco. Entretanto, além destas, inúmeras outras fontes podem contribuir para a diminuição da exatidão de uma análise (ARRUDA; SANTELLI, 1997; KRUG; NÓBREGA, 2010).

Em geral, a determinação de elementos em amostras de natureza orgânica constitui um grande problema analítico, devido à necessidade de converter os elementos da matriz orgânica em uma forma inorgânica simples conveniente para análise (MAGALHÃES et al., 2010). Assim, o desenvolvimento de procedimentos de preparo de amostra adequados à técnica de determinação, é de grande relevância para garantir a qualidade dos resultados de determinada análise.

Segundo Knapp (1991), os procedimentos de decomposição de amostras podem ser classificados conforme mostrado na Tab. 1. Cabe destacar que neste trabalho será dada maior ênfase a decomposição por via úmida, dando preferência aos procedimentos em sistema fechado e assistidos por radiação micro-ondas.

Outras técnicas de preparo de amostra que podem ser mencionadas são a fusão que é empregada para a decomposição de materiais que são insolúveis em ácidos minerais concentrados ou que são atacados lentamente e/ou dissolvidos parcialmente. Entre os materiais de difícil dissolução em ácidos podem ser citados por exemplo cimentos, aluminatos e silicatos (COSTA et al., 2010). A decomposição em sistema aberto ou fechado com aquecimento convencional utiliza um ácido concentrado ou uma mistura de ácidos, como agente oxidante da matéria orgânica

sob aquecimento, a quantidade de ácido utilizada vai depender da massa de amostra e do tipo de matriz (MATUSIEWICZ, 2003; FLORES et al, 2010).

Técnicas que envolvem a combustão em sistema aberto como a decomposição de amostra em fornos tipo mufla com temperatura controlada, que tem como inconveniente o fato de ser um procedimento em que há sempre o risco de perda de analitos voláteis (KORN et al., 2008). Para minimizar as perdas por volatilização uma alternativa é o sistema de decomposição em baixas temperaturas com oxigênio excitado, onde a decomposição da amostra de natureza orgânica ocorre em um sistema de baixa pressão na faixa de 1 a 5 Torr por aplicação de um campo elétrico de alta frequência. Desta forma, o oxigênio é convertido a oxigênio excitado e a amostra é submetida a ação dessas espécies oxidantes e é decomposta a temperaturas que não excedem a 200 °C. Dentro das técnicas de combustão em sistema aberto também cabe destaque a combustão iniciada por micro-ondas focalizada que foi proposta recentemente (MESKO et al., 2010) onde é possível utilizar massas de amostra maiores e reduzir o consumo de reagentes, permitindo assim a posterior determinação de elementos em baixas concentrações.

Dentre as técnicas que envolvem a combustão em sistema fechado, podem ser citadas as técnicas clássicas como a bomba de combustão e o frasco de Schöniger. Além disso, uma alternativa mais recente, é a combustão iniciada por micro-ondas (MIC). Ambos os métodos de preparo foram desenvolvidos para a decomposição de amostras orgânicas e biológicas, promovendo a oxidação completa da matriz da amostra e possibilitando a recuperação quantitativa dos analitos. A decomposição utilizando a bomba de combustão permite a obtenção de digeridos com teor de carbono considerado relativamente inferior quando comparado com os digeridos após decomposição por via úmida, além disso permite o uso de massa de amostra relativamente maior (até 1,5 g) o que permite a obtenção de baixos LODs. Apresenta como desvantagens a baixa frequência analítica e problemas relacionados a contaminação devido as paredes do frasco e dos eletrodos serem difíceis de serem lavados. No frasco de Schöniger a massa de amostra utilizada está vinculada ao tamanho do frasco de decomposição, a quantidade de amostra que pode ser decomposta é pequena o que limita a sua aplicação para a determinação em concentrações muito baixas dos analitos. A frequência de análise também é baixa, mas o procedimento é mais rápido do que o da bomba de combustão (BARIN; FLORES; KNAPP, 2006; FLORES et al., 2007). A

combustão iniciada por micro-ondas apresenta como principais características o mínimo consumo de reagentes, pequeno tempo de decomposição, boa frequência de análise (até oito amostras simultaneamente) e permite uma etapa de refluxo. Além disso, os teores de carbono residual (RCC) são considerados baixos, normalmente inferiores a 1% do carbono original correspondente, os valores obtidos para os brancos são relativamente baixos e a etapa de descontaminação é simples e rápida (FLORES et al., 2004; MESKO, 2004; FLORES et al., 2007).

Tabela 1 - Classificação dos procedimentos de decomposição de amostras, adaptado de Knapp, 1991.

Fusão		
Via úmida		
Sistema aberto	Sistema fechado	Sistema em refluxo
Aquecimento convencional	Aquecimento convencional	Aquecimento convencional
Aquecimento com radiação micro-ondas	Aquecimento com radiação micro-ondas	Aquecimento com radiação micro-ondas
Combustão		
Sistema aberto	Sistema fechado	Sistema dinâmico
Via seca	Bomba de combustão	Trace-O-Mat®
Sistema a baixa temperatura com oxigênio excitado	Frasco de Schöniger	
	Combustão iniciada por micro-ondas	
Sistema de Wickbold		

2.4.1 Decomposição por via úmida

A decomposição de materiais orgânicos ou biológicos por via úmida envolve o aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante, geralmente concentrado, ou com uma mistura de dois ou mais ácidos oxidantes, ou então com a mistura de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a fim de manter o meio oxidante, sem aumentar o resíduo ácido (FLORES et al., 2010). Dentre os ácidos com propriedades oxidantes usados na decomposição por via úmida de amostras orgânicas e biológicas podem ser citados o ácido nítrico (HNO_3), o ácido

sulfúrico (H_2SO_4) e o ácido perclórico (HClO_4). Estes ácidos podem ser utilizados individualmente, com exceção do ácido perclórico, ou combinados uns com os outros (SECO-GESTO et al., 2007; FLORES et al., 2010). Além destes, outros ácidos não oxidantes também podem ser utilizados, como o ácido clorídrico (HCl) e o ácido fluorídrico (HF) que são bons agentes complexantes, os quais podem estabilizar muitos analitos na solução (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

O emprego de ácido mineral oxidante possibilita a oxidação completa da maioria das amostras orgânicas, disponibilizando os analitos a serem determinados em solução ácida em formas inorgânicas simples e apropriados à análise (FLORES et al., 2010).

Quanto à escolha do ácido ou da mistura de ácidos a ser utilizada na decomposição por via úmida de materiais orgânicos e biológicos, algumas características a respeito de cada ácido devem ser consideradas como, por exemplo, o ponto de ebulição, o poder oxidante e o grau de pureza (COSTA et al., 2010).

Para a decomposição de amostras, geralmente é utilizada a mistura azeotrópica do HNO_3 concentrado com H_2O a 65% (m/m), o qual apresenta menor ponto de ebulição, e por isso a baixa temperatura é um fator limitante a sua eficiência oxidativa. Sendo assim, é muito difícil oxidar completamente as amostras utilizando somente este ácido (FLORES et al., 2010). A força oxidante deste ácido pode ser melhorada pela adição de clorato, permanganato, peróxido de hidrogênio ou bromo, ou ainda pelo aumento de temperatura associado a um aumento de pressão (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

A presença de fumos marrons de NO_2 é um indicativo de que há ainda matéria orgânica sendo oxidada pelo HNO_3 , sendo a recíproca não verdadeira, ou seja, a ausência de fumos marrons não é uma indicação exata de que toda matéria orgânica foi oxidada (FLORES et al., 2010).

O ácido sulfúrico (H_2SO_4) é um ácido forte, com ponto de ebulição mais alto dentre os ácidos minerais concentrados, mas o processo de oxidação da matéria orgânica é bastante lento. Devido ao ponto de ebulição (338 °C) desse ácido, ser superior a temperatura suportada pelos frascos de politetrafluoretileno (PTFE), onde temperatura inferior a 240 °C é considerada desprezível, sem deformações, é mais conveniente a escolha de frascos de vidro ou de quartzo para a dissolução de

materiais que utilizem esse ácido. Na maioria das vezes, é utilizado em combinação com HNO_3 , HClO_4 ou H_2O_2 (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997; FLORES et al., 2010).

O ácido perclórico (HClO_4) é um ácido com alto poder de oxidação, mas, quando utilizado isoladamente, torna-se muito perigoso devido ao risco iminente de explosão, por reagir rapidamente com a matéria orgânica. Na prática, recomenda-se usar o HClO_4 sempre em combinação com outro ácido, normalmente utiliza-se após a adição de HNO_3 (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997). É importante salientar que o ácido perclórico não deve ser empregado em sistemas fechados por razões de segurança, devido às reações violentas que podem causar a explosão do frasco de decomposição em função do aumento súbito de pressão (FLORES, 2010).

O ácido clorídrico (HCl) é um ácido não oxidante que apresenta fracas propriedades redutoras durante a dissolução. Alguns metais como Au, Cd, Fe, e Sn, podem ser dissolvidos por esse ácido, mas a dissolução pode ser acelerada pela adição de um outro ácido, é frequentemente utilizado em combinação com ácido nítrico (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

O ácido fluorídrico (HF) é um ácido não oxidante cuja reatividade é baseada na sua intensa capacidade natural de complexação. É mais comum ser utilizado em análises inorgânicas devido a sua capacidade de dissolver silicatos (SUCHAROVÁ; SUCHARA, 2006). Para melhorar a dissolução, esse ácido é rotineiramente combinado com um outro ácido, tal como ácido nítrico. Fluoretos insolúveis podem muitas vezes ser solubilizados através da remoção do ácido fluorídrico após a digestão (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

Além da utilização de ácidos, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) concentrado, cerca de 30% (m/m) é utilizado na digestão, sendo frequentemente adicionado após o ácido primário ter realizado uma pré-digestão da matriz orgânica da amostra, com isso completa a digestão e os riscos potenciais de reações violentas são minimizados (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997). O seu uso apresenta vantagens como a água ser o único produto de decomposição presente, estar disponível com alto grau de pureza e de ser um agente oxidante poderoso de materiais orgânicos (COSTA et al., 2010).

Para propósitos gerais, prefere-se uma mistura de ácidos, ou então o uso sequenciado de ácidos. Quando se utiliza a associação de H_2SO_4 e HNO_3 é

importante inicialmente aquecer a amostra com H_2SO_4 até o aparecimento de fumos do ácido e após adicionar HNO_3 gota a gota de forma a evitar uma reação brusca, e em seguida colocar maiores volumes para completar a oxidação da matéria orgânica da amostra. Quando se emprega HNO_3 e HClO_4 é necessário inicialmente oxidar a amostra somente com HNO_3 , restando apenas o material que não é oxidado pelo HNO_3 a 120 °C, após esperar a mistura esfriar e adicionar cuidadosamente o HClO_4 , reaquecer para completar a oxidação, desta forma o uso do HClO_4 é mais seguro (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997; COSTA et al., 2010).

Conforme Mermet (1997) as principais características dos ácidos empregados na decomposição por via úmida podem ser resumidos de acordo com a Tab. 2.

Tabela 2 - Principais propriedades dos ácidos utilizados para a digestão, adaptado de Mermet, 1997.

Ácidos oxidantes	Forma	TE (°C)	Frascos	Combinação ácida
HNO_3	Azeótropo: 65%, 14,4 mol l ⁻¹	122	Todos	HCl para ligas água régia (3:1)
HClO_4	Azeótropo: 72%, 12 mol l ⁻¹	203	Todos	—
H_2SO_4	Concentrado 98%, 18 mol l ⁻¹	338	Vidros de borosilicato ou de quartzo	HNO_3 para compostos orgânicos
Ácidos não oxidantes	Forma	TE (°C)	Frascos	Combinação ácida
HCl	36%, 12 mol l ⁻¹ azeótropo: 20%	110	Todos	HNO_3 para ligas
HF	48%, 29 mol l ⁻¹ azeótropo: 38%, 22 mol l ⁻¹	112	Politetrafluoretileno (PTFE)	Complexação com H_3BO_3

Dessa forma, se os ácidos forem suficientemente oxidantes, e se o aquecimento for feito a elevadas temperaturas durante um período de tempo adequado, é possível oxidar completamente a maioria dos compostos orgânicos presentes na amostra, deixando os analitos a serem determinados na solução ácida

em formas inorgânicas, simples e apropriados para análise (SECO-GESTO et al., 2007; FLORES et al., 2010).

A decomposição por via úmida pode ser feita utilizando sistema aberto ou fechado e ainda com aquecimento condutivo ou assistido por radiação micro-ondas. A seguir será dado maior enfoque a decomposição com aquecimento por radiação micro-ondas, que proporcionam decomposições mais rápidas e seguras quando comparadas ao aquecimento condutivo, devido à absorção direta da energia pela solução contendo a amostra (ARRUDA; SANTELLI, 1997).

A radiação micro-ondas é um tipo de energia radiante, caracterizada como radiação eletromagnética que compreende uma faixa de frequência do espectro eletromagnético de 300 a 300000 MHz, sendo que os fornos de micro-ondas fabricados para os laboratórios utilizam micro-ondas com frequência de 2450 MHz. Neste contexto, a radiação micro-ondas apresenta uma energia relativamente baixa e por isso existem ligações químicas na matriz da amostra que não podem ser quebradas por essa radiação (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

Ao contrário dos sistemas baseados no aquecimento condutivo como por exemplo a chapa aquecedora, e o bloco digestor, o aquecimento por radiação micro-ondas envolve a absorção direta de energia pelo material que está sendo aquecido, sendo que o frasco que contém a amostra tem que ser transparente a radiação e, por esta razão, a solução é diretamente aquecida (NOGUEIRA et al., 2010).

É importante destacar que o aumento de temperatura rápido e uniforme ocorre devido à interação da radiação eletromagnética com os íons e espécies polares dissolvidos em solução usada para a decomposição da amostra, provocando dois fenômenos, o da migração iônica e o da rotação de dipolos (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

A migração iônica ocorre devido ao movimento eletroforético dos íons em solução dentro do campo elétrico oscilante das micro-ondas. Como consequência é gerada uma resistência a este fluxo de íons causado por outras espécies com fluxo oposto. O fenômeno de rotação dipolar é explicado pelo movimento das moléculas polares dentro do campo elétrico oscilante da radiação micro-ondas, assim as moléculas se alinham ao campo e quando retornam a posição inicial, liberam energia, promovendo o aquecimento rápido do meio reacional devido ao aumento de

temperatura de ebulição da solução (TREVIZAN, et al., 2007; NOGUEIRA et al., 2010).

2.4.1.1 Decomposição por via úmida em sistema aberto assistida por radiação micro-ondas

Os sistemas de decomposição abertos, aquecidos por radiação micro-ondas, operam a pressão atmosférica, sendo isso uma vantagem por não apresentarem problemas relacionados ao aumento de pressão que ocorre nos sistemas fechados. A perda potencial de espécies voláteis é controlada através da condensação dos vapores em um condensador situado na parte superior do frasco. Além disso, permite a evaporação dos reagentes até secar de forma rápida e eficiente. A maioria destes sistemas opera com a radiação micro-ondas focalizada (NÓBREGA et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2010).

Existem procedimentos analíticos que podem ser realizados de maneira mais adequada nos sistemas focalizados, principalmente nas situações que requerem a decomposição de grande quantidade de material orgânico ou quando são necessárias múltiplas adições de ácido concentrado durante a decomposição da amostra, permitindo assim um ataque sequencial pelo ácido (NÓBREGA et al., 2002; COSTA et al., 2005).

Existem alguns sistemas disponíveis comercialmente, os quais apresentam duas ou seis cavidades com apenas um magnetron, o que dificulta a distribuição homogênea da radiação micro-ondas. No entanto, este problema pode ser atenuado pelo controle de temperatura no frasco de reação (COSTA et al., 2001).

A grande desvantagem dos sistemas de micro-ondas com radiação focalizada está relacionada com as quantidades elevadas de ácidos concentrados, especialmente ácido sulfúrico (H_2SO_4), que é usado para atingir temperaturas elevadas à pressão atmosférica, melhorando a eficiência da digestão da amostra (NÓBREGA et al., 2002). Entretanto, o emprego de grandes quantidades de ácidos pode ocasionar um aumento nos valores de branco. Além disso, a presença de ácidos concentrados nos digeridos da amostra não são suportados por algumas técnicas analíticas, tais como a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente

acoplado (ICP OES) e cromatografia de íons (IC). Nesse caso, faz-se necessário uma etapa adicional para remover ou diluir o ácido residual (TODOLÍ; MERMET, 1999).

O uso da decomposição por via úmida em sistema aberto assistida por radiação micro-ondas focalizada foi utilizado por Meeravali e Kumar (2000) para a decomposição de amostras de algas para a posterior determinação dos metais Cu, Mn e Ni por ET AAS. Boas recuperações para todos os analitos foram obtidas na faixa de 90 a 106%, os RSDs variaram de 2 a 6%.

Em outro trabalho, Costa et al. (2009) avaliaram a possibilidade de perda por volatilização dos analitos As, Cd, Pb, Se e Zn durante a decomposição da amostra por radiação micro-ondas focalizada utilizando como amostras mexilhão, ostra e molusco. Quando realizada a determinação dos analitos no CRM NIST 1566b (*Oyster tissue*) após o preparo por decomposição assistida por radiação micro-ondas focalizada foram observadas perdas para todos os analitos. Com base nos resultados obtidos, os autores concluíram que o emprego da decomposição assistida por radiação micro-ondas focalizada a pressão atmosférica para a posterior determinação de analitos voláteis deve ser muito bem avaliada devido ao fato de se tratar de um sistema aberto propenso a perdas por volatilização.

2.4.1.2 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas

Na decomposição de amostras em sistemas fechados é necessária a utilização de frascos de decomposição apropriados e a temperatura e pressão empregadas precisam ser controladas. As principais vantagens destes sistemas em relação aos sistemas abertos são a ausência de perdas de elementos voláteis; diminuição dos riscos de contaminação por fontes externas, desde que sejam usados ácidos com alto grau de pureza; redução das quantidades dos reagentes utilizados no procedimento de decomposição, diminuindo assim os valores dos brancos; e a redução no tempo de reação quando se trabalha em temperaturas acima do ponto de ebulição dos reagentes (FLORES et al., 2010).

A principal limitação dos sistemas fechados está relacionada à quantidade de massa de amostra utilizada, uma vez que, a pressão interna que se desenvolve

dentro do frasco de decomposição depende da pressão de vapor do ácido empregado e da pressão oriunda dos produtos gasosos gerados no processo de decomposição. A completa oxidação das substâncias orgânicas presentes na amostra tem como principal produto gasoso gerado o CO_2 que é proporcional a massa de carbono na amostra. Outros produtos gasosos gerados que podem ser citados, quando utilizado o ácido nítrico, são NO e NO_2 que estão diretamente relacionados à oxidação do carbono presente na amostra (FLORES et al., 2010).

Atualmente, grande parte dos trabalhos encontrados na literatura para a determinação de metais em matrizes biológicas utiliza a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (FARÍAS et al., 2002; MOREDA-PIÑEIRO et al., 2007; ROCHA et al., 2009; TUZEN et al., 2009; LARREA-MARÍN et al., 2010; AKCALI; KUCUKSEZGIN, 2011; MOREDA-PIÑEIRO et al., 2012; RYAN; MCLOUGHLIN; O'DONOVAN, 2012; RYBAK; MESSYASZ; LESKA, 2012), sendo alguns destes trabalhos mais detalhados a seguir.

O uso da decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas foi proposto por Farías et al. (2002), para a decomposição de onze espécies de macroalgas oriundas da Antártica para a posterior determinação dos metais As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn por ICP OES. A decomposição das amostras foi feita em forno micro-ondas em sistema fechado com frascos de PTFE. Com relação à etapa de decomposição das amostras, foram utilizados 2 ml de H_2O_2 , 8 ml de HNO_3 concentrado e 2 ml de HF, esta mistura foi deixada em *overnight*. No dia seguinte a mistura foi submetida a um programa de aquecimento no forno de micro-ondas (250 W - 2 min; 0 W - 2min; 250 W - 5 min; 400 W - 5 min; 600 W - 5 min), após resfriamento (intervalo de no mínimo 2 h) foram adicionados 2 ml de HNO_3 concentrado e 2 ml de HClO_4 , esta mistura foi então submetida a um segundo programa de aquecimento no forno de micro-ondas (250 W - 2 min; 0 W - 2 min; 250 W - 5 min; 450 W - 5 min). Após resfriamento, as soluções resultantes foram lentamente evaporadas até a secura, os resíduos obtidos foram dissolvidos em 2,5 ml de HNO_3 concentrado e depois avolumados a 50 ml. Para avaliar a exatidão do método os autores utilizaram um material de referência certificado (CRM) BCR 279 (*Ulva lactuca*) que foi submetido às mesmas condições de preparo das amostras. Após os elementos nas soluções obtidas das amostras e do CRM foram determinadas por ICP OES, onde as concentrações dos elementos traço nas

macroalgas variaram de $< 0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd a $3095 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe. A alta concentração de As $112 \mu\text{g g}^{-1}$ encontrada em uma espécie de alga pode ser devido às características geológicas da Península Potter. Os resultados para As, Cu, Pb e Zn determinados no CRM apresentaram concordância na faixa de 92 a 99% com o valor certificado, o Se ficou abaixo do limite de detecção do método. O Cd apresentou um valor acima do valor certificado, onde os autores justificam ser devido a alguma contaminação na etapa de pré-tratamento. Assim, baseados nos resultados obtidos os autores sustentam a hipótese sobre a capacidade seletiva das macroalgas de acumular contaminantes inorgânicos servindo, portanto, como biomarcadores para avaliar a contaminação da Antártica.

Em outro trabalho, Moreda-Piñeiro et al. (2007) utilizaram a decomposição por via úmida assistida por micro-ondas para o preparo de amostras de algas comestíveis para a posterior determinação dos metais As, Ca, Cd, Co, Cr, K, Mg, Mn, Na, Pb, Sr e Zn por ICP OES. Os resultados obtidos após a decomposição por MWAD foram utilizados para comparar com os resultados obtidos pela técnica de extração líquida sob pressão proposta pelos autores. A decomposição por via úmida foi feita utilizando 0,5 g de amostra, 4 ml de H_2O ultra-pura, 2 ml de H_2O_2 concentrado e 4 ml de HNO_3 concentrado, os quais foram acrescentados no frasco de PTFE e a decomposição foi realizada a 250 W por 10 min e 500 W por 10 min seguido de 40 min de resfriamento, a temperatura máxima atingida foi de 200°C , após as soluções foram filtradas em papel filtro nº 40 e diluídas com 25 ml de água ultra-pura. Os resultados obtidos com a técnica proposta pelos autores tiveram a sua exatidão avaliada pela decomposição de dois CRMs o NIES-03 (*Chlorella kessleri*) e o NIES-09 (*Sargasso*) os quais apresentaram concordância entre o valor determinado e o valor certificado que variou numa faixa de 97 a 103% para os analitos Ca, Co, K, Mg, Mn, Sr e Zn. O procedimento de preparo de amostra MWAD apresenta como vantagem em relação ao procedimento proposto, o custo do equipamento utilizado no preparo da amostra ser bem menor.

A decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas foi aplicada para a decomposição de algas comestíveis para posterior determinação de As, Cd, Co, Cr, Mo, Ni, Pb, Sb, Se e V por ICP-MS. A fim de otimizar a decomposição das amostras, várias modalidades foram analisadas com diferentes concentrações de HNO_3 de 2,5 ml a 5 ml em intervalos de 0,5 ml e H_2O_2 de 0 ml a 2,5 ml, em intervalos de 0,5 ml em uma mistura de ácido de 5 ml; tempos de digestão variados

de 5 min a 10 min, em intervalos de 1 min e várias potências do micro-ondas de 200 W a 650 W, em intervalos de 50 W. O método que utilizou o menor volume, potência e tempo de decomposição foi considerado o mais conveniente e, por isso, selecionado. Uma massa de 0,5 g de cada amostra de alga seca e do CRM foi pesada e introduzida em um frasco de tetrafluormetoxi (TFM) de alta pressão, juntamente com a adição de 4,5 ml de HNO_3 e 0,5 ml H_2O_2 . O programa de aquecimento consistiu de 6 etapas (250 W - 2 min; 0 W - 2 min; 250 W - 2 min; 400 W - 5 min; 0 W - 2 min; 600 W - 6 min). Amostras digeridas foram transferidas para um frasco e avolumados a 50 ml com água ultra-pura. A exatidão do método foi avaliada submetendo três materiais de referência certificado (BCR 279 - *Ulva lactuca*; NCS ZC78006 - *Tea*; NIST 1547 - *Peach leaves*) aos mesmos procedimentos de preparo que as amostras. Com a otimização do procedimento de preparo de amostra foi possível decompor simultaneamente 10 amostras em um tempo de 23 min, além disso, outra vantagem foi a pequena quantidade de reagente necessário para decompor a amostra o que reduz significativamente o potencial de contaminação do meio ambiente (ROCHA et al., 2009).

O uso da decomposição assistida por radiação micro-ondas em sistema fechado foi proposta por Akcali e Kucuksezgin (2011) para avaliar a concentração de metais em oito estações costeiras do mar Aegean, para isso foram coletadas amostras de algas, água e sedimento a fim de avaliar as condições ambientais da região. Os autores também utilizaram várias espécies de algas comuns à região com o objetivo de descobrir quais as mais adequadas para o biomonitoramento da região, servindo como um padrão bioindicador da contaminação ambiental. Entre as espécies estudadas as que apresentaram alto potencial bioacumulador foram a alga marrom *Cystoseira* sp., as algas verdes *Ulva* sp. e *Enteromorpha* sp., sendo neste estudo os metais avaliados Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb e Zn. Para o preparo das amostras de algas foram utilizados 1g de amostra e uma mistura de ácidos HNO_3 , HF, HClO_4 e HCl, e após foram digeridas em um forno de micro-ondas. O Hg foi determinado por espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio e os demais elementos por espectrometria de absorção atômica com atomizador em chama ou forno de grafite. Para a avaliação da exatidão foi utilizado um material de referência de planta do mar (IAEA-140/TM). Entre os metais considerados essenciais a ordem de concentração foi $\text{Fe} > \text{Zn} > \text{Cu}$, enquanto que para os metais considerados não essenciais para as atividades metabólicas a ordem de

concentração foi Cr>Cd>Hg>Pb. Cabe ressaltar que significantes variações nas concentrações dos metais foram observadas de acordo com as estações climáticas, onde as concentrações de Hg e Pb foram maiores na primavera e as concentrações de Cd, Cr, Cu, Fe e Zn foram maiores no inverno.

A decomposição por via úmida assistida por micro-ondas foi aplicada para avaliar a concentração de metais total, intracelular e ligado na superfície de quatro espécies diferentes de algas. As amostras foram digeridas em um forno micro-ondas, foram utilizados 300 mg de amostra, 5 ml de HNO₃, 3 ml de água deionizada e 2 ml de H₂O₂. Após as amostras foram submetidas a um programa de aquecimento em um forno de micro-ondas, 80 °C a 600 W por 2 min, após aumentou para 160 °C por 2 min e subsequentemente para 200 °C por 4 min a 1200 W. Os analitos As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn foram determinados por ICP OES, e para avaliar a exatidão foram utilizados os materiais de referência certificados BCR 060 (*Lagarosiphon major*) e NIST 1573a (*Tomato leaves*). As concentrações de As, Mn e Zn foram maiores para todas as espécies estudadas quando comparadas as de Cd, Co, Cr, Cu, Ni e Pb. As variações entre espécies podem ser atribuídas a diferenças na morfologia das algas marinhas (RYAN; MCLOUGHLIN; O'DONOVAN, 2012).

2.4.1.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio

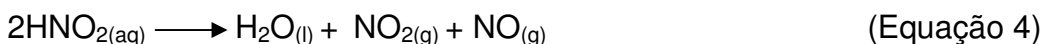
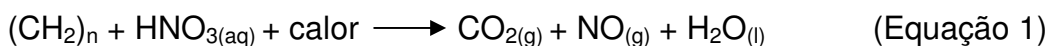
A preparação de amostras utilizando o procedimento de decomposição assistida por micro-ondas utilizando soluções de ácido nítrico diluído sob pressão de oxigênio tem sido uma alternativa empregada para a oxidação da matriz orgânica em amostras biológicas. No entanto, a eficiência deste procedimento depende da composição química da amostra e da temperatura utilizada durante o processo de decomposição (TREVIZAN, et al., 2007; CASTRO et al., 2009; GONZALEZ et al., 2009).

A utilização de ácidos diluídos nos procedimentos de decomposição de amostras orgânicas e biológicas empregando a radiação micro-ondas levaram a vantagens relevantes, tais como, maior segurança, redução de custos devido à menor quantidade de reagentes empregados e, assim, menor geração de resíduos. Além disso, ocorre a obtenção de menores valores de branco e consequentemente

melhores limites de detecção e desvio padrão, redução do risco de interferências na etapa de determinação e também requer menores fatores de diluição antes das medições dos analitos (STEWART; OLESIK, 1998a; STEWART; OLESIK, 1998b; GONZALEZ et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2010).

O ácido nítrico é frequentemente utilizado nos processos de decomposição de amostra por ser de fácil manipulação, purificação e por ser eficiente na oxidação da matriz orgânica presente em amostras biológicas (GONZALEZ et al., 2009). Além disso, o ácido nítrico pode ser utilizado em associação com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é empregado como agente oxidante auxiliar durante a decomposição assistida por radiação micro-ondas (WALTER; CHALK; KINGSTON, 1997).

É importante ressaltar as reações químicas envolvidas durante o processo de decomposição das amostras orgânicas utilizando ácido nítrico diluído. Neste sistema, é gerado, inicialmente, óxido nitroso (NO) gasoso durante a oxidação dos constituintes orgânicos pela ação do ácido nítrico (HNO_3). O óxido nitroso é volatilizado a partir do aquecimento da solução e reage com oxigênio (O_2) presente na fase gasosa do frasco de reação. Neste caso, NO_2 é gerado e este gás condensa devido à superfície fria e então é reabsorvido na solução. Em seguida, uma reação ocorre levando a formação de NO_3^- e NO e o ciclo de reação se repete até o ponto em que não tenha mais O_2 na fase gasosa do recipiente fechado (TREVIZAN et al., 2007). A seguir é mostrada através das reações abaixo a proposta de mecanismo de regeneração do ácido nítrico durante o processo de decomposição da amostra (CASTRO et al., 2009; BIZZI et al., 2010).



Trabalhos recentes têm sido desenvolvidos para mostrar a aplicabilidade da decomposição de amostras utilizando ácidos diluídos, dos quais podem ser citados o trabalho desenvolvido por Castro et al. (2009), onde a eficiência da decomposição utilizando ácido nítrico diluído foi avaliada para amostras de café em pó determinando nos digeridos o teor de carbono residual (RCC) e a acidez residual,

sendo que ambos em altas concentrações interferem na etapa de determinação. Além disso, os autores conseguiram mostrar que a decomposição é dependente das reações químicas que ocorrem no frasco de decomposição na fase líquida e gasosa e que a formação de NO e sua posterior conversão em NO₂ pela ação do O₂ são os principais responsáveis pela regeneração do HNO₃ e pela eficiência na oxidação da matéria orgânica.

O trabalho realizado por Gonzalez et al. (2009) mostra a eficiência da digestão com soluções de ácido nítrico diluído para amostras complexas como grãos de soja, sangue bovino e víscera bovina. A principal hipótese para explicar a eficiência da digestão da matriz orgânica, que pode ser observada pela diminuição no RCC, está relacionada ao gradiente de temperatura no início da decomposição, que foi superior na presença de ácidos diluídos (2 mol l⁻¹), onde variou entre as temperaturas de 180 a 200 °C. Enquanto, para as demais concentrações, 7 mol l⁻¹ e 14 mol l⁻¹, as temperaturas alcançadas foram menores variando de 160 °C a 180 °C. A solução de HNO₃ 2 mol l⁻¹ não foi eficiente para a digestão de amostra de víscera devido ao alto teor de gordura na sua composição, resultando em um RCC de 90%.

Em outros trabalhos foram avaliadas a decomposição de amostras baseada na capacidade de regeneração do HNO₃ na presença de O₂. Bizzi et al., (2010) propuseram o emprego da decomposição por via úmida assistida por micro-ondas sob pressão de oxigênio para a decomposição de amostra de fígado bovino. A concentração de HNO₃ variou de 0,1 a 14 mol l⁻¹ e a pressão de O₂ de 5 a 20 bar. A pressurização dos frascos de decomposição com O₂ melhorou a eficiência da digestão das amostras, sendo esta eficiência avaliada pelo teor de RCC e acidez residual nas soluções obtidas. Depois da otimização do método, foi possível decompor uma massa de amostra de 500 mg utilizando uma solução de HNO₃ 2 mol l⁻¹ e sob pressão de O₂ de 5 bar. O programa de aquecimento no forno de micro-ondas foi realizado com uma rampa de 5 min a 1000 W e mais 10 min a 1000 W, após foi aplicado um resfriamento por 20 min a 0 W. A decomposição foi eficiente com valor de RCC de 13,8% e acidez residual inferior a 24%. Em outro trabalho recente foi proposto pelo autor o uso de O₂ para a decomposição de plantas em sistema fechado empregando a radiação micro-ondas utilizando HNO₃ diluído. A pressão de O₂ avaliada variou de 5 a 20 bar e a concentração de HNO₃ variou de 2 a 14 mol l⁻¹. Foi observado que com o uso de uma solução de HNO₃ 3 mol l⁻¹ e pressão de O₂ de 5 bar foi possível decompor 500 mg de amostra. A eficiência da

digestão foi comprovada pelo valor do RCC igual a 5% e acidez residual nas soluções finais inferior a 45% em relação à quantidade inicial de ácido usado para a decomposição (BIZZI et al., 2011a).

Cabe ressaltar que as amostras botânicas apresentam alto teor de sílica e de compostos orgânicos e baixas recuperações são observadas principalmente para elementos que se associam com silício, como alumínio (Al) e ferro (Fe) e, portanto a adição de reagentes auxiliares como H_2SO_4 , H_2O_2 , H_3BO_4 , HF e HBF_4 são necessários para a completa liberação dos analitos em solução (SUCHAROVÁ; SUCHARA, 2006). Todavia, com o procedimento proposto por Bizzi et al. (2011a) foi possível obter boas recuperações quantitativas para os analitos Al e Fe sem utilizar os reagentes auxiliares, apenas empregando HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 .

Segundo Bizzi et al. (2011b) o processo de regeneração do HNO_3 na presença de O_2 como reagente auxiliar também pode ser aplicado para uma matriz complexa rica em proteínas, gorduras e açúcares como a de leite em pó para posterior determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na e Zn por ICP OES e Hg por CVG-ICP-MS. Foi possível obter uma decomposição eficiente para 500 mg de amostra utilizando HNO_3 2 mol l^{-1} sob pressão de O_2 de 7,5 bar, obtendo baixos teores de carbono residual, menor que 1700 mg l^{-1} e acidez residual menor que 18% (m/m).

No trabalho desenvolvido por Bizzi et al. (2011c) foi avaliada a influência da fase gasosa no interior do frasco de decomposição comparando a digestão sob pressão do ar atmosférico, pressão de um gás inerte (Ar) e pressão de O_2 utilizando como amostra o leite em pó integral. Todas as decomposições foram realizadas utilizando uma solução de HNO_3 2 mol l^{-1} . Quando foram testadas sob pressão do ar atmosférico (1 bar) os valores obtidos de RCC foram em torno de 63% (m/m), neste caso a quantidade de ácido nítrico não foi suficiente para assegurar a completa decomposição da matéria orgânica, por isso apresentou material particulado suspenso e fumos de cor marrom devido a presença de NO_2 na fase gasosa. Quando empregado um gás inerte (Ar - 20 bar) os valores de RCC foram maiores que 51%, as soluções finais apresentaram uma cor amarelada e resíduos remanescentes como partículas suspensas. Quando foi utilizado 20 bar de O_2 as decomposições foram eficientes com RCC menor que 10%. Desta forma, os autores conseguiram comprovar que a ação oxidante do HNO_3 pode ser melhorada se um processo de regeneração deste ácido ocorrer, o qual é dependente da quantidade

de O₂ disponível na fase gasosa durante o processo de oxidação da matéria orgânica. Cabe ressaltar também que, nestas mesmas condições a acidez residual foi elevada, em torno de 20% (m/m), devido ao processo de regeneração do ácido.

2.4.1.4 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) constitui a porção do espectro eletromagnético com comprimento de onda na extensão de 40 a 400 nm. A decomposição de amostras por radiação UV tem sido amplamente aplicada para amostras líquidas como águas naturais, águas residuais, extratos de solos, fluidos biológicos, a fim de reduzir o teor de matéria orgânica dissolvida, uma vez que pode interferir na etapa de detecção. A ação da radiação UV em compostos orgânicos dissolvidos resulta na formação de compostos intermediários que são moléculas extremamente reativas, com características de um potente agente oxidante, que permite que a matéria orgânica seja mineralizada a CO₂ e H₂O. Dentre as espécies reativas formadas pela ação da radiação UV podem ser citadas o oxigênio *singlet*, radicais superóxido e alquilperóxidos, ozônio, radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, íon persulfato e dióxido de titânio (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996).

A decomposição de amostras sólidas ou com elevado teor de carbono, geralmente não é satisfatória em processos fotooxidativos convencionais. Uma alternativa apresentada foi o método de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta proposto por Florian e Knapp (2001) com a finalidade de obter melhor decomposição das amostras e menor teor de carbono residual nas soluções obtidas após o preparo das amostras.

Este método combina as vantagens da decomposição por micro-ondas em sistema fechado com as oriundas da radiação ultravioleta e consiste em inserir a lâmpada de emissão de radiação ultravioleta dentro do frasco de decomposição a qual é ativada pela radiação micro-ondas para agir de forma simultânea no processo de decomposição da amostra (FLORIAN; KNAPP, 2001). A lâmpada de emissão de radiação ultravioleta é construída em quartzo, apresenta o seu interior preenchido com vapor de cádmio (linha de emissão predominante em 228 nm) e uma antena de molibdênio na parte superior (FLORIAN; KNAPP, 2001).

A decomposição por MW-UV-AD tem como princípio de funcionamento a incidência da radiação micro-ondas sob a lâmpada de emissão de radiação UV, a qual é absorvida pelo molibdênio presente na antena da lâmpada que libera uma descarga elétrica no interior do bulbo da lâmpada preenchido com vapor de cádmio a baixa pressão, emitindo assim a radiação UV que apresenta ação catalítica sobre espécies oxidantes como o HNO_3 , O_2 e H_2O_2 o que ocasiona a oxidação da matéria orgânica presente na amostra (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996; FLORIAN; KNAPP, 2001; BENDICHO, 2010).

Florian e Knapp (2001) avaliaram a eficiência da decomposição empregando a radiação micro-ondas e ultravioleta para uma amostra de leite em pó desnatado de 75 mg dissolvidas em 7 ml de água (IRMM, CRM 151) juntamente com uma mistura de ácidos (50 μl de HNO_3 + 50 μl de HCl + 1 ml de H_2O_2) para posterior determinação de Cd, Cu, Fe e Pb onde as recuperações foram entre 96 e 112%. Além disso, o teor de carbono dissolvido foi reduzido em 99% após a decomposição da amostra. Posteriormente, o sistema proposto passou a ser comercializado pela empresa Anton Paar onde a lâmpada de emissão de radiação ultravioleta foi adaptada para ser inserida no frasco de decomposição de quartzo. O sistema comercial para a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta está apresentado na Fig. 1.

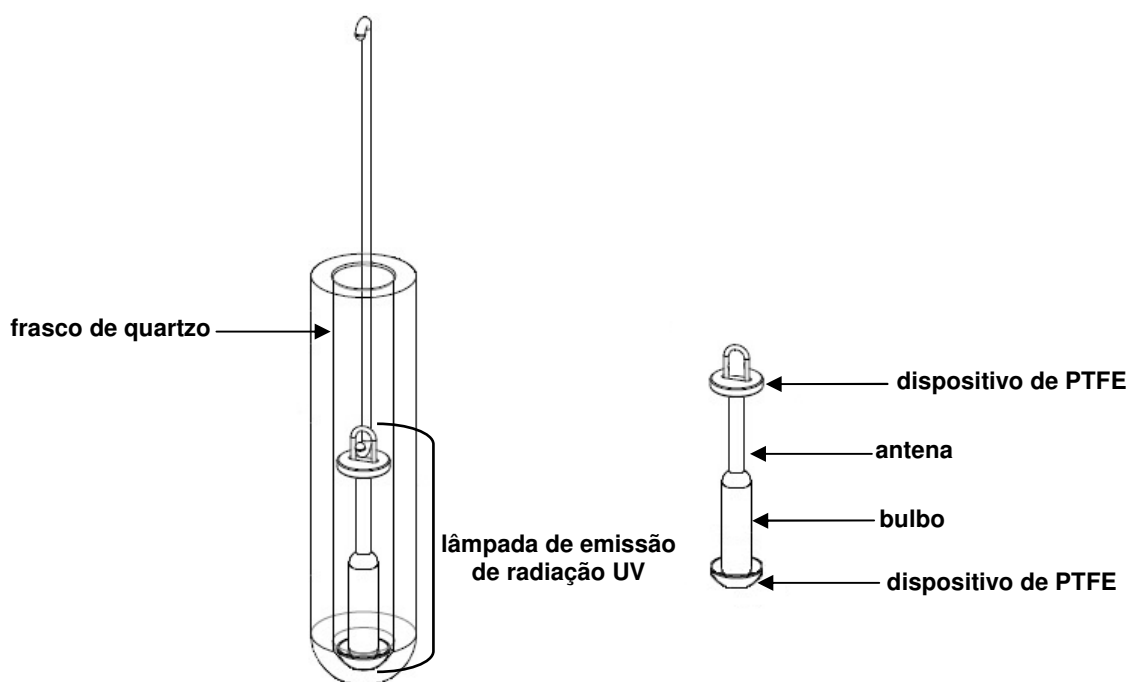


Figura 1 - Sistema comercial para a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, adaptado da Anton Paar (a).

A decomposição por MW-UV-AD também foi aplicada para a decomposição da matéria orgânica dissolvida em amostras de águas ambientais para a subsequente determinação de Pd por espectrometria de absorção atômica com aquecimento eletrotérmico (ET AAS). As amostras apresentavam um teor de matéria orgânica inicial de 11,49 mg l⁻¹. Nas etapas de preparo das amostras foram utilizados HCl, HNO₃, HF e HClO₄ e as decomposições das amostras foram realizadas aplicando um programa com controle de temperatura e pressão com as seguintes etapas, uma rampa de 15 min até a potência desejada (500 W, 750 W ou 1000 W) permanecendo nesta por mais 15 min, sendo utilizada uma alíquota de 10 ml de amostra. O aumento da potência irradiada levou a uma redução significativa no teor de matéria orgânica, de 5,55 mg l⁻¹ para a potência de 500 W; 1,25 mg l⁻¹ para a potência de 750 W e de 0,44 mg l⁻¹ para a potência de 1000 W. Este resultado ocorreu porque a intensidade da radiação emitida pela lâmpada UV durante a decomposição da amostra depende da energia micro-ondas absorvida. Além disso, deve ser destacado, que o aumento da energia micro-ondas leva a um aumento na temperatura de reação dentro do frasco de reação, que intensifica a decomposição da matéria orgânica dissolvida (LIMBECK, 2006).

Posteriormente, Limbeck (2006) utilizou o mesmo procedimento empregando pequenas quantidades de H₂O₂ 0,1% (v/v), que forma espécies reativas que tem a capacidade de acelerar a degradação da matéria orgânica. Nas potências de 500 W, 750 W e 1000 W a degradação da matéria orgânica foi de 0,54 mg l⁻¹, 0,22 mg l⁻¹ e 0,14 mg l⁻¹, respectivamente. Com isso, o autor observou que empregando o H₂O₂ e uma potência de 500 W a redução do teor de matéria orgânica foi reduzida para um valor semelhante ao resultado obtido somente com o uso da radiação UV a 1000 W de potência. Assim, o emprego da radiação micro-ondas e da radiação UV junto com pequenas quantidades de agentes oxidantes possibilitou obter boa degradação da matéria orgânica dissolvida, consequentemente menores valores de branco devido ao menor volume de reagentes e também diminuiu a necessidade de pré-concentração ou de diluição após a decomposição antes da etapa de determinação.

2.5 Determinação de metais em macroalgas

Diversas técnicas analíticas têm sido utilizadas na determinação de metais em macroalgas empregadas como bioindicadores ambientais e comestíveis. Dentre

estas técnicas podemos ressaltar a espectrometria de absorção atômica (AAS) com diferentes formas de atomização como chama (F AAS), forno de grafite (GF AAS) e geração de hidretos (HG AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a análise por ativação neutrônica (NAA), entre outras.

A ICP-MS tem sido cada vez mais empregada na determinação de diversos elementos químicos por ser uma técnica com elevada sensibilidade e baixo limite de detecção, permitir a análise de vários isótopos dos elementos e determinações em nível de traço na amostra (BROWN; MILTON, 2005). É uma técnica analítica que permite separar as espécies iônicas em função da razão massa/carga de um íon atômico. Para que ocorra isso, são utilizadas as altas temperaturas do plasma, que é um gás parcialmente ionizado, que atinge temperaturas tão altas quanto 10.000 K, possuindo assim energia suficiente para atomizar, ionizar e excitar a maioria dos elementos, gerando assim íons carregados positivamente (M^+) que são posteriormente separados por um espectrômetro de massa. Após o íon específico é conduzido até um detector (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009a).

A técnica de ICP-MS foi selecionada para determinar os analitos As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, V e Zn em 10 espécies de macroalgas para avaliar a atual situação de poluição da região da Baía de Todos os Santos, no estado da Bahia no Brasil. Maiores concentrações de metais foram encontradas em macroalgas marrom, os metais Cd, Co, Mn, Ni e Zn foram encontrados na espécie *Padina* spp., enquanto os metais As e Pb foram encontrados principalmente na espécie *Sargassum* spp. Os limites de quantificação do método (LOQs) obtidos para As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V e Zn foram 0,026, 0,019, 0,018, 0,029, 0,034, 0,031, 0,046, 0,012, 0,049 e 0,034 $\mu\text{g g}^{-1}$ (peso seco), respectivamente. Os RSDs foram inferiores a 10% para todos os elementos determinados (BRITO et al., 2012).

A ICP OES é uma técnica rápida e seletiva, que permite a determinação de vários elementos na mesma amostra por ser uma técnica multielementar. Tem o seu princípio fundamentado no uso das altas temperaturas do plasma, onde a amostra em solução é nebulizada no interior de um plasma de argônio, que é ionizado através de um campo magnético gerado por uma bobina de radiofrequência, os átomos e íons excitados emitem radiação em comprimentos de onda específicos

para cada elemento presente na amostra no sistema óptico (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009b).

A técnica de ICP OES foi aplicada por Pérez et al. (2007) para a determinação de As, B, Ca, Cr, Cu, Co, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Se, V e Zn nas macroalgas *Porphyra columbina* e *Ulva* sp. Foi utilizado para avaliar a exatidão das medidas o CRM BCR 279 (*Ulva lactuca*), onde foi verificado concordâncias entre 93 e 112% entre os valores determinados e os valores certificados, com baixos desvios padrões.

Na Tab. 3 estão listados e detalhados alguns trabalhos publicados nos últimos anos que envolvem estas técnicas analíticas para a determinação de metais em macroalgas e outros materiais biológicos.

Tabela 3 - Trabalhos publicados que envolvem a determinação de metais em macroalgas e em outros materiais biológicos por diferentes técnicas analíticas.

Amostra	Preparo de amostra (massa de amostra; quantidade e concentração de reagentes; tipo de aquecimento e tempo de decomposição)	Analitos	Técnica de determinação	Referência
Água do mar, algas e moluscos	0,7 g; 5 ml HNO ₃ conc. + 2 ml H ₂ O ₂ 30%; MW.	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	GF AAS	Conti; Cecchetti, 2003
Água, sedimento e algas	0,25 g; 1 ml HNO ₃ conc. + 9 ml de H ₂ O ultrapura; mufla a 450 °C por 2 h.	Al, As, Cd, Cu, Fe, Pb, Zn	ICP OES XRF	Gosavi et al., 2004
Algas comestíveis	0,2 g; 2 ml HNO ₃ conc.; MW (330 W 2 min; resfriamento 5 min); 10 min de banho de gelo; 1 ml H ₂ O ₂ 33%; MW (360 W 3 min e resfriamento 5 min). 0,2 g; 2 ml HCl 6 mol l ⁻¹ ultrassom a 17 kHz e 65 °C 10 min; centrífuga 3000 rpm 10 min. Ao precipitado foi adicionado 7 ml de mistura ácida (HNO ₃ 3,7 mol l ⁻¹ + HCl 3 mol l ⁻¹ + H ₂ O ₂ 3 mol l ⁻¹); ultrassom a 17 kHz e 65 °C 35 min; centrífuga 3000 rpm 10 min.	As, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, V, Zn	ICP OES	Domínguez-González et al., 2005

Tabela 3 - Continuação

Amostra	Preparo de amostra		Analitos	Técnica de determinação	Referência
	(massa de amostra; quantidade e concentração de reagentes; tipo de aquecimento e tempo de decomposição)				
Algas ambientais	0,15 g a 0,25 g, fluxo de nêutrons de $2,5 \times 10^{11} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 8 kW.		Al, As, Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hf, Hg, I, K, La, Mg, Mn, Na, Sc, Sm, V, Zn	INAA ENAA	Serfor-Armah et al., 2006
Algas e sedimento	0,5 g; 2,5 ml HNO ₃ conc.; H ₂ O ₂ (1:1); MW. HNO ₃ conc., HF e HClO ₄ (2:4:1); bomba de Teflon; 5 ml HNO ₃ 1 mol l ⁻¹ a 80 °C overnight; 10 ml de HNO ₃ 1 mol l ⁻¹ .		Cd, Co, Cr, Pb	GF AAS	Morrison; Baumann; Stengel, 2008
Algas comestíveis	0,5 g a 1,0 g; 1 ml de H ₂ O ultrapura + 6 ml HNO ₃ conc.; reator inoxidável ajustado a 90 °C 2h e 130 °C 4h; HCl e clorofórmio.		Cu, Zn As total, Cd, Pb Hg total As inorgânico	F AAS ET AAS CVG AAS HG AAS	Besada et al., 2009

Tabela 3 - Continuação

Amostra	Preparo de amostra (massa de amostra; quantidade e concentração de reagentes; tipo de aquecimento e tempo de decomposição)	Analitos	Técnica de determinação	Referência
Algas	1g; 6 ml de HNO ₃ conc.; 2 ml de H ₂ O ₂ MW, condições de digestão: 2 min a 250 W, 2 min a 0 W, 6 min a 250 W, 5 min a 400 W, 8 min a 550 W, 8 min resfriamento.	Cu, Fe, Mn, Zn Cd, Co, Cr, Ni, Pb, Se	F AAS GF AAS	Tuzen et al., 2009
Algas comestíveis	0,2 g ou 5,0 g; 8 ml HNO ₃ 69% (m/v); 2 ml H ₂ O ₂ 33% (m/v); MW (1000 W em 5 etapas de T inicial e T final de 25-90; 90-90; 90-120; 120-190 e 190-190 °C. As etapas 1, 3 e 4 tinham um tempo de rampa de 10 min e os passos 2 e 5 um tempo de espera de 5 e 10 min); HCl 6 mol l ⁻¹ e HCl 0,1 mol l ⁻¹ .	Co, Cr, Mn, V	ICP-MS	Domínguez-González et al., 2010
Algas ambientais	0,2 g; 7 ml HNO ₃ 65%; 1 ml H ₂ O ₂ ; MW (2450 Hz, 900W, 4 etapas de aquecimento: 120 °C 5 min, 120 °C 3 min, 210 °C 10 min; 210 °C 15 min).	As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, V e Zn	ICP-MS	Brito et al., 2012

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

Os métodos de preparo de amostra avaliados para a decomposição das macroalgas para a subsequente determinação de metais foram a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MWAD), decomposição por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O₂-AD) e a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD). Posteriormente, a determinação dos metais foi realizada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Em todos os procedimentos, as amostras foram preparadas pelo menos em triplicata. No procedimento de decomposição por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio, foram avaliadas diferentes concentrações de ácido nítrico e pressões de oxigênio para decomposição de 500 mg de amostra, com o intuito de selecionar a melhor condição para decompor as amostras. No procedimento de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta, foram avaliadas diferentes concentrações de ácido nítrico juntamente com a lâmpada de emissão de radiação ultravioleta a fim de selecionar a melhor concentração de ácido nítrico para a decomposição das macroalgas sob a radiação micro-ondas e ultravioleta e também diferentes concentrações de ácido nítrico com diferentes volumes de peróxido de hidrogênio juntamente com a lâmpada de emissão de radiação ultravioleta. O procedimento de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas foi utilizado como parâmetro de comparação com os dois procedimentos anteriormente propostos.

Nos três procedimentos foram realizados ensaios de recuperação e decomposição de materiais de referência certificados a fim de avaliar a exatidão dos métodos propostos para a decomposição de macroalgas e dos melhores parâmetros otimizados.

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

3.1 Instrumentação

Para a decomposição das amostras através dos procedimentos de decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MWAD), decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O₂-AD) e para decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD) foi utilizado um forno micro-ondas comercial Multiwave 3000® (*Microwave Sample Preparation System*, Anton Paar, Áustria, <http://www.anton-paar.com>). Este sistema é equipado com oito frascos de quartzo, com volume interno máximo de 80 ml, sendo as condições máximas de operação de 1400 W de potência, 280 °C de temperatura e 80 bar de pressão (Fig. 2). O sistema utilizado possui sensores de temperatura e pressão, permitindo a medição destes parâmetros em tempo real.

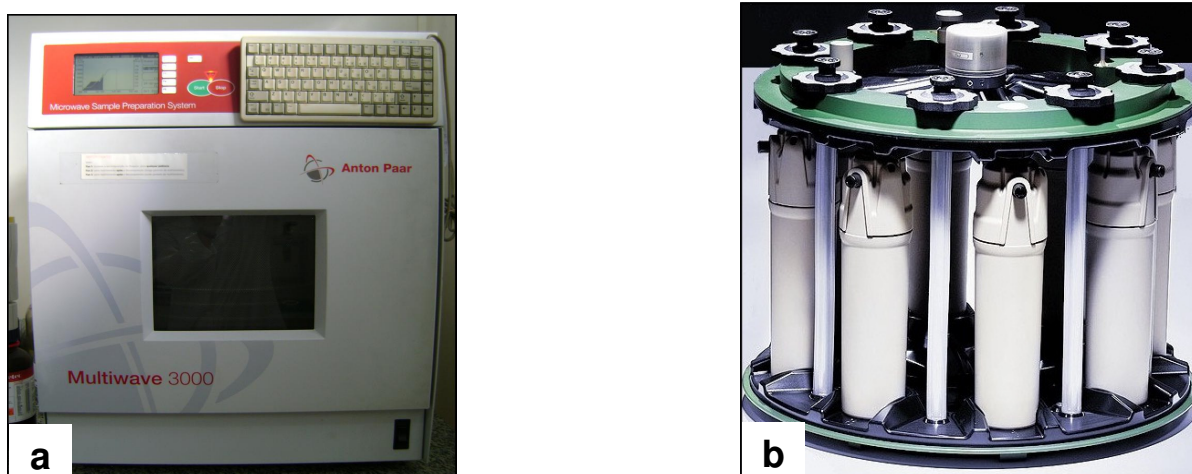


Figura 2 - (a) Forno de micro-ondas comercial Multiwave 3000® e (b) rotor equipado com 8 frascos de quartzo utilizados para a decomposição de amostras.

No procedimento de decomposição por MW-UV-AD, cabe destacar que, foram utilizadas lâmpadas de cádmio de baixa pressão preenchidas com argônio, sendo o comprimento de onda emitido pela lâmpada de 228 nm, que foram colocadas dentro do frasco de decomposição de quartzo do micro-ondas contendo previamente o disco de PTFE posicionado no frasco e a amostra a ser decomposta. O sistema é composto por uma lâmpada de emissão de radiação ultravioleta e por dois discos de politetrafluoretileno (PTFE), sendo um posicionado na parte inferior e o outro na parte superior da lâmpada a fim de evitar o contato direto da mesma com

o frasco de quartzo de decomposição. A lâmpada de emissão UV e os discos de PTFE, assim como o posicionamento dentro do frasco de decomposição, podem ser observados na Fig. 3.



Figura 3 - (a) Lâmpada de Cd de baixa pressão e os dispositivos de PTFE utilizados para posicionar a lâmpada de emissão UV no frasco de decomposição por MW-UV-AD e (b) frasco de quartzo do forno micro-ondas com a lâmpada de Cd para a emissão de radiação ultravioleta.

Os analitos As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn foram determinados por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (modelo Elan[®] DRC II, PerkinElmer SCIEX, <http://www.perkinelmer.com>, EUA). O espectrômetro foi equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, EUA), uma câmara de nebulização do tipo ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália), com uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc., Austrália) e com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.). Estes analitos também foram determinados por ICP OES com configuração axial (PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV, Shelton, CT, USA, <http://www.perkinelmer.com>) equipado com tocha e tubo injetor de quartzo, com câmara de nebulização ciclônica e um nebulizador concêntrico.

A otimização dos parâmetros instrumentais que foram utilizados para as determinações foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (PerkinElmer SCIEX, 2003). Na Tab. 4 são mostrados os parâmetros operacionais utilizados para a determinação dos analitos por ICP-MS e ICP OES.

Para ambos os equipamentos utilizados na determinação dos metais, o plasma foi gerado a partir de argônio de alta pureza (99,998%, White Martins-Praxair, São Paulo, SP, Brasil, <http://whitemartins.com.br>). Também foi utilizado argônio para a remoção de CO₂, previamente às determinações de carbono residual nas amostras digeridas por via úmida.

Tabela 4 - Condições operacionais para a determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, V e Zn por ICP-MS e ICP OES.

Parâmetros	ICP-MS	ICP OES
Potência do gerador de RF (W)	1300	1400
Vazão de argônio principal (l min ⁻¹)	15	15
Vazão de argônio auxiliar (l min ⁻¹)	1,2	0,2
Vazão de argônio do nebulizador (l min ⁻¹)	1,08	0,7
Cone de amostragem e “Skimmer”	Pt	-
Varreduras/leituras (Sweeps/reading)	3	-
Leituras/replicatas	3	3
Lente iônica	“Auto lens on”	-
Isótopos monitorados (m/z)	⁷⁵ As	-
	¹¹⁴ Cd	
	⁵² Cr	
	⁶⁵ Cu	
	⁵⁵ Mn	
	⁹⁷ Mo	
	⁶⁰ Ni	
	²⁰⁸ Pb	
	⁵¹ V	
	⁶⁶ Zn	
Linha espectral (nm)		As 193,696
		Cd 228,802
		Cr 267,716
		Cu 324,752
		Mn 257,610
		Mo 202,031
		Na 589,592
		Ni 231,604
		Pb 220,353
		V 290,880
		Zn 206,200

A avaliação dos métodos de decomposição foi realizada através da determinação de carbono residual e do teor de acidez nas soluções resultantes após as decomposições. O teor de carbono residual foi determinado por ICP OES utilizando um equipamento de vista axial (PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV, Shelton, CT, USA, <http://www.perkinelmer.com>) equipado com tocha e tubo injetor de quartzo, com câmara de nebulização ciclônica e um nebulizador concêntrico. A linha de emissão selecionada para a determinação de carbono, foi de 193,030 nm a qual foi monitorada para verificar possíveis interferências uma vez que o potencial de ionização do argônio e do carbono são muito próximos. Na Tab. 5, são mostradas as condições operacionais para a determinação de carbono residual após a decomposição das amostras de algas, por ICP OES.

Tabela 5 - Condições operacionais para a determinação de carbono residual por ICP OES nas amostras decompostas.

Parâmetro	Condição utilizada
Potência do gerador de radiofrequência	1400 W
Vazão de argônio principal	15 l min ⁻¹
Vazão de argônio auxiliar	0,2 l min ⁻¹
Vazão de argônio do nebulizador	0,7 l min ⁻¹

A acidez residual dos digeridos foi determinada por titulação em meio aquoso utilizando um titulador automático Metrohm (modelo 836 Titrand, Metrohm, Suíça <http://www.metrohm.com>) equipado com módulo de agitação magnética Metrohm (modelo 803 Ti Stand, Metrohm), eletrodo de pH combinado (Eletrodo LL, modelo 6.0262.100, Metrohm) e bureta de 20 ml (Dosino 800).

As amostras foram liofilizadas em liofilizador (LIOTOP® modelo L101 marca Liobras, Brasil, <http://www.liotop.com.br>). Posteriormente, foram cominuídas em moinho criogênico (modelo 6750, Spex CertiPrep, Metuchen, EUA <http://www.spexcsp.com>). Antes da etapa de preparo, as amostras foram novamente submetidas ao processo de secagem em estufa convencional com circulação de ar DeLeo (modelo 400/2ND, Brasil, <http://www.deleo.com.br>) para a remoção de água adquirida durante o armazenamento.

Todos os procedimentos de pesagem foram efetuados em balança analítica Shimadzu (modelo AY220, Brasil, <http://www.shimadzu.com.br>), com resolução de 0,0001 g e carga máxima de 220 g.

Centrífuga (Nova Técnica, modelo NT 810, Brasil, www.novatecnica.com.br) com capacidade para 16 frascos de 15 ml ou 4 frascos de 50 ml foi utilizada para a centrifugação das soluções das amostras após decomposição com material particulado.

3.2 Reagentes

A água utilizada nos procedimentos desenvolvidos neste trabalho foi previamente destilada e deionizada, em uma coluna de troca iônica convencional (condutividade máxima de $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$) e, posteriormente, purificada em um sistema de Milli-Q[®] (*Milli-Q[®] Ultrapure Water Purification Systems, Gradient System, Millipore, EUA*, <http://www.millipore.com>), com resistividade final de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

O ácido nítrico concentrado p.a. (65%, $1,4 \text{ kg l}^{-1}$, Merck, Alemanha, <http://www.merck.de>) utilizado para a decomposição das amostras por via úmida, e na preparação das soluções de calibração, foi bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição, em sistema de destilação de quartzo (modelo duoPUR, *Subboiling Distillation System, Milestone, Itália*, <http://www.milestonesci.com>).

Peróxido de hidrogênio p.a. (30%, $1,11 \text{ kg l}^{-1}$, Merck) foi utilizada na decomposição das amostras por MW-UV-AD.

Para a descontaminação dos materiais utilizados na realização do trabalho, foi empregado ácido nítrico p.a.

Oxigênio (White Martins, Brasil, <http://www.whitemartins.com.br>), com pureza de 99,9991% foi utilizado para a pressurização dos frascos de decomposição por MW-O₂-AD.

As soluções de calibração para as determinações dos metais por ICP-MS e ICP OES foram preparadas a partir de uma solução de referência multielementar SCP33MS 10 mg l^{-1} (PlasmaCAL ICP AES & ICP-MS Standard, SCP Science, Quebec, Canadá, <http://www.scpscience.com>) diluída em HNO₃ 5% (v/v).

Para a preparação das soluções de calibração para as determinações do teor de carbono residual (RCC) nas amostras digeridas foi utilizado ácido cítrico p.a. (Vetec, Brasil, <http://www.vetecquimica.com.br>) e cloreto de sódio p.a. (Merck)

ambos diluídos em água. Para estas determinações foi utilizada uma solução de ítrio Assurance[®] (Spex CertiPrep, $1001,5 \pm 3 \text{ mg l}^{-1}$ em HNO_3 $0,28 \text{ mol l}^{-1}$, EUA, <http://www.spexcsp.com>) como padrão interno.

Para a determinação de acidez residual por titulação em meio aquoso foi utilizada uma solução de KOH $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, esta solução foi preparada a partir da dissolução do reagente (Merck) em água e foi padronizada com biftalato de potássio (Merck).

3.3 Materiais diversos

A vidraria utilizada e outros materiais comuns de laboratório foram descontaminados por imersão em HNO_3 10% (v/v) por, pelo menos, 24 h e, posteriormente lavados com água purificada.

As soluções obtidas após os procedimentos de decomposição das amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno (Sarstedt, Alemanha) com fundo cônico, graduados, capacidade máxima de 15 ml e/ou 50 ml.

Os frascos de quartzo do forno de micro-ondas foram descontaminados com ácido nítrico concentrado sob aquecimento em forno micro-ondas usando o programa de aquecimento mostrado na Tab. 6. Ao término do programa, os frascos e os suportes foram lavados com água purificada.

Tabela 6 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas utilizado para a descontaminação dos frascos de quartzo.

Etapa	Potência (W)	Tempo (min)	Exaustão
1	1000	5	1
2*	0	20	2

* Etapa de resfriamento.

3.4 Amostras

As amostras de algas foram obtidas através de coleta em pontos estratégicos da Antártica, estabelecidos no Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), na localidade de Demay na Ilha do Rei George em janeiro e fevereiro de 2012. As

especificações de latitude e longitude referentes aos locais de coleta para cada uma das algas estudadas neste trabalho foram para a *Desmarestia anceps* (62°13'19.30"S, 58°26'36.59"W), para a *Iridaea cordata* (62°13'13.93"S, 58°26'17.85"W), para a *Palmaria decipiens* (62°13'13.93"S, 58°26'17.85"W), para a *Prasiola crispa* (62°13'7.54"S, 58°26'29.02"W) e para a *Pyropia endiviifolia* (62°13'21.01"S, 58°26'36.59"W), conforme são mostrados na Fig. 4. Os pontos de coleta foram escolhidos considerando a possibilidade de avaliação da bioacumulação de metais por essas espécies, servindo como bioindicador da região para averiguação de possíveis contaminações.

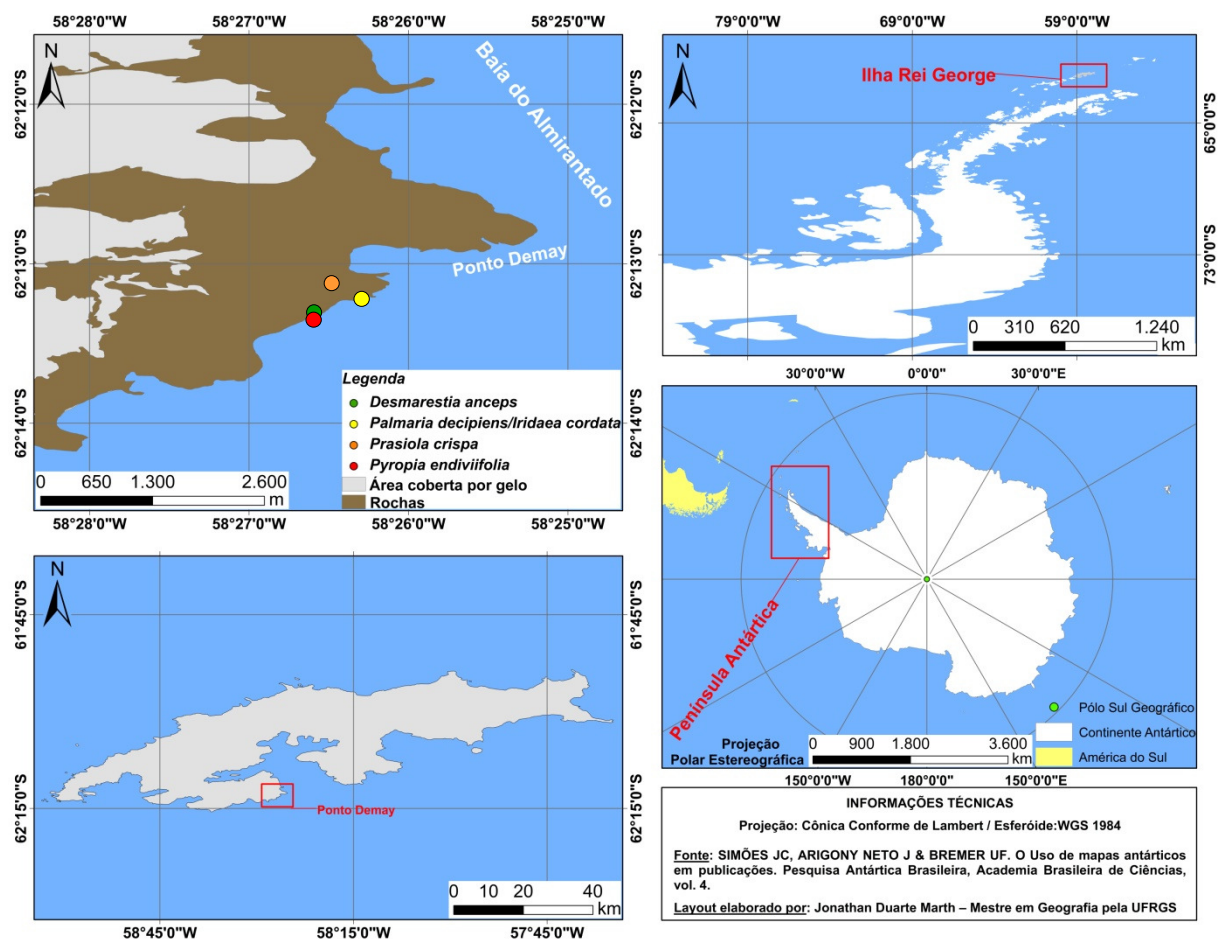


Figura 4 - Identificação do local de coleta: Demay, Ilha Rei George, Antártica.

Neste trabalho, os procedimentos de decomposição de amostras MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD foram aplicados para as amostras de macroalgas *Desmarestia anceps* (Montagne), *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent, *Palmaria decipiens* (Reinsch) R. W. Ricker, *Prasiola crispa* (Lightfoot) Kützinger e

Pyropia endiviifolia (A. Gepp & E. Gepp) H. G. Choi & M. S. Hwang que após coleta, foram levadas para a Estação Antártica Comandante Ferraz, onde foram lavadas várias vezes com água destilada para remover sais e pequenos invertebrados, em seguida foram armazenadas dentro de sacos de polietileno na sua forma *in natura* até secagem (Fig. 5). A identificação das algas foram feitas pela Prof^a Dr^a Mutue Toyota Fujii - Pesquisadora Científica do Instituto de Botânica, Centro de Pesquisas em Plantas Avasculares e Fungos, Núcleo de Pesquisa em Ficologia de São Paulo.

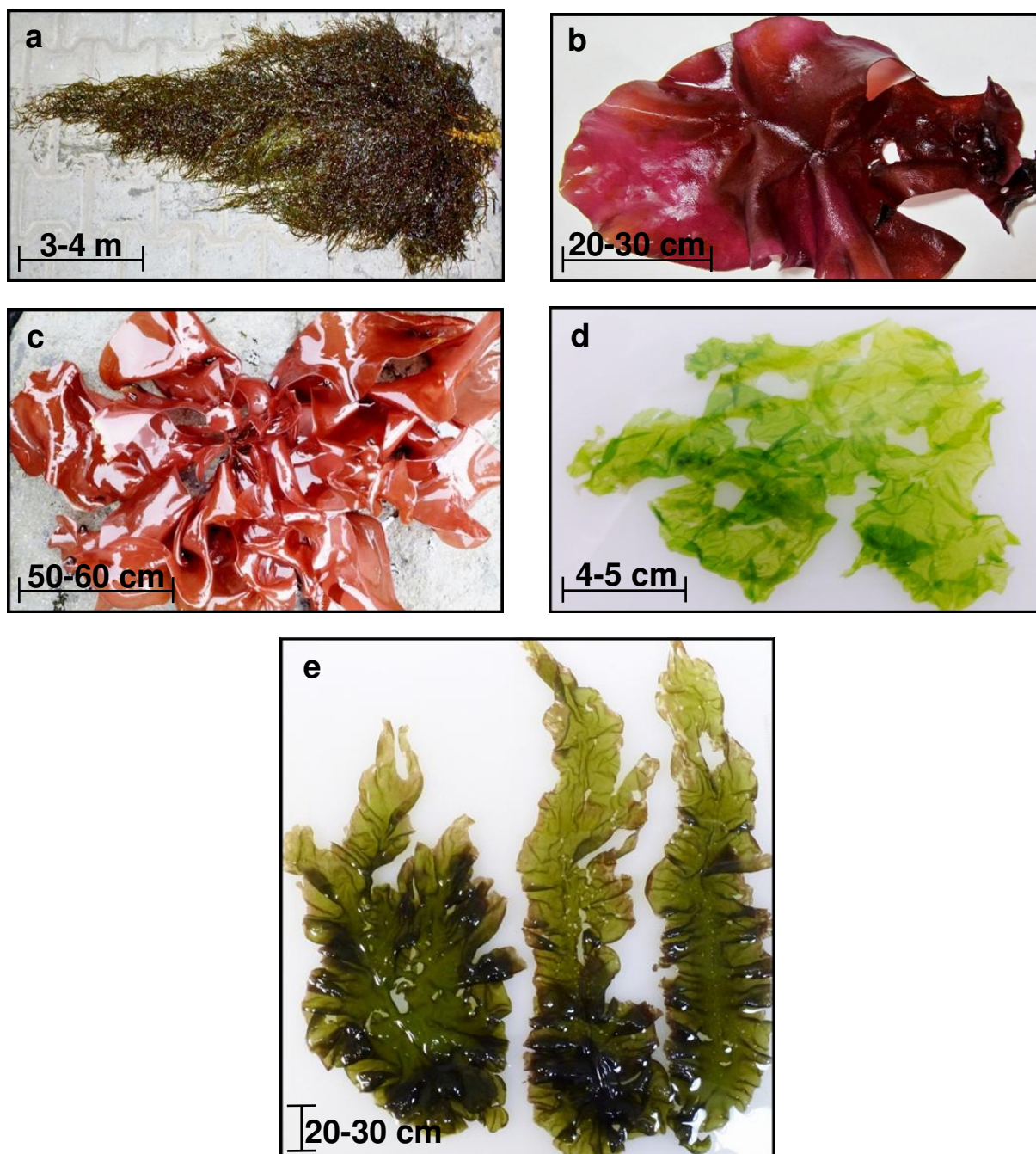


Figura 5 - Amostras de algas *in natura* (a) *Desmarestia anceps*, (b) *Iridaea cordata*, (c) *Palmaria decipiens*, (d) *Prasiola crispa* e (e) *Pyropia endiviifolia*, coletadas na Antártica.

No laboratório da Estação Antártica Comandante Ferraz as amostras foram congeladas em ultrafreezer ($- 80\text{ }^{\circ}\text{C}$) para que posteriormente, pudessem ser liofilizadas por no mínimo 12 h (Fig. 6), e então, armazenadas novamente em sacos de polietileno. A escolha do processo de liofilização se deu pelo fato de não se conhecer o teor de água nas amostras e, principalmente para evitar possíveis perdas

de elementos por volatilização devido ao emprego de calor pelos métodos tradicionais de secagem, sendo que a operação de secagem das amostras por liofilização, consiste em congelar a amostra entre - 80 e - 60 °C e depois secar sob vácuo em temperaturas entre - 20 e + 40 °C (SANTOS JÚNIOR; KRUG, 2010).

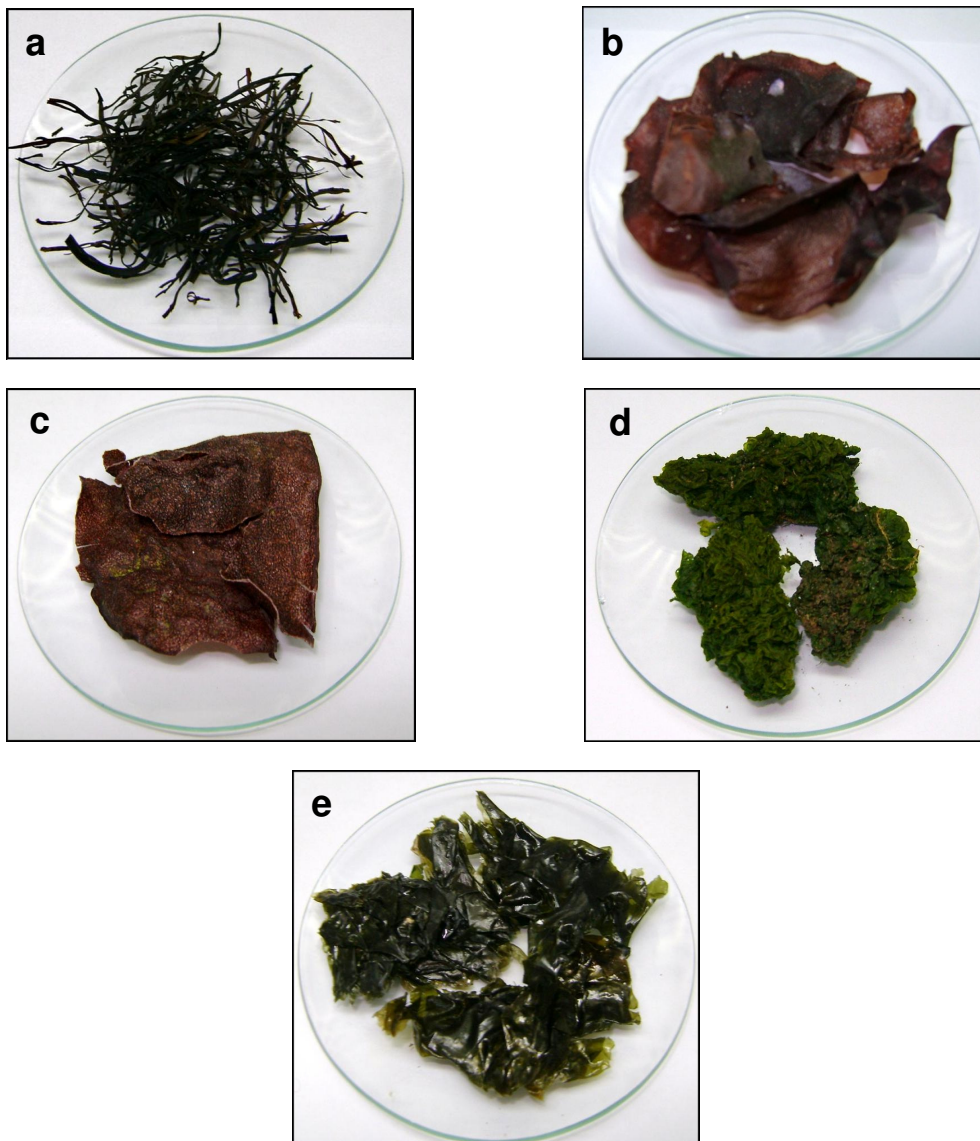


Figura 6 - Aspecto das algas após o processo de liofilização (a) *Desmarestia anceps*, (b) *Iridaea cordata*, (c) *Palmaria decipiens*, (d) *Prasiola crispa* e (e) *Pyropia endiviifolia*.

Após o recebimento das amostras no Brasil pelo laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais da Universidade Federal de Pelotas as amostras foram cominuídas em um moinho criogênico. O programa utilizado na moagem

consistiu de um etapa de pré-congelamento da amostra por 2 min, seguido de uma etapa de moagem de 2 min a uma velocidade de 15 ips (impactos por segundo). Após a cominuição, as amostras foram armazenadas em frascos de polipropileno (PP) de 50 ml.

Materiais de referência certificados (CRMs) foram utilizados para avaliar a exatidão dos procedimentos utilizados no preparo das amostras, os quais foram submetidos as mesmas condições de decomposição descritas para as amostras de algas. Os CRMs foram adquiridos da Community Bureau of Reference (BCR - Bélgica) BCR 060 (*Aquatic plant - Lagarosiphon major*) e do National Institute of Standards and Technology (NIST - USA) NIST 1515 (*Apple leaves*).

Para a caracterização das amostras foi determinado o teor de cinzas por calcinação em mufla (modelo Quimis Q-318D24, série 082, 4200 W, Brasil, www.quimis.com.br) a 550 °C, método 938.08, conforme descrito na Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (HORWITZ; LATIMER, 2011). O teor de umidade foi determinado por secagem em estufa convencional com circulação de ar DeLeo (modelo 400/2ND, Brasil, <http://www.deleo.com.br>) a 105 °C até peso constante, método 934.01, conforme descrito na Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (HORWITZ; LATIMER, 2011). Também foi determinado por análise elementar o teor de CHN sendo o equipamento utilizado um analisador elementar Leco TruSpec[®] CHN (Brasil, <http://www.lecobrasil.com.br>) que detecta carbono e hidrogênio sob a forma de CO₂ e H₂O, respectivamente, através de células de infra-vermelho e nitrogênio sob a forma de N₂ por células de condutividade térmica.

3.5 Calibração do forno de micro-ondas

A calibração do forno de micro-ondas foi realizada conforme recomendação do fabricante (Anton Paar GmbH, Multiwave 3000[®]), para assegurar a proximidade entre a potência real irradiada e a potência selecionada no equipamento. Assim, um béquer contendo 1000 ml de água, a qual teve sua temperatura previamente determinada, foi posicionado no interior da cavidade do forno. Através da seleção da função “*power calibration*” no painel de controle do equipamento, um programa de aquecimento foi simulado a uma potência de 1000 W durante 60 s. Ao término do programa, a temperatura da água foi medida novamente e os dados obtidos foram

processados diretamente no *software* do equipamento para efetuar a calibração. Neste caso, o *software* estima a potência real irradiada e faz, automaticamente, as correções.

3.6 Métodos de preparo de amostras

Neste trabalho, três métodos de preparo de amostras foram avaliados para as macroalgas e posterior determinação de metais por ICP-MS para todos os métodos e ICP OES apenas para o método MWAD. Os métodos avaliados foram MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD. Os procedimentos utilizados para cada método de decomposição, bem como as amostras utilizadas estão descritos a seguir. Cabe ressaltar que a otimização dos procedimentos de preparo de amostra foram realizados com apenas uma amostra a *Desmarestia anceps* e, após foram escolhidos os melhores parâmetros, os quais foram aplicados para as demais amostras.

Ao final de todos os procedimentos de decomposição, as soluções resultantes foram transferidas para frascos de polipropileno e aferidas a 30 ml com água purificada. A determinação da concentração dos analitos foi feita por ICP-MS e ICP OES.

3.6.1 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas (MWAD)

O método de decomposição por MWAD foi aplicado para todas as amostras de algas apresentadas no item 3.4. A decomposição foi realizada em frascos de quartzo utilizando um forno de micro-ondas (Multiwave 3000®) com sistema fechado. Para este procedimento, foram pesados 500 mg de amostra, previamente moída, em seguida, esta foi transferida para o frasco de quartzo, onde também foram adicionados 6 ml de HNO₃ concentrado. Posteriormente, os frascos foram fechados e levados a cavidade do forno de micro-ondas. O programa de aquecimento por radiação micro-ondas foi realizado conforme recomendação do fabricante (Tab. 7).

Tabela 7 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras de alga por MWAD (HNO₃), (n=3).

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo (min)	Exaustão
1	1000	10	15	1
2*	0	-	20	2

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

A descontaminação dos frascos de quartzo após a decomposição das amostras utilizando o forno de micro-ondas (Multiwave 3000®), foi realizada utilizando 6 ml de HNO₃ concentrado e aquecimento em forno de micro-ondas de acordo com a Tab 6. Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos com ar comprimido.

Os CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) contendo valores de metais certificados, foram decompostos por MWAD nas mesmas condições que as amostras foram submetidas, para avaliar a exatidão do procedimento proposto.

3.6.2 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O₂-AD)

O método de decomposição por MW-O₂-AD foi otimizado utilizando apenas a alga *Desmarestia anceps*, as melhores condições de concentração de HNO₃ e de pressão de O₂ foram então aplicadas a todas as amostras de algas apresentadas no item 3.4. A decomposição foi realizada em frascos de quartzo utilizando um forno de micro-ondas (Multiwave 3000®) com sistema fechado. Para este procedimento, foram pesados 500 mg de amostra, previamente moída, a qual foi transferida para o frasco de quartzo, onde também foram adicionados 6 ml de HNO₃, cujas concentrações avaliadas foram 0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹ de HNO₃. Posteriormente, os frascos foram fechados e pressurizados com oxigênio, com auxílio de uma ponteira de PTFE, durante 1 min, que foi posicionada no orifício para entrada e saída de gases, em seguida a válvula de escape de pressão foi fechada. As pressões avaliadas foram 1, 5 e 10 bar de O₂. Por fim, o rotor junto com a capa de proteção foi

colocado dentro da cavidade do forno de micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado está mostrado na Tab. 8.

Tabela 8 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras de alga por MW-O₂-AD, (n=3).

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo (min)	Exaustão
1	1000	5	10	1
2*	0	-	20	2

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

Após a decomposição das amostras utilizando o forno de micro-ondas (Multiwave 3000[®]), os frascos de quartzo foram descontaminados utilizando 6 ml de HNO₃ concentrado e aquecimento em forno de micro-ondas de acordo com a Tab 6. Posteriormente, os frascos foram lavados com água e secos com ar comprimido.

As melhores condições de concentração de HNO₃ e de pressão de O₂ foram utilizadas para a decomposição dos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) contendo valores de metais certificados a fim de avaliar a exatidão do procedimento proposto.

3.6.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD)

O método de decomposição MW-UV-AD foi otimizado utilizando apenas a alga *Desmarestia anceps*, as melhores condições de concentração de HNO₃ e incidência da radiação UV foram então aplicadas a todas as amostras de algas apresentadas no item 3.4. A decomposição foi realizada em frascos de quartzo utilizando um forno de micro-ondas (Multiwave 3000[®]) com sistema fechado e lâmpadas de emissão de radiação UV.

Neste procedimento, foi inserido um dispositivo de PTFE no interior do frasco de quartzo para suporte da lâmpada de UV. Posteriormente foram adicionados em 500 mg de amostra, previamente moída, um volume de HNO₃ o qual foi avaliado nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹ e o volume final da solução foi completado com H₂O purificada até 10 ml, sendo esse volume necessário para que o bulbo da

lâmpada fique imerso na solução, após foi feita a inserção da lâmpada de UV contendo um dispositivo de PTFE na parte superior. Em seguida, os frascos foram fechados, fixados no rotor e submetidos ao programa de aquecimento mostrado na Tab. 9.

Tabela 9 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição das amostras de alga por MW-UV-AD, (n=3).

Etapa	Potência (W)	Rampa (min)	Tempo (min)	Exaustão
1	900	10	20	2
2*	0	-	20	2

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

Conforme recomendação do fabricante (Anton Paar GmbH, Multiwave 3000[®]), o nível de exaustão foi ajustado para 2 durante o programa de aquecimento, assim o resfriamento mais intenso do sistema faz com que a intensidade da radiação micro-ondas seja aumentada a fim de manter a temperatura selecionada no programa de aquecimento, desta forma ocasionando um aumento na emissão da radiação UV.

Também foi avaliada a eficiência de decomposição para as concentrações de HNO_3 0,5 e 1 mol l^{-1} concomitante ao uso de H_2O_2 30%. A otimização foi feita utilizando apenas a alga *Desmarestia anceps*, fixando a concentração de HNO_3 e variando o volume de H_2O_2 em 1 e 4 ml para uma massa de amostra de 500 mg juntamente com a lâmpada de UV. O programa de aquecimento utilizado foi o mesmo mostrado na Tab. 9. Cabe ressaltar que esse método de preparo foi aplicado apenas para a alga *Desmarestia anceps*.

Após a decomposição das amostras utilizando o forno de micro-ondas (Multiwave 3000[®]), os frascos de quartzo e os dispositivos de PTFE das lâmpadas de UV foram descontaminados utilizando 6 ml de HNO_3 concentrado e aquecimento em forno de micro-ondas de acordo com a Tab 6. As lâmpadas de UV foram descontaminadas em um bquer com HNO_3 concentrado em um volume adequado para que ficassem imersas e aquecidas em uma chapa de aquecimento convencional, a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min, pois assim a vida útil da lâmpada aumenta, pois caso fosse descontaminada no forno de MW a mesma ficaria emitindo radiação UV e com isso a durabilidade das lâmpadas diminuiria. Posteriormente, os frascos, os

dispositivos de PTFE e as lâmpadas foram lavados com água e secos com ar comprimido.

As melhores condições observadas na otimização empregando a lâmpada de UV foram utilizadas para a decomposição dos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) contendo valores de metais certificados a fim de avaliar a exatidão do procedimento proposto.

A seguir na Fig. 7 é apresentado um fluxograma com todos os procedimentos de preparo das amostras de algas utilizados neste trabalho para posterior determinação de As, Cd, Cu, Cr, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn.

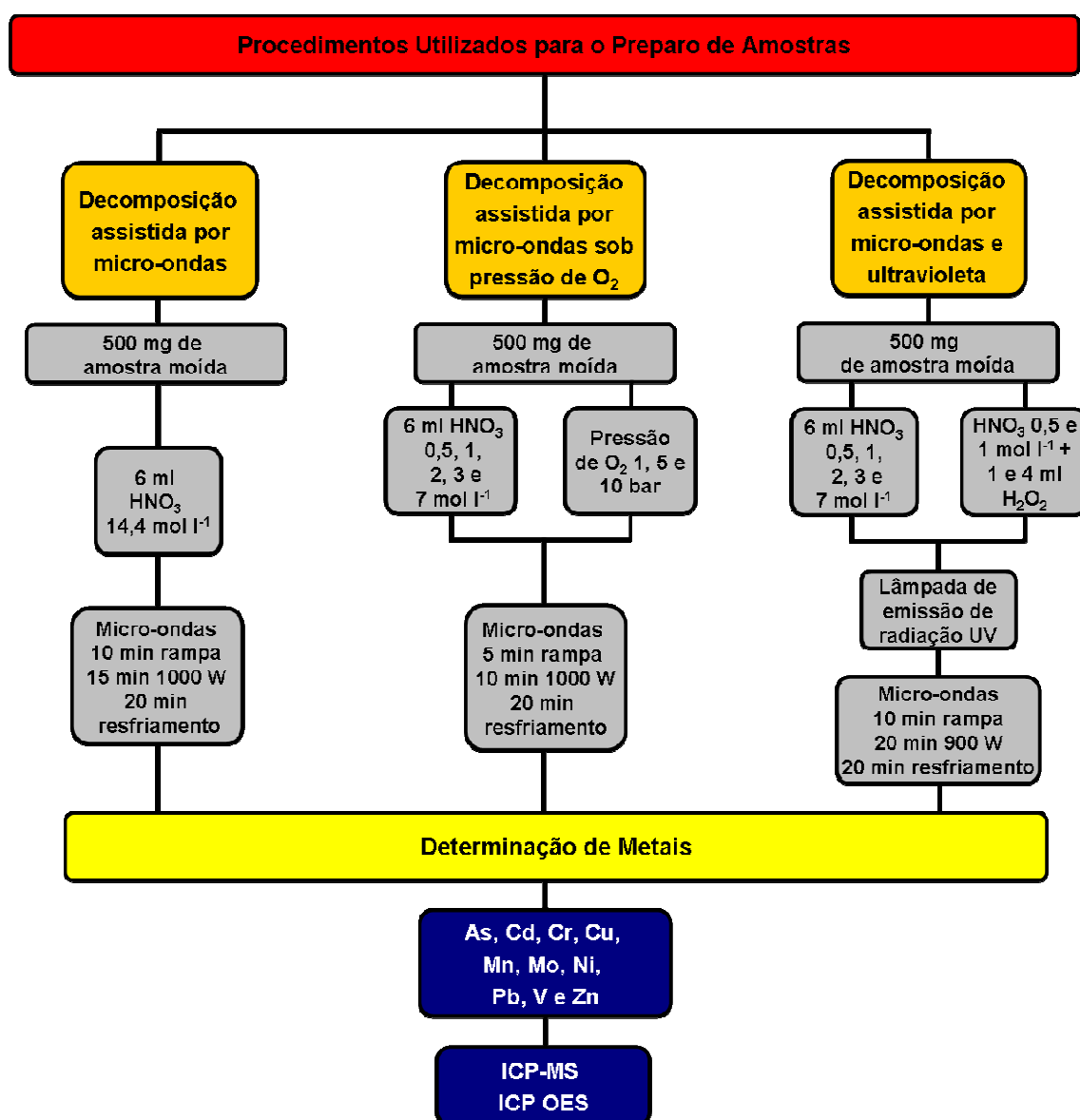


Figura 7 - Representação esquemática dos procedimentos de preparo das amostras de algas para posterior determinação dos metais estudados neste trabalho.

3.7 Determinação do teor de carbono residual

A eficácia dos métodos de decomposição das amostras foi avaliada através da determinação do teor de carbono residual nas amostras digeridas. Esta determinação foi adaptada do procedimento descrito por Gouveia et al. (2001). As determinações foram feitas por ICP OES, monitorando a linha de emissão do carbono de 193,030 nm e as condições operacionais são mostradas na Tab. 5. Foi utilizado ítrio como padrão interno, o qual foi adicionado às amostras, brancos e soluções de referência a uma concentração final igual a 1 mg l⁻¹ e monitorado a 371,029 nm.

Para a determinação do carbono residual, foi necessária a remoção do CO₂ dissolvido nas soluções das amostras e de calibração. Deste modo, todas as amostras, brancos e soluções de calibração contendo o padrão interno, foram borbulhadas com um fluxo de gás inerte (Ar) durante 2 min para a remoção do CO₂ dissolvido nas mesmas.

3.8 Determinação da acidez residual

A avaliação dos métodos de decomposição estudados foi realizada através da determinação da acidez residual nas soluções obtidas que foi efetuada por titulação em meio aquoso com solução de concentração conhecida de KOH 0,1 mol l⁻¹ preparada a partir da dissolução do reagente (Merck) em água e padronizada com biftalato de potássio (Merck). Para a titulação foi utilizado um volume de amostra que variou de 200 a 1000 µl de acordo com a concentração de HNO₃ utilizada na etapa de preparo das amostras, esse volume foi colocado em frasco de polipropileno contendo em torno de 20 ml de água. Após a homogeneização da amostra por agitação magnética, a titulação foi iniciada e o ponto de equivalência foi determinado automaticamente pela variação da diferença de potencial.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos nas análises descritas no capítulo 3 (Materiais e Métodos). A discussão dos resultados encontra-se subdividida em quatro partes principais. Na primeira parte, serão discutidos os resultados obtidos para a caracterização das amostras de algas estudadas. Na segunda parte, será discutida a aplicabilidade dos procedimentos de preparo de amostras avaliados, desde a etapa de otimização até a aplicação para as diferentes espécies de macroalgas. Na terceira parte serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para a determinação dos metais nas macroalgas por ICP-MS e ICP OES após os diferentes procedimentos de preparo de amostras avaliados neste trabalho. Na quarta e última parte, será feita uma comparação das principais características dos procedimentos de preparo de amostras utilizados, bem como das diferenças nas concentrações dos elementos nas diferentes espécies de macroalgas investigadas.

4.1 Calibração do forno de micro-ondas

A potência efetivamente irradiada no interior da cavidade do forno de micro-ondas foi determinada segundo as recomendações do fabricante do equipamento conforme descrito no item 3.5 (*Materiais e Métodos*). A potência foi calculada com base no aquecimento de uma massa de água conhecida, colocada na cavidade do forno de micro-ondas. Desta forma, a potência real calculada foi de 1047 W, a qual corresponde a 104,7% da potência nominal selecionada para este procedimento de calibração (1000 W). Assim, as correções necessárias são feitas pelo próprio equipamento, de modo que a potência real irradiada seja o mais próxima da potência selecionada.

4.2 Caracterização das amostras de macroalgas

A análise de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) foi realizada nas amostras previamente liofilizadas, com a finalidade de caracterizar e identificar os constituintes principais das macroalgas utilizadas. Os teores de carbono encontrados nas amostras através da análise elementar foram utilizados, posteriormente, na correlação entre a massa de amostra e a massa de carbono na etapa de determinação do teor de carbono residual. Os resultados da análise elementar para as cinco amostras de algas são mostrados na Tab. 10.

Tabela 10 - Constituição elementar das amostras de macroalgas, (CHN, %).

Amostra	C	H	N
<i>Desmarestia anceps</i>	31,0	3,28	2,78
<i>Iridaea cordata</i>	25,5	3,11	2,34
<i>Palmaria decipiens</i>	26,0	2,85	3,27
<i>Prasiola crispa</i>	37,6	3,90	5,33
<i>Pyropia endiviifolia</i>	31,0	3,33	3,45

Uma característica importante referente à composição elementar (CHN) das macroalgas é que representam uma faixa de 31 a 47% da constituição das amostras, isto indica que cerca de 53 a 69% da amostra é representada por outros

constituintes como por exemplo, oxigênio, silício e fósforo. Quando comparado o teor de C encontrado na alga *Desmarestia anceps* (alga marrom), foi semelhante ao verificado por Jackwerth e Würfels (1997), onde para a alga marrom foi encontrado um teor de carbono de 35%.

O teor de umidade foi determinado na alga *Desmarestia anceps in natura*, conforme descrito no item 3.4 (*Materiais e Métodos*), onde o valor encontrado foi de $80 \pm 2,4\%$, o que vem ao encontro com o relatado no trabalho de Silva et al. (2008), em que foi encontrado para a alga marinha *Ulva lactuca* um teor de umidade de $76 \pm 4,4\%$. Em outro trabalho de Pires et al. (2008) foi considerado um teor de umidade de 80% para um grupo de macroalgas para posterior determinação do teor de carotenos.

Além disso, as amostras de macroalgas foram novamente submetidas à determinação do teor de umidade, previamente as análises e os valores encontrados variaram de 8 a 12%. Cabe ressaltar que esses teores de umidade são referentes à umidade que as amostras adquiriram durante o período em que ficaram armazenadas, pois estas tinham sido anteriormente liofilizadas conforme descrito no item 3.4 (*Materiais e Métodos*). Esse procedimento foi realizado para estimar o teor de umidade presente nas amostras para que não ocorresse interferência nos procedimentos de preparo e posteriormente nos resultados obtidos na etapa de determinação. Assim, após a determinação do teor de umidade, optou-se por secar as amostras previamente as análises, a fim de evitar possíveis erros.

Para a caracterização da amostra de alga *Desmarestia anceps*, também foi realizada a determinação do teor de cinzas, conforme descrito no item 3.4 (*Materiais e Métodos*) que foi de $12 \pm 2\%$, o que está de acordo com dados da literatura em que o teor de cinzas para as algas pode variar de 8 a 40% (ORTEGA-CALVO et al., 1993; RUPÉREZ, 2002; TABARSA et al., 2012).

A otimização dos diferentes procedimentos de preparo de amostra aplicados na decomposição das algas foi realizado apenas com a macroalga *Desmarestia anceps* devido ao fato desta alga ter sido obtida em maior quantidade durante o período de coleta na Antártica, e também por ser representativa de vários pontos de coleta. Além disso, segundo o autor Brouwer (1996) essa espécie de alga é uma das espécies marrom dominantes das populações de macroalgas da Antártica. As demais algas foram decompostas utilizando as melhores condições, onde foi preconizada a exatidão através da análise de CRMs, bem como os melhores

brancos, menores teores de RCC e desvio padrão das medidas que, por consequência, levaram as condições que proporcionaram os menores LODs e LOQs.

4.3 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas (MWAD) e subsequente determinação de metais por ICP-MS e ICP OES

A decomposição da alga *Desmarestia anceps* foi realizada por meio da utilização de ácido nítrico concentrado conforme item 3.6.1 (*Materiais e Métodos*), uma vez que, este permite a ocorrência de uma oxidação eficiente da matéria orgânica, transformando, assim, os analitos em formas inorgânicas simples e apropriadas para análise. Dentro deste contexto, cabe destacar que, é desejável que a digestão leve a completa decomposição da matéria orgânica, no entanto, busca-se a utilização de ácidos em concentrações cada vez mais baixas a fim de evitar interferências na determinação dos analitos por técnicas como ICP-MS e ICP OES, uma vez que concentrações elevadas de ácido podem levar a supressão do sinal do analito, afetar a nebulização da amostra e dificultar a formação do aerossol (TODOLÍ; MERMET, 1999; WASILEWSKA et al., 2002).

As soluções resultantes das decomposições foram diluídas 50 vezes para posterior determinação dos metais por ICP-MS e 10 vezes para as determinações por ICP OES devido a presença de Na que é bastante significativa nessa amostra, a fim de evitar interferências relacionadas às etapas de nebulização, transporte e efeitos energéticos no plasma (FRASER; BEAUCHEMIN, 2000). Além disso, as amostras foram diluídas, para reduzir as interferências poliatômicas para os analitos ^{60}Ni (^{23}Na ^{37}Cl) e ^{75}As (^{23}Na ^{12}C ^{40}Ar) (PICK; LEITERER; EINAX, 2010).

Os resultados obtidos na determinação dos analitos por ICP-MS e ICP OES, após procedimento de decomposição por via úmida utilizando cerca de 500 mg de amostra e 6 ml de HNO_3 conc. estão apresentados na Tab. 11. É importante ressaltar que estes resultados foram calculados para amostra previamente seca antes do procedimento de preparo da amostra, de modo que estão expressos em base seca.

Tabela 11 - Determinação de metais na alga *Desmarestia anceps* por ICP-MS e ICP OES, após decomposição por MWAD com HNO_3 $14,4 \text{ mol l}^{-1}$, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	ICP-MS		ICP OES	
	$\bar{X} \pm s$	RSD (%)	$\bar{X} \pm s$	RSD (%)
As	$28,0 \pm 0,6$	2	$30,0 \pm 0,5$	2
Cd	$0,58 \pm 0,02$	3	$< 0,60$	-
Cr	$4,30 \pm 0,30$	7	$4,21 \pm 0,22$	5
Cu	$5,30 \pm 0,40$	8	$5,90 \pm 0,05$	1
Mn	$15,0 \pm 0,4$	3	$16,0 \pm 0,5$	3
Mo	$0,41 \pm 0,04$	10	$< 0,56$	-
Ni	$27,0 \pm 0,8$	3	$28,0 \pm 1,4$	5
Pb	$0,43 \pm 0,02$	5	$< 1,10$	-
V	$3,0 \pm 0,1$	3	$4,4 \pm 0,2$	5
Zn	$26,0 \pm 1,7$	7	$24,0 \pm 0,4$	2

Como pode ser observado na Tab. 11, não houve diferença significativa, com nível de 95% de confiança (GraphPad InStat, Tukey, $P>0,05$) entre os resultados obtidos por ICP-MS e ICP OES, após o procedimento de decomposição por MWAD, para os analitos As, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn. Contudo, para o analito V houve diferença significativa entre os resultados obtidos por ambas as técnicas de determinação. Cabe destacar que os elementos Cd, Mo e Pb não foram detectados por ICP OES pois ficaram abaixo do LOD. Além disso, os desvios padrões relativos (RSDs) encontrados nas determinações por ICP-MS após decomposição por MWAD foram entre 2 e 10%, onde os valores mais elevados foram encontrados para Cr, Cu, Mo e Zn. Nas determinações por ICP OES após decomposição por MWAD os RSDs das medidas foram entre 1 e 5%, sendo o valor de 5% encontrado para os analitos Cr, Ni e V. Cabe enfatizar que os valores de RSDs obtidos após determinações por ICP-MS e ICP OES estão de acordo com os encontrados por Farías et al. (2002) que após as decomposições por MWAD de algas, utilizando uma mistura de ácidos (HNO_3 , HF e HClO_4) e H_2O_2 , os RSDs das medidas ficaram entre 1,1 e 10%.

Assim, com o objetivo de avaliar a exatidão do procedimento de decomposição por MWAD para a alga *Desmarestia anceps*, utilizando HNO_3 14,4 mol l^{-1} , foi decomposto cerca de 200 mg dos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant - Lagarosiphon major*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) nas mesmas condições em que a amostra em estudo foi submetida, conforme descrito no item 3.6.1 (*Materiais e Métodos*). Os resultados obtidos por ICP-MS para o CRM BCR 060 (*Aquatic plant*), após decomposição por MWAD são mostrados na Tab. 12.

Tabela 12 - Determinação de metais em material de referência certificado (BCR 060 - *Aquatic plant*), por ICP-MS e ICP OES, após decomposição por MWAD, utilizando HNO_3 14,4 mol l^{-1} , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	Valor certificado	Valor encontrado	
		ICP-MS	ICP OES
As	8*	$5,40 \pm 0,8$	$5,80 \pm 1,1$
Cd	$2,20 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,01$	$2,30 \pm 0,10$
Cr	26*	$26,0 \pm 1,0$	$27,0 \pm 2,0$
Cu	$51,2 \pm 1,9$	$51,6 \pm 1,8$	$52,1 \pm 1,0$
Mn	1760 ± 60	1650 ± 128	1643 ± 122
Mo	2*	$0,88 \pm 0,02$	$< 1,39$
Ni	40*	$41,0 \pm 2,0$	$41,0 \pm 2,0$
Pb	$63,8 \pm 3,2$	$62,9 \pm 0,8$	$61,0 \pm 2,9$
V	6*	$5,90 \pm 0,60$	$6,30 \pm 0,60$
Zn	313 ± 8	313 ± 6	311 ± 31

* Valor informado.

Os resultados apresentados na Tab. 12, referentes à determinação dos analitos no CRM BCR 060 (*Aquatic plant*), após decomposição por MWAD, mostram concordâncias entre o valor certificado e o valor determinado pela técnica de determinação ICP-MS entre 94 e 101% para os analitos Cd, Cu Mn, Pb e Zn. Quando feita a comparação entre o valor informado e o valor determinado por ICP-MS no CRM BCR 060 verificou-se boa concordância para os analitos Cr, Ni e V que

variou de 98 a 103%. Baixa concordância foi verificada para os analitos As (68%) e Mo (44%). Para a determinação dos analitos por ICP OES verificou-se boa concordância entre o valor certificado e o valor determinado entre 93 e 105% para os analitos Cd, Cu, Mn, Pb e Zn. Após, comparando o valor informado com o valor determinado observou-se concordância entre 100 e 105% para os analitos Cr, Ni e V, todavia, para o As foi novamente verificado uma baixa concordância (72%).

Utilizando o teste estatístico Tukey foi possível observar que não houve diferença significativa, com nível de 95% de confiança entre o valor certificado e o valor determinado e nem entre o valor informado e o valor determinado para todos os analitos ($P > 0,05$) por ambas as técnicas de determinação, exceto para o Mo, que quando determinado por ICP-MS, apresentou diferença significativa entre o valor informado e o valor determinado.

Os valores obtidos para os RSDs das medidas no CRM BCR 060 (*Aquatic plant*) quando determinado por ambas as técnicas foram na faixa de 2 a 10% para todos os analitos, com exceção do As que foi de 15% quando determinado por ICP-MS e de 19% quando determinado por ICP OES, cabe ressaltar que para o As o valor é apenas informado, inclusive não é apresentado um grau de incerteza do resultado.

Tendo em vista que para alguns elementos, os resultados obtidos para o CRM BCR 060 (*Aquatic plant*) não foram concordantes com os valores certificados e não foi possível constatar se ocorreu algum problema na etapa de decomposição, o CRM NIST 1515 (*Apple leaves*) foi decomposto nas mesmas condições e os resultados obtidos para as determinações dos metais por ICP-MS e ICP OES estão apresentados na Tab. 13.

Tabela 13 - Determinação de metais em material de referência certificado (NIST 1515 - *Apple leaves*), por ICP-MS e ICP OES, após decomposição por MWAD, utilizando HNO_3 $14,4 \text{ mol l}^{-1}$, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	Valor certificado	Valor encontrado	
		ICP-MS	ICP OES
As	$0,038 \pm 0,007$	$< 0,06$	$< 4,35$
Cd	$0,013 \pm 0,002$	$0,012 \pm 0,001$	$< 1,36$
Cr	0,3*	$0,310 \pm 0,006$	$< 0,36$
Cu	$5,64 \pm 0,24$	$5,40 \pm 0,46$	$5,23 \pm 0,17$
Mn	$54,0 \pm 3,0$	$53,0 \pm 2,0$	$53,0 \pm 2,0$
Mo	$0,094 \pm 0,013$	$0,098 \pm 0,008$	$< 1,39$
Ni	$0,91 \pm 0,12$	$0,93 \pm 0,02$	$< 1,96$
Pb	$0,470 \pm 0,024$	$0,471 \pm 0,004$	$< 2,75$
V	$0,26 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,02$	$< 0,30$
Zn	$12,5 \pm 0,3$	$12,3 \pm 0,3$	$12,7 \pm 0,2$

* Valor informado.

Com base nos resultados apresentados na Tab. 13, observou-se concordância entre o valor certificado e o valor determinado pela técnica de ICP-MS entre 92 e 104% para os analitos Cd, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn. Para o Cr a concordância entre o valor informado e o valor determinado por ICP-MS foi de 103%. Quando realizada as determinações por ICP OES os analitos Cu, Mn e Zn apresentaram concordâncias entre 93 e 102% com o valor certificado, para os demais analitos as concentrações foram abaixo do limite de detecção do método.

Quando aplicada análise estatística (GraphPad InStat, Tukey, $P>0,05$), verificou-se que não houve diferença significativa para os analitos Cu, Mn e Zn, com nível de 95% de confiança entre os valores certificados e os determinados pelas duas técnicas de determinação. Também não houve diferença significativa para os analitos Cd, Mo, Ni, Pb e V, com nível de 95% de confiança entre os valores certificados e os determinados por ICP-MS, e estes analitos não foram detectados

pela técnica de ICP OES por estarem abaixo do LOD. Além disso, não foi verificada diferença significativa para o Cr entre o valor informado e o determinado.

Os valores obtidos para os RSDs no CRM NIST 1515 (*Apple leaves*), quando determinado por ICP-MS, foram inferiores a 9% para os analitos Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn. Quando as determinações foram realizadas por ICP OES, os RSDs das medidas variaram de 2 a 4% para os analitos Cu, Mn e Zn.

Assim, com base nos resultados obtidos para os CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*), após a decomposição por MWAD utilizando HNO_3 14,4 mol l^{-1} , pode-se verificar concordância satisfatória para Cd, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn, quando determinados por ICP-MS e ICP OES. Desta forma, este procedimento utilizando HNO_3 conc. pode ser utilizado como referência para as otimizações dos procedimentos propostos (MW- O_2 -AD e MW-UV-AD) para a alga *Desmarestia anceps*.

Cabe ressaltar, que pelo fato da alga utilizada na otimização do procedimento de preparo de amostra ser oriunda de meio rico em sódio, foi realizada a determinação desse elemento por ICP OES, onde se verificou uma concentração de $24612 \pm 407 \mu\text{g g}^{-1}$. Concentrações elevadas de Na em algas também foram encontradas no trabalho desenvolvido por Hernández-Carmona et al. (2009). Desta forma, por se tratar de um elemento facilmente ionizável, que pode alterar as características do plasma durante a etapa de determinação dos analitos, causando supressão do sinal dos elementos em estudo (FRASER; BEAUCHEMIN, 2000), foi feita a calibração do ICP-MS com curva de adição de analito para avaliar a interferência da matriz da amostra nestas determinações. Os resultados obtidos para as determinações dos metais em estudo por ICP-MS, após calibração com curva de adição de analito e com calibração externa estão apresentados na Tab. 14.

Tabela 14 - Determinação de metais na alga *Desmarestia anceps* por ICP-MS, com calibração por curva de adição de analito e com calibração externa, após decomposição por MWAD com HNO_3 $14,4 \text{ mol l}^{-1}$, ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	Calibração externa	Curva de adição de analito
As	$28,0 \pm 0,6$	$29,0 \pm 0,2$
Cd	$0,58 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,04$
Cr	$4,30 \pm 0,30$	$4,49 \pm 0,05$
Cu	$5,30 \pm 0,40$	$5,00 \pm 0,40$
Mn	$15,0 \pm 0,4$	$13,0 \pm 1,1$
Mo	$0,41 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,03$
Ni	$27,0 \pm 0,8$	$24,0 \pm 1,2$
Pb	$0,43 \pm 0,02$	$0,41 \pm 0,02$
V	$3,00 \pm 0,10$	$3,00 \pm 0,03$
Zn	$26,0 \pm 1,7$	$24,0 \pm 0,1$

Com base nos resultados obtidos após a decomposição por MWAD da alga *Desmarestia anceps* foi possível constatar que não houve diferença significativa, com nível de 95% de confiança para os analitos As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V e Zn para ambas as formas de calibração do equipamento. Para o analito Mo houve diferença significativa entre os resultados obtidos por calibração com curva de adição de analito e com calibração externa, que pode ser justificado por uma provável interferência da matriz da amostra quando feita a calibração externa.

A curva de calibração com adição de analito foi realizada diluindo a triplicata da amostra 50 vezes e depois construindo uma curva com 9 pontos, acrescentando em cada alíquota da amostra 0,025; 0,050; 0,1; 0,250; 0,50; 1; 2,5; 5 e $10 \mu\text{g l}^{-1}$ da solução de referência multielementar SCP33MS, cada solução preparada foi aferida com HNO_3 5%. A amostra diluída 50 vezes sem adição da solução de referência multielementar foi o branco da curva. Desta forma, a curva foi construída nas mesmas condições da amostra, a fim de verificar se componentes da matriz da amostra não estavam ocasionando interferências na etapa de determinação. (SKOOG et al., 2006b).

Os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS com calibração por curva de adição de analito foram menores que 9% para todos os analitos, com exceção para o Mo em que o RSD da medida foi de 11%.

Assim, pode-se verificar que as diluições das amostras de 50 vezes foram suficientes para que não ocorresse interferência do íon Na e também as interferências poliatômicas que os isótopos com massa entre 40 e 82 u podem sofrer devido a presença de espécies de C, N, O, H e Cl na matriz da amostra, o que pode ocorrer nas determinações dos analitos em estudo por ICP-MS.

Devido à boa concordância com os CRMs e a capacidade de detecção dos analitos em estudo, optou-se por fazer as determinações para os demais procedimentos de decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas, avaliados neste trabalho por ICP-MS, uma vez que muitos dos analitos avaliados estão abaixo do limite de detecção do método utilizando a ICP OES.

4.4 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O₂-AD) e subsequente determinação de metais por ICP-MS

Primeiramente, foi avaliada a concentração da solução de HNO₃ necessária para decompor 500 mg de amostra de alga *Desmarestia anceps* utilizando 6 ml de HNO₃ nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹. Para cada uma das soluções de HNO₃ foi avaliada a decomposição com a pressurização dos frascos de reação com 1, 5 e 10 bar de O₂ como reagente auxiliar, segundo o descrito no item 3.6.2 (*Materiais e Métodos*). A escolha das concentrações das soluções de HNO₃ e das pressões de O₂ foram realizadas de acordo com trabalhos recentes descritos na literatura no item 2.4.1.3 (*Revisão Bibliográfica*) (GONZALEZ et al., 2009; BIZZI et al., 2010; BIZZI et al., 2011a; BIZZI et al., 2011c).

A decomposição de cerca de 500 mg de alga com soluções de HNO₃ de diferentes concentrações está diretamente vinculada a concentração de reagente auxiliar (O₂) utilizada no procedimento de decomposição. Como pode ser observado na Fig. 8, para as concentrações de HNO₃ 0,5 e 1 mol l⁻¹ mesmo realizando a pressurização do sistema com O₂ nas pressões de 1 bar (massa de O₂ = 0,11 g), 5 bar (massa de O₂ = 0,53 g) e 10 bar (massa de O₂ = 1,06 g) as soluções resultantes

apresentaram coloração marrom escuro e resíduos sólidos suspensos, sendo que provavelmente a quantidade de ácido não foi capaz de oxidar completamente a matéria orgânica. Em função disso, estas soluções não foram analisadas por ICP-MS para a determinação de metais. Quando foi utilizado HNO_3 diluído 2, 3 e 7 mol l^{-1} com a pressurização do frasco reacional com 1, 5 e 10 bar de O_2 pode ser verificado uma boa decomposição da matéria orgânica, digeridos com aspecto límpido e sem presença de material particulado suspenso. Desta forma, o aspecto das soluções confirmaram o efeito do O_2 como agente oxidante auxiliar, possivelmente devido a capacidade de regeneração do HNO_3 através do mecanismo apresentado nas equações no item 2.4.1.3 (*Revisão Bibliográfica*), promovendo assim melhores condições de decomposição da amostra sem necessidade de utilizar ácido concentrado. O aspecto dos digeridos após a decomposição pode ser observado na Fig. 8.

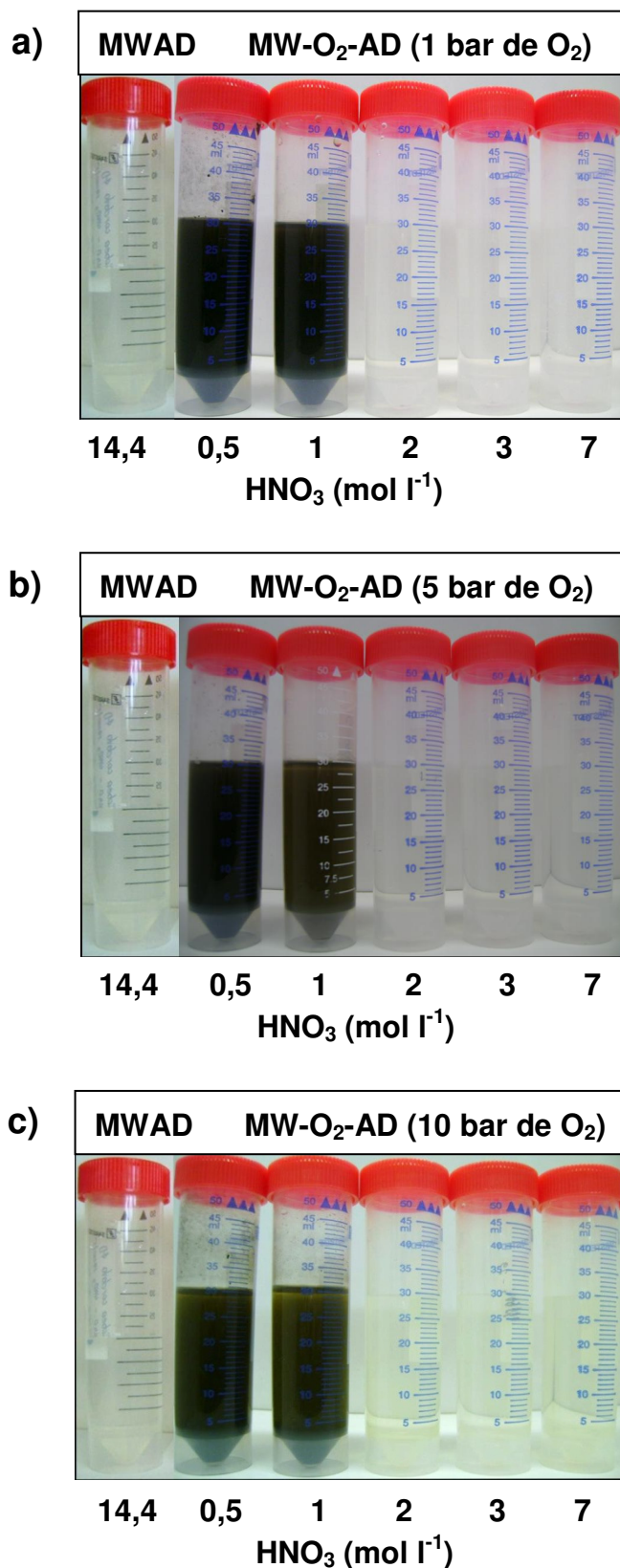


Figura 8 - Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga *Desmarestia anceps* com soluções de HNO₃ concentrado e com HNO₃ diluído (0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹) em diferentes pressões de O₂: (a) 1bar, (b) 5 bar e (c) 10 bar.

As soluções obtidas após o procedimento de preparo de amostra foram submetidas a etapa de determinação dos metais em estudo neste trabalho por ICP-MS. É importante ressaltar que durante a otimização da melhor condição de concentração de HNO_3 e de pressão de O_2 , as concentrações dos analitos determinados foram comparadas com os resultados obtidos após o procedimento de decomposição por MWAD com HNO_3 conc., descrito no item 4.3 (*Resultados e Discussão*). Na Tab. 15, são apresentados os resultados para a determinação dos metais por ICP-MS com o emprego de HNO_3 2 mol l^{-1} sob diferentes pressões de O_2 e os resultados após preparo da amostra por MWAD com HNO_3 conc. utilizado como referência nesta avaliação.

Tabela 15 - Determinação de metais na alga *Desmarestia anceps* por ICP-MS após decomposição com HNO_3 conc. e com HNO_3 2 mol l^{-1} sob diferentes pressões de O_2 , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	Pressão de O_2 (bar)			
	MWAD	1	5	10
As	$28,0 \pm 0,6$	$40,0 \pm 2,0$	$29,0 \pm 0,4$	$29,0 \pm 0,9$
Cd	$0,58 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,02$	$0,62 \pm 0,02$
Cr	$4,30 \pm 0,30$	$3,10 \pm 0,10$	$3,10 \pm 0,30$	$3,60 \pm 0,10$
Cu	$5,30 \pm 0,40$	$7,70 \pm 0,60$	$6,50 \pm 0,90$	$4,70 \pm 0,10$
Mn	$15,0 \pm 0,4$	$18,0 \pm 3,6$	$14,0 \pm 1,1$	$15,0 \pm 0,2$
Mo	$0,41 \pm 0,04$	$0,41 \pm 0,03$	$0,31 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$
Ni	$27,0 \pm 0,8$	$34,0 \pm 2,4$	$24,0 \pm 0,2$	$25,0 \pm 0,6$
Pb	$0,43 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,06$
V	$3,00 \pm 0,10$	$3,40 \pm 0,20$	$3,20 \pm 0,30$	$3,30 \pm 0,20$
Zn	$26,0 \pm 1,7$	$40,0 \pm 2,3$	$29,0 \pm 0,2$	$29,0 \pm 0,7$

Com base nos valores apresentados na Tab. 15 para a decomposição com HNO_3 2 mol l^{-1} , utilizando como parâmetro de referência os resultados obtidos após o procedimento de decomposição por MWAD com HNO_3 conc., foi possível observar que para a pressão de 1 bar de O_2 os analitos As, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn apresentaram concordâncias entre 120 e 155%. Possivelmente, essas concentrações elevadas estejam associadas ao fato da pressão de O_2 empregada

não ter sido suficiente para a decomposição adequada da amostra. Para os analitos Cr, Mo e V as concordâncias entre os resultados obtidos por ICP-MS após a decomposição por MW-O₂-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ e 1 bar de O₂ com os resultados após decomposição pelo método de referência foram de 72, 100 e 113%, respectivamente. Cabe ressaltar que mesmo as soluções finais estando com aspecto límpido, podem apresentar um RCC significativo a ponto de interferir na determinação dos analitos (WASILEWSKA, 2002). Além disso, observa-se uma tendência nos resultados determinados após decomposição por MW-O₂-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ e pressão de 1 bar de O₂ sistematicamente acima dos valores determinados após a decomposição pelo método MWAD 14,4 mol l⁻¹ utilizado como referência. Esse erro sistemático acima do valor utilizado como referência não foi verificado apenas para o Cr, que pode ser justificado por uma possível ligação do analito a compostos presente na amostra que não foram bem decompostos, por isso então, a menor determinação quando empregado o método de decomposição MW-O₂-AD.

Na decomposição por MW-O₂-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ e pressão de 5 bar de O₂, quando comparado com a decomposição por MWAD com HNO₃ conc., os resultados apresentaram uma concordância entre 91 e 104% para os analitos As, Cd, Mn, Pb, V e Zn. Para os analitos Cr, Mo e Ni as concordâncias entre os resultados obtidos após decomposição pelo método proposto com os resultados obtidos após decomposição pelo método de referência foram entre 72 e 89% e para o Cu a concordância foi de 123%. Para o Zn a concordância foi de 112% entre a concentração determinada após decomposição por MW-O₂-AD quando comparada com a concentração determinada após digestão por MWAD com HNO₃ conc.

Para a pressão de 10 bar de O₂ com HNO₃ 2 mol l⁻¹ verificou-se, quando comparado com os resultados de referência após decomposição por MWAD com HNO₃ conc., concordâncias entre 100 e 112% para os analitos As, Cd, Mn, V e Zn e para os analitos Cr, Cu, Ni, Mo e Pb as concordâncias foram entre 80 e 93% com os valores obtidos por MWAD.

Os RSDs das medidas encontrados quando a decomposição foi realizada com HNO₃ 2 mol l⁻¹ e a pressurização do sistema com 1, 5 e 10 bar de O₂ foram entre 1 e 10% para todos os analitos, exceto para o Pb em que os RSDs das medidas foram entre 11 e 15%. Exceções também foram observadas para o Mn quando

utilizada a pressão de 1 bar de O₂ em que o RSD da medida foi de 20% e para o Cu em que o RSD da medida foi de 14%.

Quando os resultados obtidos com HNO₃ 2 mol l⁻¹ sob as pressões de 1, 5 e 10 bar O₂ foram avaliados por análise estatística, considerando a decomposição por MWAD com HNO₃ conc. como referência, verificou-se que não houve diferença significativa, com 95% de nível de confiança (GraphPad InStat, Tukey, P>0,05) para os analitos Mn e V em todas as pressões de O₂ avaliadas. Para os analitos As, Cd, Cu, Ni, Pb e Zn não houve diferença significativa nas pressões de 5 e 10 bar de O₂. Para o Mo não houve diferença significativa apenas na pressão de 1 bar de O₂. Para o Cr verificou-se que houve diferença significativa entre os valores determinados e os valores de referência em todas as pressões de O₂ analisadas.

Na Tab. 16 são apresentados os resultados para a determinação dos metais por ICP-MS nas condições de HNO₃ 3 mol l⁻¹ sob diferentes pressões de O₂ e os resultados após decomposição por MWAD com HNO₃ conc. utilizado como referência.

Tabela 16 - Determinação de metais na alga *Desmarestia anceps* por ICP-MS após decomposição com HNO₃ conc. e com HNO₃ 3 mol l⁻¹ sob diferentes pressões de O₂, (µg g⁻¹, n=3).

Analito	Pressão de O ₂ (bar)			
	MWAD	1	5	10
As	28,0 ± 0,6	34,0 ± 2,3	30,0 ± 0,3	31,0 ± 0,5
Cd	0,58 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,64 ± 0,01	0,67 ± 0,01
Cr	4,30 ± 0,30	2,00 ± 0,01	3,40 ± 0,15	3,50 ± 0,17
Cu	5,30 ± 0,40	5,20 ± 0,40	5,00 ± 0,20	5,40 ± 0,20
Mn	15,0 ± 0,4	14,0 ± 0,4	14,0 ± 0,8	15,0 ± 0,3
Mo	0,41 ± 0,04	0,34 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Ni	27,0 ± 0,8	23,0 ± 1,1	26,0 ± 0,7	26,0 ± 1,4
Pb	0,43 ± 0,02	0,36 ± 0,002	0,42 ± 0,03	0,40 ± 0,04
V	3,00 ± 0,10	2,80 ± 0,04	3,50 ± 0,20	3,60 ± 0,10
Zn	26,0 ± 1,7	33,0 ± 2,0	29,0 ± 0,4	30,0 ± 0,5

Analisando os resultados apresentados na Tab. 16 para a decomposição com HNO_3 3 mol l^{-1} , utilizando como base de referência as determinações após a decomposição por MWAD com HNO_3 conc., na pressão de 1 bar de O_2 , foram observadas concordâncias de 121 e 127% para o As e Zn, respectivamente. Para os analitos Cd, Cu, Mn e V as concordâncias entre os resultados obtidos por ICP-MS após decomposição pelo método proposto foram entre 93 e 112%, quando comparadas com o método de referência. Para o Mo, Ni e Pb as concordâncias entre os resultados após decomposição por MW- O_2 -AD com HNO_3 3 mol l^{-1} e 1 bar de O_2 foram entre 83 e 85% quando comparada aos resultados após a decomposição por MWAD com HNO_3 conc., para o Cr a concordância encontrada foi de 47%.

Conforme verificado quando utilizado HNO_3 2 mol l^{-1} com pressão de 1 bar de O_2 , resultados mais altos para as determinações dos analitos também ocorreram ao ser utilizado HNO_3 3 mol l^{-1} e 1 bar de O_2 , quando comparado com a decomposição MWAD utilizada como referência. Isso provavelmente tenha ocorrido devido ao fato da quantidade de O_2 utilizada não ter sido suficiente para regenerar o HNO_3 e, conseqüentemente, não decompor adequadamente a amostra, mesmo as soluções resultantes apresentando aspecto límpido, isso pode estar interferindo na determinação dos analitos (WASILEWSKA, 2002). Cabe ressaltar que com HNO_3 3 mol l^{-1} e 1 bar de O_2 os resultados são menores que os encontrados com HNO_3 2 mol l^{-1} e 1 bar de O_2 , isso provavelmente devido ao ácido ser mais concentrado e, desta forma, a decomposição da matéria orgânica pode ter sido um pouco mais eficiente.

Quando avaliada a concordância entre as determinações realizadas após o preparo de amostra com HNO_3 3 mol l^{-1} com pressão de 5 bar de O_2 com a decomposição por MWAD com HNO_3 conc. utilizada como referência, verificou-se concordâncias que variaram de 93 a 115% para todos os analitos com exceção para Cr e Mo em que as concordâncias foram de 79 e 88%, respectivamente.

Ao realizar a decomposição da amostra com HNO_3 3 mol l^{-1} com pressão de 10 bar de O_2 comparando com o preparo de amostra por MWAD com HNO_3 conc., obteve-se concordâncias entre 93 e 111% para os analitos As, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn, para o Cr e Mo foram verificadas concordâncias de 81 e 90%, respectivamente. Quando comparado o resultado determinado para o V após decomposição pelo método proposto com o resultado obtido após decomposição pelo método de

referência foi observado concordância de 120% e para o Cd uma concordância de 116%.

Os RSDs das medidas quando utilizada a solução de HNO_3 na concentração de 3 mol l^{-1} no preparo da alga nas pressões de 1, 5 e 10 bar de O_2 foram entre 0,6 e 10% para todos os analitos avaliados.

Quando realizada a análise estatística dos resultados obtidos por ICP-MS após preparo de amostra por MW- O_2 -AD com HNO_3 3 mol l^{-1} , tomando como referência os resultados após preparo da amostra por MWAD com ácido conc., verificou-se que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$) para os analitos Cu, Mn e Pb em todas as condições de pressão de O_2 avaliadas, para os analitos As e Zn não houve diferença significativa apenas quando utilizada a pressão de 5 bar de O_2 , para o Cd não houve diferença significativa nas pressões de 1 e 5 bar de O_2 . Para o Ni e Mo não houve diferença significativa quando utilizado HNO_3 3 mol l^{-1} nas pressões de 5 e 10 bar de O_2 no método MW-UV-AD quando comparado com o método de referência MWAD com HNO_3 conc., para o V não houve diferença significativa apenas na pressão de 1 bar de O_2 e para o Cr houve diferença significativa em todas as condições de pressão de O_2 avaliadas quando comparado com o método de referência. Cabe enfatizar que quando comparado estatisticamente os resultados para Cr para as demais algas, conforme pode ser observado mais adiante nas Tabs. 25 e 26, não houve diferença significativa, talvez isso possa ter ocorrido para a alga *Desmarestia anceps* devido a uma heterogeneidade da amostra, onde possivelmente o analito não encontrava-se distribuído de forma uniforme na amostra.

Na Tab. 17 são apresentados os resultados para a determinação dos metais por ICP-MS nas condições de HNO_3 7 mol l^{-1} sob diferentes pressões de O_2 e os resultados após decomposição por MWAD com HNO_3 conc. utilizado como referência.

Tabela 17 - Determinação de metais na alga *Desmarestia anceps* por ICP-MS após decomposição com HNO₃ conc. e com HNO₃ 7 mol l⁻¹ sob diferentes pressões de O₂, (µg g⁻¹, n=3).

Analito	Pressão de O ₂ (bar)			
	MWAD	1	5	10
As	28,0 ± 0,6	22,0 ± 1,1	30,0 ± 0,1	29,0 ± 1,8
Cd	0,58 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,63 ± 0,004	0,61 ± 0,02
Cr	4,30 ± 0,30	1,30 ± 0,10	3,50 ± 0,20	3,70 ± 0,10
Cu	5,30 ± 0,40	3,50 ± 0,10	6,30 ± 0,40	6,50 ± 0,50
Mn	15,0 ± 0,4	9,30 ± 0,50	14,0 ± 1,0	14,0 ± 1,3
Mo	0,41 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,01
Ni	27,0 ± 0,8	17,0 ± 1,3	25,0 ± 0,1	25,0 ± 0,6
Pb	0,43 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,42 ± 0,04
V	3,00 ± 0,10	1,90 ± 0,01	3,10 ± 0,30	3,20 ± 0,06
Zn	26,0 ± 1,7	21,0 ± 1,3	26,0 ± 1,6	26,0 ± 1,4

Com base nos valores apresentados na Tab. 17 para a decomposição da amostra com HNO₃ 7 mol l⁻¹, pode-se observar, tomando como base de referência as determinações após a decomposição por MWAD com HNO₃ conc., para a pressão de 1 bar de O₂, que para os analitos As, Cd, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn as concordâncias foram entre 62 e 81% e para o Cr a concordância com o valor obtido por MWAD foi de 30%. Quando avaliado o uso da pressão de 5 bar de O₂ observou-se concordâncias que variaram de 90 a 109% para os analitos As, Cd, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn, para o Cu a concordância foi de 119% e para o Cr a concordância com o valor obtido por MWAD foi de 81%. Quando o sistema foi pressurizado com 10 bar de O₂ as concordâncias foram entre 93 e 107% para os analitos As, Cd, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn, para o metal Cu a concordância foi de 123% e para o Cr a concordância com o valor obtido por MWAD foi de 86%.

Ao compararmos os resultados obtidos com HNO₃ 7 mol l⁻¹ na pressão de 1 bar de O₂ com os determinados nas soluções de HNO₃ 2 e 3 mol l⁻¹ na mesma pressão, eles são inferiores e as concordâncias com os valores do método de referência também foram menores, como o ácido é mais concentrado que os outros utilizados o esperado eram valores maiores para as determinações dos analitos. A

provável justificativa para esses resultados é um problema na etapa de pressurização, pois como a quantidade de O_2 utilizada é extremamente pequena qualquer escape do gás na hora de fechar a válvula de entrada e saída de gases já ocasiona diminuição deste gás na etapa de decomposição da amostra, consequentemente menor é a quantidade de HNO_3 regenerada e portanto ocorre uma diminuição da eficiência de decomposição. Outra justificativa plausível para o ocorrido é que com a utilização do HNO_3 7 mol l^{-1} e 1 bar de O_2 , aconteceu uma melhor decomposição da matéria orgânica, devido ao ácido ser mais concentrado, por conseguinte mais eficiente foi a decomposição, diminuindo possíveis interferências na etapa de determinação.

Os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS após decomposição por MW- O_2 -AD com HNO_3 7 mol l^{-1} e com pressões de 1, 5 e 10 bar de O_2 foram entre 0,3 e 10% para todos os analitos avaliados.

Quando aplicado o teste estatístico aos resultados obtidos por ICP-MS após preparo da amostra por MW- O_2 -AD com HNO_3 7 mol l^{-1} com a pressurização do sistema sob diferentes pressões de O_2 , utilizando como parâmetro de referência os resultados após decomposição da amostra por MWAD com HNO_3 conc., observou-se que não houve diferença significativa, ao nível de 95% de confiança (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$) para os analitos As, Cd, Mn, Ni, V e Zn nas pressões de 5 e 10 bar de O_2 . Para os analitos Mo e Pb não houve diferença significativa nas pressões de 5 e 10 bar de O_2 quando comparado com o método de referência. Para os analitos Cr e Cu houve diferença significativa em todas as condições de pressão de O_2 avaliadas quando comparado com os valores obtidos após MWAD com HNO_3 concentrado.

Assim, observou-se que as decomposições por MW- O_2 -AD utilizando HNO_3 nas concentrações 2, 3 e 7 mol l^{-1} nas pressões de 5 e 10 bar de O_2 apresentaram resultados bastante semelhantes entre si e concordantes com os resultados determinados pelo método de referência MWAD. A partir disto, a escolha da solução de HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 se justifica pelo fato de que o RCC nos digeridos foi menor quando comparado com HNO_3 2 mol l^{-1} e pressões de 5 e 10 bar de O_2 , como pode ser observado na Tab. 18. Cabe ressaltar que para o Cr houve diferença significativa para todas as concentrações de ácido e de pressão avaliadas quando comparado com o método de referência, mas que entre os resultados obtidos utilizando o método proposto MW- O_2 -AD não houve diferença significativa.

A fim de confirmar os resultados determinados após a decomposição da alga *Desmarestia anceps* pelo método MW-O₂-AD, foi realizada a avaliação da eficiência de decomposição da matéria orgânica nos digeridos, onde foi calculado o teor de carbono residual (RCC) nas soluções obtidas conforme relatado na literatura (WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989; GOUVEIA et al., 2001), utilizando como referência o teor de carbono inicial presente na amostra determinado por análise elementar conforme item 4.2 (*Resultados e Discussão*). Quando a decomposição da amostra foi realizada com solução de HNO₃ nas concentrações de 0,5 e 1 mol l⁻¹, os valores de RCC não foram determinados devido a grande quantidade de material particulado provenientes da não decomposição eficiente da amostra. Para a solução de HNO₃ nas concentrações de 2, 3 e 7 mol l⁻¹ com a pressurização do frasco reacional com 1, 5 e 10 bar de O₂ foram determinados os valores de RCC nos digeridos conforme item 3.7 (*Materiais e Métodos*), os quais podem ser observados na Tab. 18.

É importante ressaltar que para a determinação do teor de carbono em solução por ICP OES, foi necessário construir a curva de calibração adicionando 1 ml de NaCl 2,5% (m/v) que corresponde a uma massa de Na de 0,0098 g, para que as soluções de calibração tivessem composição semelhante as soluções obtidas após decomposição da alga, uma vez que a alga *Desmarestia anceps* apresentava uma quantidade de sódio elevada.

Além da determinação do RCC, também foi determinada a acidez residual para averiguar a quantidade de HNO₃ presente nos digeridos, que foi calculado com base na concentração inicial de HNO₃ utilizado no procedimento de decomposição da amostra de acordo com o item 3.8 (*Materiais e Métodos*). Conforme pode ser observado na Tab. 18, os valores de acidez residual apresentaram um aumento considerável a medida que aumentou a quantidade de oxigênio utilizada como reagente auxiliar o que vem a enfatizar a participação do O₂ no processo de regeneração do HNO₃.

Tabela 18 - Teor de carbono residual e acidez residual determinados nos digeridos da alga *Desmarestia anceps* após MW-O₂-AD, utilizando diferentes concentrações de HNO₃ com diferentes pressões de O₂, (n=3).

Pressão O ₂ (bar)	HNO ₃ (mol l ⁻¹)	RCC (%)	Teor de C em solução (mg l ⁻¹)	*Acidez residual (%)
-	14,4	0,60 ± 0,04	29,0 ± 2,0	75,0 ± 2,0
1	2	2,20 ± 0,90	125 ± 16	35,0 ± 3,0
	3	1,60 ± 0,20	76,0 ± 11,0	41,0 ± 4,0
	7	0,90 ± 0,10	51,0 ± 2,0	80,0 ± 2,0
5	2	2,60 ± 0,10	122 ± 7	43,0 ± 0,3
	3	1,50 ± 0,10	68,0 ± 5,0	65,0 ± 0,2
	7	1,80 ± 0,10	73,0 ± 6,0	87,0 ± 2,0
10	2	1,70 ± 0,2	79,0 ± 8,0	49,0 ± 2,0
	3	1,00 ± 0,04	55,0 ± 5,0	69,0 ± 0,8
	7	1,80 ± 0,4	76,0 ± 20,0	96,0 ± 4,1

* Valor correspondente a 6 ml de HNO₃ (2, 3 e 7 mol l⁻¹).

Com base nos dados apresentados na Tab. 18 foi realizada a análise estatística dos resultados para o teor de carbono residual, onde verificou-se que não houve diferença significativa, com 95% de nível de confiança (GraphPad InStat, Tukey P>0,05) quando utilizado 1 bar de O₂ em todas as condições ácidas avaliadas e também quando utilizado 10 bar de O₂ nas concentrações de ácido 2 e 7 mol l⁻¹. Para as demais condições houve diferença significativa entre os resultados para o RCC.

Durante a decomposição de 500 mg de amostra de alga com 6 ml de solução de HNO₃ em diferentes concentrações foi possível verificar que a eficiência de decomposição da matéria orgânica é dependente da quantidade de O₂ utilizada para pressurizar o frasco de decomposição, quando HNO₃ 2 mol l⁻¹ é utilizado, sendo que para as demais concentrações de HNO₃ parece não ter diferença significativa, conforme demonstrado na Fig. 9.

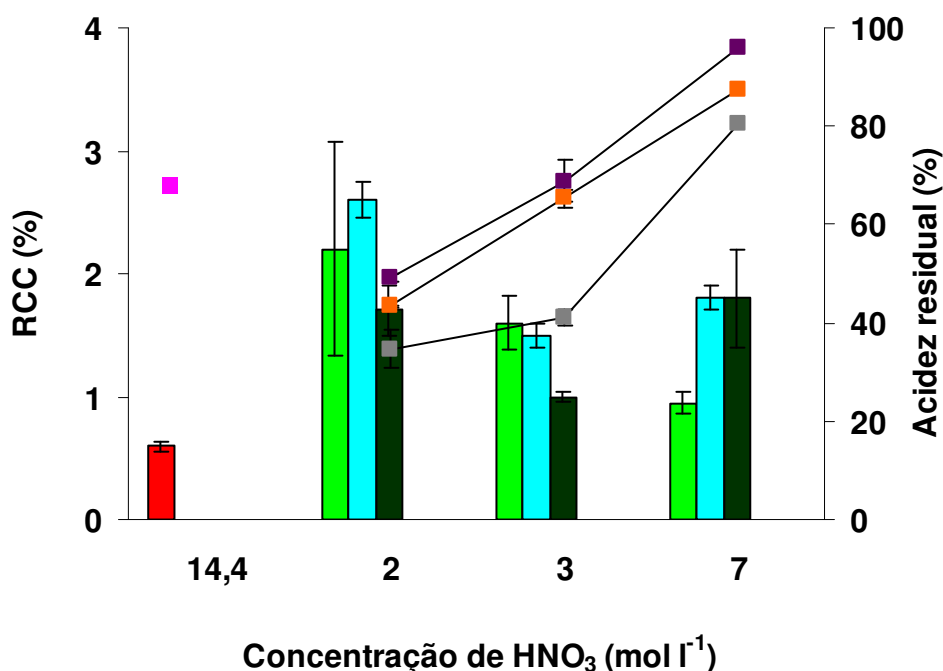


Figura 9 - Teores de carbono residual para as soluções obtidas após decomposição da alga *Desmarestia anceps* por MWAD com HNO₃ 14,4 mol l⁻¹ e MW-O₂-AD com HNO₃ nas concentrações de 2, 3 e 7 mol l⁻¹: RCC obtido após decomposição com ■ HNO₃ conc.; ■ 1 bar de O₂; ■ 5 bar de O₂ e ■ 10 bar de O₂. Acidez residual após decomposição com ■ HNO₃ conc.; ■ 1 bar de O₂; ■ 5 bar de O₂ e ■ 10 bar de O₂.

Os resultados obtidos após a otimização da concentração da solução de HNO₃ utilizada para a decomposição da alga *Desmarestia anceps* com o sistema pressurizado mostram que é possível decompor até 500 mg da amostra utilizando uma solução de HNO₃ 3 mol l⁻¹ na pressão de 5 bar de O₂. Nestas condições a decomposição da matéria orgânica foi considerada eficiente, com RCC de 1,5 ± 0,1%. Cabe ressaltar que para as demais condições, HNO₃ 3 mol l⁻¹ com 10 bar de O₂ e HNO₃ 7 mol l⁻¹ com 5 e 10 bar de O₂, as decomposições apresentaram praticamente a mesma eficiência de decomposição, por isso foi então escolhida a menor concentração de HNO₃ e menor pressão de O₂. Para a solução de HNO₃ 2 mol l⁻¹ nas pressões de 5 e 10 bar de O₂ foram verificados valores de RCC mais elevados. Além disso, quando analisada a acidez residual nos digeridos após decomposição com HNO₃ 2 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂, observou-se os menores valores, verificando-se que uma quantidade bastante significativa do HNO₃ foi consumida na

oxidação da matéria orgânica, sem ocorrer a regeneração do ácido, provavelmente por isso a decomposição não foi tão eficiente.

Com base nos resultados da Tab. 18, pode-se observar que a acidez residual determinada nos digeridos aumentou com a maior quantidade de oxigênio usada na pressurização dos frascos de decomposição ocasionando a potencialização da ação oxidante do HNO_3 , devido aos ciclos de regeneração do ácido que ocorre na fase gasosa enquanto tiver O_2 e NO . Cabe enfatizar que a partir da condição de HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 ocorreu boa regeneração do HNO_3 comprovada através da determinação da acidez residual de $65 \pm 0,2\%$. Esses resultados vem ao encontro dos obtidos por Bizzi et al. (2010 e 2011a) onde bons resultados foram alcançados para a decomposição de até 500 mg de amostras biológicas e botânicas com HNO_3 nas concentrações de 2 e 3 mol l^{-1} e pressão de 5 bar de O_2 .

Assim, a condição selecionada como adequada para a decomposição da alga *Desmarestia anceps* (3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2), foi utilizada também para a decomposição dos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e para o NIST 1515 (*Apple leaves*) para avaliar a exatidão do método de decomposição proposto, determinando as concentrações dos metais por ICP-MS, conforme Tab. 19.

Tabela 19 - Determinação de metais em materiais de referência certificados BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) por ICP-MS, após decomposição com HNO_3 3 mol l^{-1} e pressão de 5 bar de O_2 , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	BCR 060 (<i>Aquatic plant</i>)		NIST 1515 (<i>Apple leaves</i>)	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
As	8*	$6,10 \pm 0,03$	$0,038 \pm 0,007$	$< 0,05$
Cd	$2,20 \pm 0,10$	$2,20 \pm 0,05$	$0,013 \pm 0,002$	$0,012 \pm 0,001$
Cr	26*	$27,2 \pm 0,7$	0,3*	$0,310 \pm 0,051$
Cu	$51,2 \pm 1,9$	$49,5 \pm 2,4$	$5,64 \pm 0,24$	$5,40 \pm 0,38$
Mn	1760 ± 60	1695 ± 47	54 ± 3	56 ± 3
Mo	2*	$0,770 \pm 0,004$	$0,094 \pm 0,013$	$0,091 \pm 0,004$
Ni	40*	$40,0 \pm 1,7$	$0,91 \pm 0,12$	$0,93 \pm 0,03$
Pb	$63,8 \pm 3,2$	$64,6 \pm 0,6$	$0,470 \pm 0,024$	$0,442 \pm 0,001$
V	6*	$6,30 \pm 0,06$	$0,26 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,01$
Zn	313 ± 8	292 ± 11	$12,5 \pm 0,3$	$12,2 \pm 0,2$

* Valor informado.

Com base nos resultados obtidos após a decomposição do CRM BCR 060 (*Aquatic plant*), com HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 , conforme resultados apresentados na Tab. 19, observou-se concordância na faixa de 93 a 105% para os analitos Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V e Zn, sendo a menor concordância de 93% para Zn. Para o As a concordância entre valor informado e o valor determinado foi de 76%. Para o Mo a concordância foi em torno de 39% em relação ao valor informado. É importante enfatizar que no valor informado é mais difícil de controlar a exatidão e a precisão. Os RSDs dos valores determinados no CRM foram entre 0,5 e 5% para todos os analitos, o que comprova a precisão das determinações.

Na decomposição do CRM NIST 1515 (*Apple leaves*) com HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 , baseado nos resultados da Tab. 19, houve concordância entre 92 e 105% entre os valores certificados e os valores determinados para os analitos Cd, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn. Também verificou-se concordância de 103% entre o valor

informado e o valor determinado para o analito Cr. Apenas o analito As não foi possível determinar no CRM por ter ficado abaixo do limite de detecção do método. Os RSDs dos valores determinados neste CRM variaram entre 0,2 e 8% para todos os analitos, com exceção para o Cr em que o RSD da medida foi de 16%.

Quando realizada a avaliação estatística dos resultados determinados nos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) com os valores certificados e informados (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$) observou-se que não houve diferença significativa para todos os analitos, com exceção para Zn e Mo no CRM BCR 060 (*Aquatic plant*).

Desta forma, foi comprovada a exatidão do método de decomposição MW-O₂-AD utilizando HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂, sendo assim aplicado para as demais amostras de algas avaliadas neste trabalho, que serão apresentados no item 4.7 (*Resultados e Discussão*).

4.5 Decomposição por via úmida em sistema fechado assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD) e subsequente determinação de metais por ICP-MS

Após avaliar a aplicabilidade da MW-O₂-AD para a decomposição da amostra de alga *Desmarestia anceps* visando a posterior determinação de metais por ICP-MS, foi então avaliado o procedimento de preparo de amostra MW-UV-AD onde foram empregadas lâmpadas de UV em associação com a radiação micro-ondas para a oxidação da matéria orgânica. Este método de preparo de amostra tem como principal vantagem a menor quantidade de ácido necessária para a oxidação da matéria orgânica (FLORIAN; KNAPP, 2001; BENDICHO et al., 2010). Desta forma, foi feita a avaliação da utilização de HNO₃ nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹ e também a avaliação de HNO₃ em associação com H₂O₂, utilizando para ambas as condições massa de amostra de 500 mg.

A eficiência de decomposição do procedimento proposto para a amostra de alga *Desmarestia anceps* foi avaliada pela concordância dos analitos com os valores determinados após o procedimento de preparo de amostra MWAD utilizado como referência, bem como pela determinação de RCC por ICP OES, com base no teor de carbono inicial presente na amostra, de acordo com a Tab. 10, que foi determinado por análise elementar.

4.5.1 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta com solução diluída de HNO_3

Primeiramente, a amostra de alga foi decomposta utilizando como reagente oxidante uma solução diluída de HNO_3 e uma lâmpada de emissão de radiação UV, assistida por radiação micro-ondas. Quando a solução de HNO_3 $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ foi utilizada, o digerido final apresentou uma coloração marrom e sólidos residuais, proveniente da decomposição não eficiente da amostra e por isso os valores de RCC nos digeridos não foram determinados. Cabe destacar que aspecto semelhante foi observado nos digeridos para a mesma concentração de HNO_3 com a pressurização do sistema com 1, 5 e 10 bar de O_2 , conforme estudo descrito no item 4.4 (*Resultados e Discussão*). Quando a decomposição foi feita com solução de HNO_3 1 mol l^{-1} , o digerido final apresentou uma coloração amarelada com um pouco de material particulado, indicando que a decomposição não foi totalmente eficiente. Esta baixa eficiência foi comprovada pelo valor de RCC de $28 \pm 11\%$ e pelo elevado valor de desvio padrão das medidas efetuadas. Devido ao teor de material particulado, essas soluções não foram analisadas por ICP-MS para a determinação de metais. Para as decomposições da amostra com solução de HNO_3 nas concentrações de 2, 3 e 7 mol l^{-1} por MW-UV-AD foi observado um aspecto límpido nos digeridos e os valores de RCC foram de $0,93 \pm 0,16\%$, $0,88 \pm 0,06\%$ e $0,27 \pm 0,04\%$, respectivamente. O aspecto dos digeridos obtidos pela decomposição da alga *Desmarestia anceps* com diferentes concentrações de HNO_3 e com a lâmpada de UV assistida por radiação micro-ondas podem ser observados na Fig. 10.

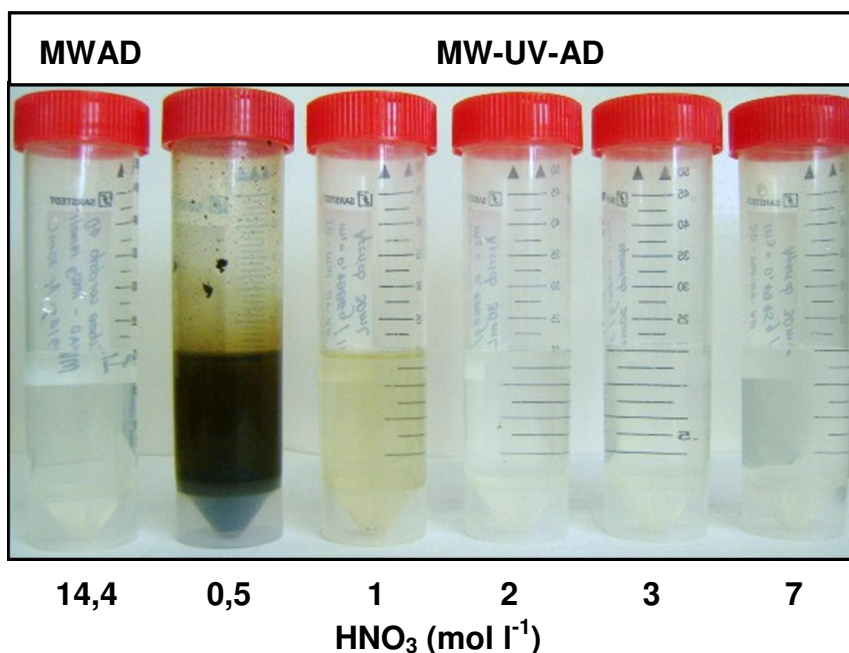


Figura 10 - Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga *Desmarestia anceps* com HNO_3 conc. por MWAD e com soluções de HNO_3 em diferentes concentrações e com a lâmpada de emissão de radiação UV assistida por radiação micro-ondas.

Além da avaliação do RCC também foi determinada nos digeridos a acidez residual, onde observou-se um aumento da acidez, conforme aumentou a concentração da solução de HNO_3 , o que comprova o baixo consumo de ácido durante o processo de digestão. A acidez residual foi de $25 \pm 1,5\%$ para HNO_3 1 mol l^{-1} , $30 \pm 0,7\%$ para HNO_3 2 mol l^{-1} , $52 \pm 3,3\%$ para HNO_3 3 mol l^{-1} e de $76 \pm 0,9\%$ para HNO_3 7 mol l^{-1} .

Cabe ressaltar que a decomposição com HNO_3 1 mol l^{-1} no procedimento MW-UV-AD foi mais satisfatória do que no procedimento de decomposição utilizando o mesmo ácido e pressurizando o sistema com O_2 , o que pode ser justificado pelo uso da lâmpada de emissão de radiação UV que permite a decomposição da matéria orgânica através da foto-oxidação com reduzida quantidade de ácido (BENDICHO et al., 2010). O aspecto dos dois digeridos após decomposição com HNO_3 1 mol l^{-1} (a) com pressurização do sistema com O_2 e (b) com a lâmpada de radiação UV, ambos assistidos por radiação micro-ondas podem ser observados na Fig. 11.



Figura 11 - Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga *Desmarestia anceps* com soluções de HNO_3 1 mol l^{-1} (a) decomposição por MW- O_2 -AD e (b) decomposição por MW-UV-AD.

Em todas as condições otimizadas foram determinados os metais em estudo neste trabalho por ICP-MS. Na Tab. 20, é apresentada a determinação dos metais por ICP-MS com o emprego de solução de HNO_3 nas concentrações 1, 2, 3 e 7 mol l^{-1} com a lâmpada de emissão de radiação UV assistida por radiação micro-ondas, bem como os resultados após decomposição por MWAD com HNO_3 conc., utilizado como referência.

Tabela 20 - Determinação de metais por ICP-MS na alga *Desmarestia anceps*, após decomposição por MWAD com HNO₃ conc. e por MW-UV-AD com o emprego de soluções de HNO₃ nas concentrações de 1, 2, 3 e 7 mol l⁻¹, (µg g⁻¹, n=3).

Analito	MWAD	MW-UV-AD			
	14,4 mol l ⁻¹	1 mol l ⁻¹	2 mol l ⁻¹	3 mol l ⁻¹	7 mol l ⁻¹
As	28,0 ± 0,6	26,0 ± 1,7	28,0 ± 0,5	27,0 ± 1,4	28,0 ± 0,4
Cd	0,58 ± 0,02	0,52 ± 0,03	0,55 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,57 ± 0,03
Cr	4,30 ± 0,30	1,80 ± 0,80	3,20 ± 0,04	3,10 ± 0,30	3,20 ± 0,20
Cu	5,30 ± 0,40	2,50 ± 1,30	5,30 ± 0,10	5,20 ± 0,50	5,50 ± 0,30
Mn	15,0 ± 0,4	8,90 ± 0,70	12,0 ± 0,4	11,0 ± 0,8	12,0 ± 0,4
Mo	0,41 ± 0,04	0,40 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,40 ± 0,01
Ni	27,0 ± 0,8	21,0 ± 4,1	27,0 ± 0,4	27,0 ± 1,9	28,0 ± 0,9
Pb	0,43 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,44 ± 0,05	0,40 ± 0,05	0,42 ± 0,01
V	3,00 ± 0,10	2,60 ± 0,07	3,40 ± 0,05	3,20 ± 0,22	3,00 ± 0,10
Zn	26,0 ± 1,7	24,0 ± 1,8	25,0 ± 0,6	27,0 ± 2,8	26,0 ± 0,7

Com base nos resultados da Tab. 20 obtidos por ICP-MS após decomposição por MW-UV-AD com soluções de HNO₃ diluído, quando comparados com os resultados utilizados como referência após decomposição por MWAD com HNO₃ conc., verificou-se que mesmo a decomposição com HNO₃ 1 mol l⁻¹ não sendo totalmente eficiente, conforme observado na Fig. 10, houve concordância satisfatória entre 78 e 98% para alguns analitos como As, Cd, Mo, Ni, V e Zn. Contudo, para os analitos Cr, Cu, Mn e Pb as concordâncias com os valores obtidos por MWAD foram entre 30 e 59%. Quando as soluções de HNO₃ 2, 3 e 7 mol l⁻¹ foram utilizadas no preparo da amostra por MW-UV-AD as concordâncias foram entre 90 e 113% para todos os analitos, exceto para Cr e Mn em que as concordâncias foram entre 72 e 80% quando comparadas com os valores obtidos após preparo da amostra pelo método de referência.

Os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS após decomposição por MW-UV-AD com HNO₃ 1 mol l⁻¹ foram entre 3 e 8% para os analitos As, Cd, Mn, Mo, V e Zn. Para os analitos Cr, Cu, Ni e Pb os RSDs das medidas foram de 44, 52, 20 e 23%, respectivamente. Esses RSDs insatisfatórios devem-se provavelmente a

decomposição não eficiente que acarreta em uma taxa de carbono residual significativa que pode ter ocasionado interferências durante as determinações como, por exemplo, o efeito de memória para alguns analitos. Quando utilizado HNO_3 2, 3 e 7 mol l^{-1} os RSDs das determinações foram entre 1 e 10% para todos os analitos, exceção apenas para o Pb em que o RSD da medida foi de 13%, quando utilizado no preparo da amostra por MW-UV-AD HNO_3 3 mol l^{-1} .

Os resultados após preparo de amostra por MW-UV-AD utilizando HNO_3 com lâmpada de UV assistida por radiação micro-ondas, determinados por ICP-MS foram analisados por teste estatístico utilizando como parâmetro de referência os resultados após decomposição por MWAD com HNO_3 conc., onde observou-se que não houve diferença significativa, ao nível de 95% de confiança (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$) para os analitos As, Cd, Mo e Zn nas quatro concentrações de soluções diluídas de HNO_3 avaliadas quando comparadas ao método de referência. Para o Cr não houve diferença significativa quando utilizada no preparo da amostra as soluções de HNO_3 nas concentrações 2 e 7 mol l^{-1} e para o Cu e Pb não houve diferença significativa quando na decomposição das amostras foram utilizadas as soluções de HNO_3 de 2, 3 e 7 mol l^{-1} quando comparados ao método MWAD com HNO_3 conc. Para o Ni não houve diferença significativa quando utilizada no preparo da amostra as soluções de HNO_3 1, 2 e 3 mol l^{-1} e para o V verificou-se que não houve diferença significativa para as soluções de HNO_3 nas concentrações 3 e 7 mol l^{-1} quando comparado ao método de referência. As concentrações determinadas para Mn apresentaram diferenças significativas para todas as condições de HNO_3 avaliadas.

Com base nos resultados obtidos após a otimização da concentração da solução de HNO_3 com a utilização da lâmpada de UV assistida por radiação micro-ondas para a decomposição da alga, verificou-se que é possível decompor 500 mg de amostra com solução de HNO_3 nas concentrações de 2, 3 e 7 mol l^{-1} sem necessitar de outros reagentes auxiliares. Neste caso, a solução de HNO_3 diluída 2 mol l^{-1} foi considerada adequada, considerando que os RSDs das medidas foram na faixa de 1 a 4% para todos os analitos, com exceção do Pb, e as concordâncias foram semelhantes as obtidas com as demais concentrações das soluções de HNO_3 , quando comparada com os resultados utilizados como referência após decomposição por MWAD. Desta forma, o uso de ácido diluído na etapa de decomposição da amostra diminui o consumo de reagentes e, conseqüentemente, o

volume de resíduos gerados é minimizado, o que está de acordo com os princípios da química verde (ARMENTA; GARRIGUES; GUARDIA, 2008). Além disso, quanto menor a quantidade de reagente necessário para decompor a amostra menor o valor para o branco e, portanto, menores os limites de detecção.

Assim, o método de decomposição MW-UV-AD usando HNO_3 2 mol l^{-1} foi utilizado para decompor os CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) para avaliar a exatidão do método. Os resultados obtidos estão apresentados na Tab. 21.

Tabela 21 - Determinação de metais nos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) por ICP-MS, após decomposição por MW-UV-AD com HNO_3 2 mol l^{-1} , ($\mu\text{g g}^{-1}$, $n=3$).

Analito	BCR 060 (<i>Aquatic plant</i>)		NIST 1515 (<i>Apple leaves</i>)	
	Valor certificado	Valor encontrado	Valor certificado	Valor encontrado
As	8*	$6,20 \pm 0,57$	$0,038 \pm 0,007$	$< 0,04$
Cd	$2,20 \pm 0,10$	$2,30 \pm 0,10$	$0,013 \pm 0,002$	$0,014 \pm 0,001$
Cr	26*	$27,6 \pm 0,4$	0,3*	$0,300 \pm 0,008$
Cu	$51,2 \pm 1,9$	$52,2 \pm 3,1$	$5,64 \pm 0,24$	$5,60 \pm 0,19$
Mn	1760 ± 60	1656 ± 41	54 ± 3	$54,9 \pm 1,5$
Mo	2*	$0,73 \pm 0,02$	$0,094 \pm 0,013$	$0,089 \pm 0,007$
Ni	40*	$40,3 \pm 0,8$	$0,91 \pm 0,12$	$1,00 \pm 0,01$
Pb	$63,8 \pm 3,2$	$62,9 \pm 0,6$	$0,470 \pm 0,024$	$0,450 \pm 0,014$
V	6*	$5,10 \pm 0,55$	$0,26 \pm 0,03$	$0,230 \pm 0,007$
Zn	313 ± 8	291 ± 10	$12,5 \pm 0,3$	$12,3 \pm 0,4$

* Valor informado.

Analisando os resultados apresentados na Tab. 21 para a decomposição por MW-UV-AD do CRM BCR 060 (*Aquatic plant*) com HNO_3 2 mol l^{-1} , observou-se boa concordância entre 93 e 105% entre os valores certificados e os valores determinados, para os analitos Cd, Cu, Mn, Pb e Zn. Para o As a concordância foi de 78% o que pode ser atribuído a esse valor ser apenas informado. Para Cr, Ni e V as concordâncias foram de 106, 101 e 85%, respectivamente, quando comparado o

valor informado com o valor determinado. Para o Mo a concordância entre o valor informado e o valor determinado foi de 37%. Os RSDs para estas determinações foram de 1 a 9% para todos os analitos, com exceção para V em que o RSD da medida foi de 11%.

Na decomposição por MW-UV-AD do CRM NIST 1515 (*Apple leaves*) com HNO_3 2 mol l^{-1} , conforme resultados da Tab. 21, houve concordância entre 95 e 110% entre os valores certificados e os valores determinados para os analitos Cd, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb e Zn. Também verificou-se concordância de 100% entre o valor informado e o valor determinado para o Cr. Para o V a concordância entre o valor certificado e o valor determinado foi de 88%. Contudo, o As não foi possível de ser determinado no CRM, por ter ficado abaixo do limite de detecção do método. Os RSDs para estas medidas foram de 1 a 8% para todos os analitos.

Quando realizada a análise estatística dos resultados determinados nos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) com os valores certificados e informados (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$) observou-se que não houve diferença significativa para todos os analitos, com exceção para Mo, V e Zn que apresentaram diferença significativa no CRM BCR 060 (*Aquatic plant*).

Desta forma, foi comprovada a exatidão do método de decomposição MW-UV-AD utilizando HNO_3 2 mol l^{-1} , sendo assim aplicado para as demais amostras de algas avaliadas neste trabalho, conforme será apresentado no item 4.7 (*Resultados e Discussão*).

4.5.2 Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta com solução diluída de HNO_3 e H_2O_2

A decomposição foi realizada utilizando soluções de HNO_3 nas concentrações de 0,5 e 1 mol l^{-1} devido a baixa eficiência de decomposição quando estas soluções foram aplicadas no preparo da amostra empregando como reagente oxidante apenas o HNO_3 diluído com a lâmpada UV assistida por radiação micro-ondas, conforme estudo do item 4.5.1 (*Resultados e Discussão*). A avaliação da influência do H_2O_2 30% como reagente oxidante, que pode auxiliar na decomposição das amostras, foi feita pela utilização de 1 ml de H_2O_2 para a solução de HNO_3 0,5 mol l^{-1} e de 1 ml e de 4 ml de H_2O_2 para a solução de HNO_3 1 mol l^{-1} .

Quando a solução de HNO_3 $0,5 \text{ mol l}^{-1}$ foi utilizada com 1 ml de H_2O_2 a decomposição aparentemente não foi eficiente, pois apresentou um digerido com aspecto amarelo com presença de material particulado em suspensão. Nestes digeridos foi feita a determinação do RCC que comprovou que a decomposição não foi eficiente, com o RCC de $24 \pm 1,7\%$. Além disso, foi determinado a acidez residual que foi de $22 \pm 0,9\%$. Para determinar os metais nos digeridos por ICP-MS foi preciso centrifugar as soluções, para evitar que o material particulado chegasse ao nebulizador do equipamento, podendo causar entupimento e também efeito de memória para alguns analitos (EVANS; GIGLIO, 1993; ANTES et al., 2011).

Quando a decomposição da amostra foi realizada com HNO_3 1 mol l^{-1} e com 1 ml de H_2O_2 o digerido final no frasco reacional apresentou aspecto límpido, com valor de RCC de $2,9 \pm 0,5\%$. Este aumento na eficiência de decomposição utilizando HNO_3 1 mol l^{-1} pode ser justificado pela ação catalítica proporcionada pela radiação UV ao entrar em contato com o H_2O_2 formando assim, espécies reativas que contribuem para a oxidação da matéria orgânica. Nos mesmos digeridos, foi determinada a acidez residual onde verificou-se um aumento da acidez ($26 \pm 2\%$) quando comparada com a acidez do digerido após digestão com HNO_3 1 mol l^{-1} e 0,5 ml de H_2O_2 , esse fato pode estar relacionado a decomposição do H_2O_2 que leva a liberação de O_2 na fase gasosa que vem a participar do mecanismo de regeneração do HNO_3 , conforme mostrado pelas equações no item 2.4.1.3 (*Revisão Bibliográfica*). Cabe ressaltar então, que o H_2O_2 além da ação oxidante, pode ser utilizado como fonte alternativa de O_2 .

Quando a solução de HNO_3 1 mol l^{-1} foi utilizada juntamente com 4 ml de H_2O_2 , foi observada uma decomposição mais eficiente da amostra em um dos frascos reacionais. Contudo, para os outros dois frascos ocorreu a decomposição dos discos de PTFE posicionados na parte superior da lâmpada de UV, provavelmente devido a um pequeno depósito de amostra que ficou entre o disco e a antena da lâmpada. Este resíduo pode ter ocasionado uma reação brusca da amostra, provocando a deterioração do disco. Cabe destacar que a temperatura máxima atingida pelo sistema foi de 198°C e a pressão final foi de 80 bar, em nenhum momento foi ultrapassada as condições máximas permitidas pelo fabricante do equipamento. Conforme dados da literatura, temperaturas menores que 240°C são consideradas desprezíveis para materiais de PTFE, não ocasionando deformações ao material (NOGUEIRA et al., 2010). Na Fig. 12 pode ser observado

(a) e (b) o aspecto do disco de PTFE no interior do frasco reacional, (c) a amostra depositada entre o disco de PTFE e a antena da lâmpada, vista superior do disco de PTFE (d) danificado e do disco de PTFE (e) sem danos. É importante ressaltar que não foi observado nenhuma deterioração da lâmpada de emissão de radiação UV.

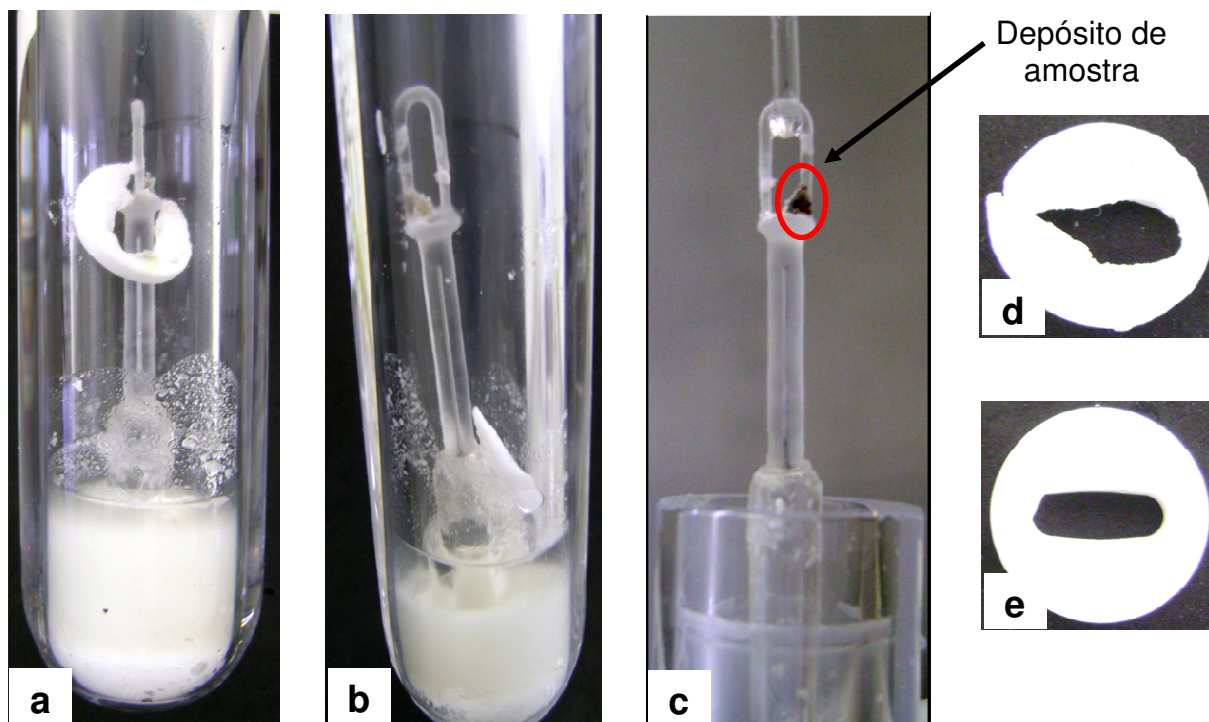


Figura 12 - (a) e (b) Decomposição do disco de PTFE no interior do frasco reacional, (c) amostra depositada entre o disco de PTFE e a antena da lâmpada de emissão de radiação UV, vista superior do disco de PTFE (d) danificado e (e) sem danos.

Após o incidente, o procedimento foi novamente repetido tomando o cuidado para que não ficasse amostra depositada no bulbo da lâmpada de UV. Desta forma, foi avaliada a solução de HNO_3 1 mol l^{-1} com 4 ml de H_2O_2 , nesta condição o digerido apresentou um aspecto límpido e a eficiência da decomposição pode ser comprovada pelo valor de RCC de $1,1 \pm 0,02\%$ (m/m). Nos mesmos digeridos foi determinada a acidez residual que teve como resultado um aumento da acidez o que é um indicativo do mecanismo de regeneração do ácido, acidez de $27 \pm 1,8\%$ (m/v).

O aspecto dos digeridos obtidos após a decomposição por MW-UV-AD da alga *Desmarestia anceps* utilizando HNO_3 nas concentrações de 0,5 e 1 mol l^{-1} e o reagente auxiliar H_2O_2 1 e 4 ml podem ser observados na Fig. 13.

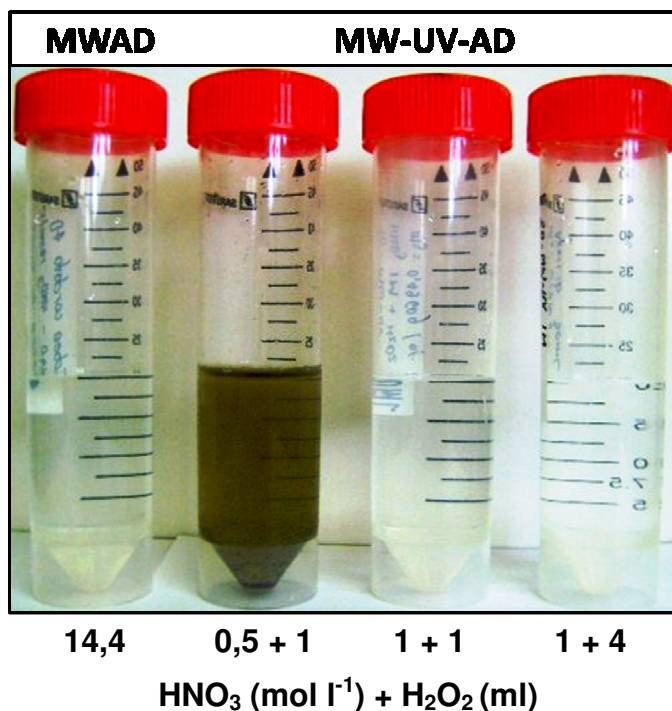


Figura 13 - Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga *Desmarestia anceps* com HNO_3 conc. por MWAD e com soluções de HNO_3 0,5 e 1 mol l^{-1} , H_2O_2 1 e 4 ml e com a lâmpada de emissão de radiação UV.

Comparando o aspecto dos digeridos após decomposição por MW-UV-AD utilizando somente HNO_3 1 mol l^{-1} com o digerido utilizando HNO_3 1 mol l^{-1} e o H_2O_2 fica evidente a ação do H_2O_2 como agente oxidante da matéria orgânica, devido a sua degradação no meio reacional, liberando espécies reativas que contribuem para a decomposição da amostra além de servir como fonte alternativa para a formação de O_2 que reage com NO regenerando o HNO_3 . O aspecto dos digeridos após decomposição por MW-UV-AD (a) apenas com HNO_3 1 mol l^{-1} e (b) com HNO_3 1 mol l^{-1} + H_2O_2 1 ml podem ser observados na Fig. 14.

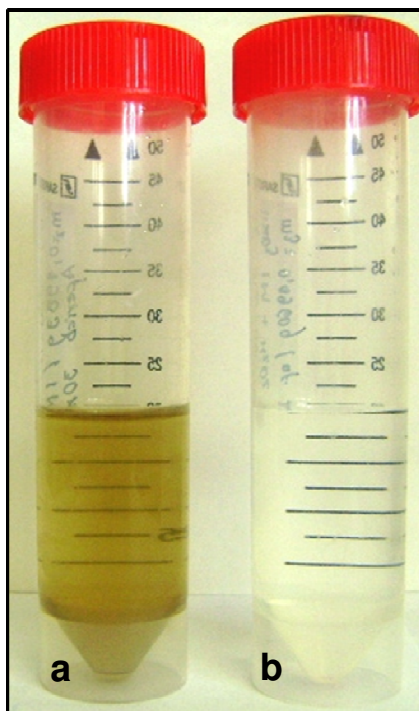


Figura 14 - Aspecto dos digeridos após a decomposição por MW-UV-AD da alga *Desmarestia anceps* (a) somente com solução de HNO_3 1 mol l^{-1} e (b) com HNO_3 1 mol l^{-1} + H_2O_2 1 ml.

Os resultados obtidos por ICP-MS após a otimização do procedimento de preparo de amostra utilizando HNO_3 diluído nas concentrações de 0,5 e 1 mol l^{-1} , H_2O_2 nos volumes de 1 e 4 ml e a lâmpada de emissão de radiação UV assistida por radiação micro-ondas e os resultados após decomposição por MWAD com HNO_3 conc. utilizado como referência nesta avaliação, são apresentados na Tab. 22.

Tabela 22 - Determinação de metais na alga *Desmarestia anceps* por ICP-MS, após decomposição com HNO₃ conc. e com HNO₃ 0,5 e 1 mol l⁻¹, H₂O₂ 1 e 4 ml com lâmpada de emissão de radiação UV assistida por radiação micro-ondas, (µg g⁻¹, n=3).

Analito	MWAD	MW-UV-AD		
	HNO ₃	HNO ₃ 0,5 mol l ⁻¹	HNO ₃ 1 mol l ⁻¹	HNO ₃ 1 mol l ⁻¹
	14,4 mol l ⁻¹	+ 1 ml H ₂ O ₂	+ 1 ml H ₂ O ₂	+ 4 ml H ₂ O ₂
As	28,0 ± 0,6	28,0 ± 0,9	31,0 ± 0,2	30,0 ± 0,7
Cd	0,58 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,57 ± 0,02	0,54 ± 0,03
Cr	4,30 ± 0,30	0,84 ± 0,20	3,70 ± 0,20	3,20 ± 0,10
Cu	5,30 ± 0,40	2,90 ± 0,60	5,70 ± 0,20	5,40 ± 0,01
Mn	15,0 ± 0,4	7,90 ± 0,30	11,0 ± 0,4	12,0 ± 0,1
Mo	0,41 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Ni	27,0 ± 0,8	15,0 ± 2,5	28,0 ± 0,3	26,0 ± 0,7
Pb	0,43 ± 0,02	0,09 ± 0,04	0,55 ± 0,04	0,47 ± 0,04
V	3,00 ± 0,10	2,20 ± 0,25	3,40 ± 0,12	2,90 ± 0,12
Zn	26,0 ± 1,7	22,0 ± 1,2	28,0 ± 2,1	25,0 ± 1,2

Analisando os resultados mostrados na Tab. 22 determinados por ICP-MS após a decomposição por MW-UV-AD com HNO₃ nas concentrações de 0,5 e 1 mol l⁻¹ e H₂O₂ nos volumes de 1 e 4 ml pode-se verificar, comparando com os resultados de referência obtidos após preparo da amostra por MWAD com HNO₃ conc., que na condição em que foi utilizado HNO₃ 0,5 mol l⁻¹ com H₂O₂ 1ml a decomposição não foi totalmente eficiente e, por isso, as concordâncias não foram satisfatórias para alguns analitos como Cr e Pb, que foram de 20 e 21%, respectivamente. Para os analitos Cu, Mn, Mo, Ni e V as concordâncias foram entre 53 e 76% quando comparadas com os resultados obtidos após decomposição por MWAD. Para os analitos As, Cd e Zn as concordâncias foram entre 85 e 100% quando comparado aos resultados obtidos após digestão pelo método de referência. Quando utilizada a solução de HNO₃ 1 mol l⁻¹ e H₂O₂ 1 ml observou-se concordâncias entre 98 e 113% para os analitos As, Cd, Cu, Ni, Mo, V e Zn. Para os analitos Cr e Mn as concordâncias com os valores obtidos por MWAD foram de 86 e 73%, respectivamente e para o Pb a concordância foi de 128%. Quando utilizada a

solução de HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 4 ml verificou-se concordâncias entre 90 e 109% para os analitos As, Cd, Cu, Mo, Ni, Pb, V e Zn quando comparado com as concentrações determinadas após digestão por MWAD com HNO_3 conc. Para os analitos Cr e Mn as concordâncias com os valores obtidos por MWAD foram 74 e 80%, respectivamente.

Os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS após decomposição por MW-UV-AD com HNO_3 0,5 mol l^{-1} e H_2O_2 1 ml foram entre 2 e 6% para As, Cd, Mn, Mo e Zn. Para os analitos Cr, Cu e Ni os RSDs das medidas foram entre 17 e 24%. Para o Pb o RSD da determinação foi de 44% e para V foi de 11%. Os elevados RSDs para estas determinações justificam-se pelo fato da decomposição da amostra não ter sido eficiente, o que acarretou em uma grande variação nas medidas dos analitos. Quando realizada a decomposição pelo método MW-UV-AD com HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 1 e 4 ml, os RSDs das determinações foram entre 0,2 e 9% para todos os analitos.

Os resultados após a decomposição por MW-UV-AD empregando HNO_3 e H_2O_2 , foram avaliados por análise estatística, utilizando como referência os resultados obtidos após o preparo por MWAD com HNO_3 conc., onde verificou-se que não houve diferença significativa, com nível de 95% de confiança (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$), para os analitos Cd e Zn para todas as condições de HNO_3 e H_2O_2 avaliadas e para o analito As não houve diferença significativa apenas na condição em que foi utilizada a solução de HNO_3 0,5 mol l^{-1} e H_2O_2 1ml. Para os analitos Cu, Mo, Ni e V não houve diferença significativa quando utilizado a solução de HNO_3 1 mol l^{-1} com H_2O_2 1 e 4 ml e para o Pb apenas quando foi utilizada a solução de HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 4 ml, utilizando como parâmetro de referência a decomposição por MWAD com HNO_3 conc. Para os analitos Cr e Mn houve diferença significativa para todas as condições de HNO_3 e H_2O_2 avaliadas quando comparado aos resultados obtidos após digestão pelo método de referência.

Conforme pode ser observado em alguns trabalhos na literatura, o HNO_3 normalmente é utilizado em associação com o H_2O_2 (ARAÚJO, et al., 2002; FARÍAS, et al., 2002; MOREDA-PIÑEIRO et al., 2012) devido a sua forte ação oxidante sobre a matéria orgânica da amostra, além de servir como fonte alternativa de O_2 que participa da regeneração do ácido aumentando a eficiência de decomposição do ácido (BIZZU, 2012). Além disso, segundo o autor Limbeck (2006), com a adição do H_2O_2 , os teores de carbono são reduzidos significativamente nas soluções após

decomposição, devido a formação de espécies reativas de O_2 . Isso vem a justificar a eficiente decomposição de 500 mg da amostra de alga *Desmarestia anceps* obtida utilizando HNO_3 1 mol l^{-1} junto com H_2O_2 1 ml e com a radiação UV assistida pela radiação micro-ondas, quando comparada com a decomposição por MW-UV-AD utilizando somente o HNO_3 1 mol l^{-1} .

4.6 Brancos analíticos e limites de detecção

Uma das dificuldades de se determinar baixas concentrações de diversos analitos geralmente está associada com os elevados valores encontrados para os brancos, que podem ocorrer devido a utilização de reagentes com baixo grau de pureza, qualidade dos materiais e equipamentos utilizados na etapa de preparo da amostra e também a forma de descontaminação desses materiais. Além disso, outro fator responsável por elevados valores de brancos é a contaminação pelo ar (KRUG; SANTOS JÚNIOR, 2010).

Tendo em vista que os reagentes utilizados nos procedimentos de preparo das amostras foram HNO_3 concentrado e diluído que foi previamente bidestilado e H_2O_2 , os baixos valores de branco para os elementos investigados atestam a boa qualidade dos reagentes utilizados durante a etapa de decomposição das amostras. Os valores dos brancos para o procedimento de decomposição utilizado como referência MWAD conc., para o procedimento de decomposição MW- O_2 -AD na condição de HNO_3 3 mol l^{-1} e para o procedimento MW-UV-AD na condição de HNO_3 2 mol l^{-1} e na condição de HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 1 ml podem ser observados na Tab. 23.

Tabela 23 - Determinação dos brancos analíticos por ICP-MS após os procedimentos de decomposição por MWAD, MW-O₂-AD, MW-UV-AD somente com HNO₃ e com HNO₃ e H₂O₂, (µg l⁻¹).

Analito	MWAD	MW-O ₂ -AD	MW-UV-AD HNO ₃	MW-UV-AD HNO ₃ + H ₂ O ₂
As	< 0,043	0,030	0,090	0,190
Cd	0,010	0,020	< 0,037	< 0,450
Cr	< 0,099	< 0,185	0,180	0,250
Cu	2,20	0,50	0,64	0,77
Mn	0,03	0,01	0,07	0,19
Mo	0,003	0,010	0,030	0,020
Ni	0,36	0,14	0,23	0,37
Pb	0,11	0,01	0,02	0,02
V	< 0,283	0,040	0,170	0,150
Zn	6,4	0,71	6,4	6,7

Conforme pode ser observado na Tab. 23, os valores para os brancos após o método de decomposição MWAD com ácido conc. foram praticamente desprezíveis para os analitos Cd, Mn e Mo. Os valores dos brancos para os analitos As, Cr e V ficaram abaixo do limite de detecção instrumental. O maior valor de branco foi para o Zn que pode ser ocasionado pela presença de contaminantes nos reagentes e até mesmo na água utilizada para lavar os materiais. Quando comparados os brancos obtidos após decomposição pelo método MW-O₂-AD com os brancos após decomposição pelo método de referência, verificou-se que ocorreu uma diminuição para quase todos os analitos, o que pode ser devido a menor concentração ácida utilizada, HNO₃ 3 mol l⁻¹. Neste caso o valor de branco para Zn foi extremamente menor quando comparado com o obtido após MWAD, o que pode ser um indicativo de uma possível contaminação durante o preparo da amostra, uma vez que, as fontes de Zn são comuns no laboratório.

No procedimento de decomposição MW-UV-AD utilizando como agente oxidante somente HNO₃ 2 mol l⁻¹ os valores para os brancos foram maiores para todos os analitos com exceção para Cd que ficou abaixo do limite de detecção instrumental, quando comparados com os brancos do método MW-O₂-AD 3 mol l⁻¹ e

pressão 5 bar de O_2 . Quando comparado ao método de decomposição MWAD com ácido conc. os brancos foram maiores para os analitos As, Cr, Mn, Mo e V para os demais analitos Cu, Ni e Pb os valores de brancos foram menores para o método MW-UV-AD. O esperado para o método MW-UV-AD é que os valores para os brancos fossem menores para todos os analitos, quando comparado com os outros dois métodos, uma vez que, o ácido utilizado como agente oxidante apresenta uma concentração menor, provavelmente isso não tenha acontecido porque os materiais usados no preparo por MW-UV-AD são mais difíceis de serem descontaminados quando comparados aos materiais usados nos métodos de preparo MWAD e MW- O_2 -AD.

No procedimento de decomposição MW-UV-AD utilizando HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 1 ml, os valores para os brancos foram maiores para os analitos As, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn, quando comparados aos valores para os brancos após decomposição por MW-UV-AD usando apenas HNO_3 2 mol l^{-1} . Esse aumento pode ser devido ao uso de H_2O_2 , em função da dificuldade de purificação deste reagente.

Quando comparado os valores para os brancos após decomposição pelo método MW-UV-AD utilizando HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 1 ml com os valores para os brancos após decomposição pelo método MWAD utilizando HNO_3 conc., verificou-se que os valores para os brancos foram maiores para todos os analitos, com exceção para o Cd que ficou abaixo do LOD instrumental e para Cu e Pb, o que pode ser mais uma evidência de uma possível contaminação pelo uso de H_2O_2 .

Os limites de detecção para cada método de decomposição MWAD com HNO_3 conc., MW- O_2 -AD com HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 , MW-UV-AD com HNO_3 2 mol l^{-1} e MW-UV-AD com HNO_3 1 mol l^{-1} e H_2O_2 1 ml, foram calculados em função da necessidade de diluição e massa utilizada na decomposição. Os LODs foram calculados segundo a fórmula: $LOD = [(desvio\ padrão\ para\ 10\ determina\ c\ o\ e\ s\ do\ branco) \times 3] + [(concentra\ c\ o\ do\ branco \times fator\ de\ dilui\ c\ o\ e\) \times (volume\ de\ aferi\ c\ o\ e\ o\ /menor\ massa\ de\ amostra)]$. Os limites de detecção obtidos por ICP-MS, após a decomposição das amostras por diferentes métodos de preparo são apresentados na Tab. 24.

Tabela 24 - Limites de detecção obtidos por ICP-MS após os métodos de preparo de amostra MWAD, MW-O₂-AD, MW-UV-AD somente com HNO₃ e MW-UV-AD com HNO₃ e H₂O₂, considerando 500 mg de amostra, (µg g⁻¹).

Analito	MWAD	MW-O ₂ -AD	MW-UV-AD HNO ₃	MW-UV-AD HNO ₃ + H ₂ O ₂
As	0,026	0,019	0,016	0,021
Cd	0,001	0,002	0,002	0,027
Cr	0,018	0,011	0,019	0,008
Cu	0,494	0,010	0,059	0,049
Mn	0,006	0,004	0,046	0,007
Mo	0,001	0,002	0,002	0,003
Ni	0,086	0,004	0,017	0,037
Pb	0,019	0,003	0,009	0,001
V	0,017	0,002	0,017	0,008
Zn	1,450	0,030	0,810	0,430

Como pode ser observado na Tab. 24, os LODs obtidos apresentaram valores distintos, baseados nos diferentes reagentes empregados para os métodos de decomposição da amostra. Para a grande maioria dos analitos, os melhores LODs foram alcançados nas determinações após decomposição por MW-O₂-AD.

4.7 Determinação de metais em algas por ICP-MS após a decomposição utilizando MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD

Os métodos desenvolvidos para a decomposição da alga *Desmarestia anceps* utilizando os sistemas MW-O₂-AD e MW-UV-AD foram empregados para a decomposição das algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crispa* e *Pyropia endiviifolia* para a posterior determinação de metais por ICP-MS. As condições utilizadas para a decomposição das algas foram soluções de HNO₃ 3 mol l⁻¹ com pressão de 5 bar de O₂ para o método MW-O₂-AD e HNO₃ 2 mol l⁻¹ para o método MW-UV-AD. Além disso, a decomposição destas algas também foi feita usando o sistema MWAD com HNO₃ concentrado, utilizado como parâmetro de

referência, por ser um método de decomposição consolidado na literatura para vários tipos de amostras.

Desta forma, foram determinados os metais As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn por ICP-MS nas algas e os resultados obtidos para cada espécie podem ser observados nas Tabs. 25, 26, 27 e 28. Além disso, foram determinados nestas algas o RCC para avaliar a eficiência da decomposição e a acidez residual nos digeridos para avaliar o consumo de ácido na decomposição da amostra.

Tabela 25 - Resultados obtidos para a concentração de metais na alga *Iridaea cordata* por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3).

Analito	MWAD	MW-O ₂ -AD	MW-UV-AD
As	11,0 $\pm$ 0,4	11,7 $\pm$ 0,6	11,0 $\pm$ 0,8
Cd	0,60 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,06
Cr	0,88 $\pm$ 0,08	0,92 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,08
Cu	3,00 $\pm$ 0,20	3,30 $\pm$ 0,05	3,10 $\pm$ 0,32
Mn	7,00 $\pm$ 0,10	6,70 $\pm$ 0,24	6,50 $\pm$ 0,52
Mo	0,200 $\pm$ 0,004	0,240 $\pm$ 0,013	0,230 $\pm$ 0,017
Ni	0,600 $\pm$ 0,010	0,620 $\pm$ 0,033	0,620 $\pm$ 0,020
Pb	0,100 $\pm$ 0,003	0,100 $\pm$ 0,003	0,110 $\pm$ 0,020
V	3,50 $\pm$ 0,10	3,20 $\pm$ 0,12	3,30 $\pm$ 0,29
Zn	28,0 $\pm$ 2,0	26,0 $\pm$ 1,4	25,0 $\pm$ 1,9

Analisando os resultados apresentados na Tab. 25 após preparo da alga *Iridaea cordata* pelo método MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂, comparando com o método MWAD com HNO₃ conc. utilizado como referência, foram observadas concordâncias entre 91 e 106% para os analitos As, Cr, Mn, Ni, Pb, V e Zn. Para os analitos Cd e Cu foi observado concordância de 110% com os valores obtidos por MWAD e para o Mo a concordância foi de 120%.

Ao compararmos os resultados após decomposição pelo método MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ com o método de referência MWAD com HNO₃ conc., verificou-

se concordâncias entre 93 e 108% para os analitos As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e V. Para os analitos Mo e Zn as concordâncias com os valores obtidos por MWAD foram de 115 e 89%, respectivamente.

Ainda com base nos resultados da Tab. 25 os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS após decomposição da alga *Iridaea cordata* pelos métodos MWAD com HNO₃ conc., MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ e MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ foram entre 1 e 10% para todos os analitos, exceto para o Pb em que o RSD da medida foi de 19% quando a decomposição da alga foi realizada pelo método MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹.

Quando realizado o estudo estatístico dos resultados obtidos por ICP-MS, após a decomposição da alga *Iridaea cordata*, pelos três métodos avaliados neste estudo, verificou-se que não houve diferença significativa, com 95% de nível de confiança (GraphPad InStat, Tukey) para todos os analitos, exceto para o Mo que tem diferença significativa quando comparado o resultado após MWAD com HNO₃ conc. com o resultado após preparo da amostra utilizando MW-O₂-AD.

Tabela 26 - Resultados obtidos para a concentração de metais na alga *Palmaria decipiens* por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD, (µg g⁻¹, n=3).

Analito	MWAD	MW-O ₂ -AD	MW-UV-AD
As	5,30 ± 0,13	5,70 ± 0,11	5,90 ± 0,10
Cd	0,31 ± 0,020	0,31 ± 0,020	0,310 ± 0,002
Cr	1,42 ± 0,05	1,40 ± 0,08	1,45 ± 0,06
Cu	1,210 ± 0,006	1,210 ± 0,008	1,210 ± 0,010
Mn	7,20 ± 0,01	7,30 ± 0,27	7,30 ± 0,14
Mo	0,340 ± 0,020	0,360 ± 0,030	0,360 ± 0,005
Ni	2,05 ± 0,07	2,11 ± 0,02	2,09 ± 0,05
Pb	0,330 ± 0,014	0,320 ± 0,007	0,300 ± 0,002
V	7,50 ± 0,06	7,20 ± 0,31	7,60 ± 0,30
Zn	20,0 ± 0,7	20,0 ± 0,1	20,0 ± 0,8

Com base nos valores apresentados na Tab. 26 após a aplicação do método de decomposição MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂, para a alga *Palmaria decipiens*, utilizando como parâmetro de referência os resultados obtidos após o procedimento de decomposição MWAD com HNO₃ conc., observou-se que para todos os analitos as concordâncias obtidas encontram-se entre 96 e 108%, sendo a menor concordância para o V e a maior concordância para o As.

Quando avaliada a concordância entre os métodos de preparo MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ e MWAD com HNO₃ conc. verificou-se que para todos os analitos as concordâncias foram entre 91 e 111%.

Os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS para a alga *Palmaria decipiens*, após decomposição utilizando os três métodos de preparo de amostra foram entre 0,1 e 8% para todos os analitos.

Quando realizada a análise estatística dos resultados obtidos após decomposição pelos três métodos de preparo de amostra, verificou-se que não houve diferença significativa, com 95% de nível de confiança (GraphPad InStat, Tukey) para todos os analitos, com exceção para o As que apresentou diferença significativa quando comparado o método de referência (MWAD) com os dois métodos propostos (MW-O₂-AD e MW-UV-AD) e para o Pb que apresentou diferença significativa quando comparado o método de referência (MWAD) com o método proposto (MW-UV-AD).

Tabela 27 - Resultados obtidos para a concentração de metais na alga *Prasiola crispera* por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3).

Analito	MWAD	MW-O ₂ -AD	MW-UV-AD
As	2,30 $\pm$ 0,07	1,90 $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,02
Cd	0,12 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,02
Cr	30,0 $\pm$ 1,6	28,0 $\pm$ 1,2	15,0 $\pm$ 1,0
Cu	40,0 $\pm$ 1,6	37,0 $\pm$ 1,2	34,0 $\pm$ 1,0
Mn	202 $\pm$ 18	198 $\pm$ 4	171 $\pm$ 4
Mo	0,63 $\pm$ 0,04	0,32 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,02
Ni	2,90 $\pm$ 0,10	2,60 $\pm$ 0,07	2,40 $\pm$ 0,07
Pb	1,30 $\pm$ 0,13	1,10 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,04
V	24,0 $\pm$ 1,4	19,0 $\pm$ 1,0	6,20 $\pm$ 0,40
Zn	51,0 $\pm$ 2,2	41,0 $\pm$ 0,8	35,0 $\pm$ 2,5

Com base nos valores apresentados na Tab. 27 após a decomposição pelos métodos MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ e MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ para a alga *Prasiola crispera*, utilizando como parâmetro de referência os resultados obtidos após o procedimento de decomposição MWAD com HNO₃ conc., foi possível observar que para alguns analitos ocorreu uma variação entre os resultados, provavelmente isso tenha ocorrido pelo excesso de material particulado que ficou no digerido ao final da decomposição. O aspecto dos digeridos obtidos após a decomposição por MWAD com HNO₃ conc. e MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ da alga *Prasiola crispera* podem ser observados na Fig. 15.

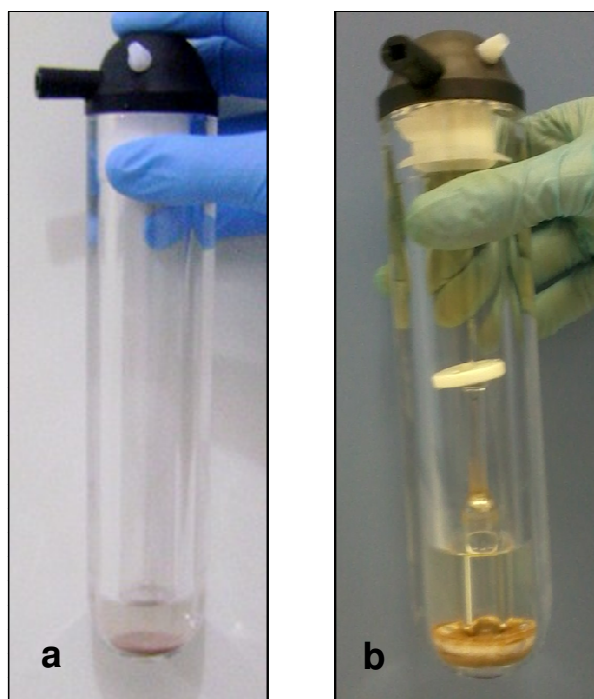


Figura 15 - Aspecto dos digeridos após a decomposição da alga *Prasiola crispa* pelo método (a) MWAD com solução de HNO_3 conc. e pelo método (b) MW-UV-AD com solução de HNO_3 2 mol l^{-1} .

Quando avaliada a concordância entre os resultados obtidos pelos métodos de preparo MW- O_2 -AD com HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 e MWAD com HNO_3 conc. utilizado como referência, verificou-se que ficaram entre 79 e 85% para os analitos As, Pb, V e Zn e para o Mo a concordância foi de 51%. Para os analitos Cd, Cr, Cu, Ni e Mn as concordâncias foram de 117, 93, 93, 90 e 98%, respectivamente, quando comparadas com os resultados obtidos após o preparo de amostra por MWAD com HNO_3 conc.

Ainda com base nos resultados da Tab. 27, foi possível verificar que quando comparado os resultados após decomposição da amostra pelo método MW-UV-AD com HNO_3 2 mol l^{-1} com os resultados após preparo de amostra por MWAD com HNO_3 conc., concordâncias entre 50 e 69% foram obtidas para os analitos As, Cr, Pb e Zn e para o Cd a concordância foi de 108%. Para os analitos Cu e Mn a concordância foi de 85% e para o Ni foi de 83% com os valores obtidos após preparo por MWAD. Para os analitos Mo e V as concordâncias não foram satisfatórias, sendo essas de 10 e 26%, respectivamente, quando comparadas aos resultados após decomposição pelo método de referência.

Os RSDs encontrados nas determinações por ICP-MS para a alga *Prasiola crispa*, após decomposição pelos métodos MWAD com HNO₃ conc., MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ e MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ foram entre 0,5 e 10% para todos os analitos, exceto para o Cd e Mo em que os RSDs das medidas foram de 15 e 33%, respectivamente, quando utilizado o método de preparo MW-UV-AD. Além disso, os resultados obtidos após decomposição pelos métodos de preparo de amostra MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD não apresentaram diferença significativa, com 95% de nível de confiança (GraphPad InStat, Tukey) para Cd quando comparado o método de referência com os outros dois métodos avaliados. Para os analitos As, Mo, Ni, Pb, V e Zn houve diferença significativa quando comparado o método de referência (MWAD) com os outros dois métodos (MW-O₂-AD e MW-UV-AD), os analitos Cr, Cu e Mn apresentaram diferença significativa quando comparado o método de referência (MWAD) com o método proposto (MW-UV-AD).

Com base nas determinações dos metais e nos RSDs das medidas verificou-se maior variação nos resultados obtidos quando utilizado o método de decomposição por MW-UV-AD comparado com o método de referência. Essa variação dos resultados para alguns analitos, pode ser pelo fato da decomposição não ter sido satisfatória, conforme pode ser visto na Fig. 15. Neste caso, por se tratar de uma matriz mais complexa, quando comparada as demais algas analisadas neste estudo, o método MW-UV-AD utilizando solução de HNO₃ 2 mol l⁻¹ não foi apropriado para a decomposição da alga *Prasiola crispa*, desta forma, faz-se necessário mais estudos para a decomposição desta alga. Ainda cabe destacar, que para o método MW-O₂-AD utilizando solução de HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ os resultados foram satisfatórios apenas para alguns analitos, neste caso, também faz-se necessário mais estudos a respeito do método de preparo para essa alga.

Assim, tendo em vista a presença de uma quantidade bastante significativa de material particulado nos digeridos, é importante realizar um estudo com a utilização de uma mistura de ácidos (HNO₃ conc. e HF) para o método MWAD, pelo fato do HF ter a capacidade de aumentar a solubilidade e a estabilidade de alguns elementos como o silício, assim possibilitando verificar se a determinação de alguns analitos não foi alterada pela presença da matriz da amostra.

Tabela 28 - Resultados obtidos para a concentração de metais na alga *Pyropia endiviifolia* por ICP-MS após os procedimentos de decomposição MWAD, MW-O₂-AD e MW-UV-AD, ($\mu\text{g g}^{-1}$, n=3).

Analito	MWAD	MW-O ₂ -AD	MW-UV-AD
As	26,0 $\pm$ 0,7	26,0 $\pm$ 0,8	26,0 $\pm$ 0,5
Cd	3,81 $\pm$ 0,17	3,49 $\pm$ 0,03	3,46 $\pm$ 0,08
Cr	1,35 $\pm$ 0,01	1,37 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,01
Cu	1,510 $\pm$ 0,007	1,510 $\pm$ 0,002	1,520 $\pm$ 0,001
Mn	35,0 $\pm$ 1,0	37,0 $\pm$ 0,2	37,0 $\pm$ 0,3
Mo	1,07 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,05
Ni	2,13 $\pm$ 0,02	2,11 $\pm$ 0,09	2,11 $\pm$ 0,03
Pb	0,240 $\pm$ 0,015	0,220 $\pm$ 0,028	0,230 $\pm$ 0,010
V	3,00 $\pm$ 0,01	3,10 $\pm$ 0,14	3,10 $\pm$ 0,01
Zn	34,0 $\pm$ 0,8	34,0 $\pm$ 0,4	34,0 $\pm$ 0,4

Analisando os resultados mostrados na Tab. 28, após decomposição pelo método MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ e pelo método MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹, ambos comparados com os resultados após decomposição pelo método MWAD com HNO₃ conc., para a alga *Pyropia endiviifolia*, verificou-se concordâncias entre 91 e 106% para todos os analitos estudados. Além disso, os RSDs das medidas foram entre 0,1 e 10% para os resultados após decomposição pelos três métodos avaliados, exceção apenas para o Pb em que o RSD da determinação foi de 13%, quando realizada a decomposição pelo método MW-O₂-AD.

Quando realizada a análise estatística (GraphPad InStat, Tukey) dos resultados para a alga *Pyropia endiviifolia* após decomposição pelos métodos MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ e MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹ comparados ao método de referência MWAD com HNO₃ 14,4 mol l⁻¹, verificou-se que não houve diferença significativa para todos os analitos, com exceção para o Cd e Mn que apresentaram diferença significativa quando comparados o método MWAD com os métodos MW-O₂-AD e MW-UV-AD.

Para avaliar a eficiência da decomposição dos métodos MWAD com HNO_3 conc., MW- O_2 -AD com HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 e MW-UV-AD com HNO_3 2 mol l^{-1} para as algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crispa* e *Pyropia endiviifolia*, foram determinados nos digeridos o teor de carbono residual remanescente na solução, onde foi possível verificar que para todas as algas o menor teor de RCC foi obtido quando utilizado no procedimento de decomposição HNO_3 conc., (entre 0,68 e 1,20%), seguida pela decomposição com ácido diluído e com sistema pressurizado (entre 1,7 e 7,0%) e por último a decomposição com ácido diluído e lâmpada de UV (entre 3,0 e 9,4%).

Como pode ser observado na Fig. 16, quando utilizado o procedimento MW-UV-AD para a alga *Pyropia endiviifolia* o RCC nos digeridos foi maior quando comparado aos RCC nos digeridos das algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata* e *Palmaria decipiens*, mas foi inferior a 10%, sendo que esse teor não ocasionou interferências significativas nas determinações, portanto o método proposto MW-UV-AD foi satisfatório para a decomposição da alga *Pyropia endiviifolia*.

Quando determinada a acidez residual nos digeridos das algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crispa* e *Pyropia endiviifolia* para o procedimento feito com ácido concentrado, foi observado que o menor teor de ácido residual foi de $71,1 \pm 0,8\%$ na alga *Pyropia endiviifolia*. Para o procedimento que utilizou solução de HNO_3 3 mol l^{-1} e 5 bar de O_2 , o menor teor de acidez residual foi de $62,0 \pm 0,6\%$ na alga *Pyropia endiviifolia*. Para o procedimento realizado com solução de HNO_3 2 mol l^{-1} e com a lâmpada de emissão UV, pode-se observar que o menor teor de acidez residual foi de $38,0 \pm 0,2\%$ também para a alga *Pyropia endiviifolia*.

Na Fig. 16 pode ser observada uma comparação dos resultados obtidos para o RCC e acidez residual para as algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crispa* e *Pyropia endiviifolia* após a decomposição por MWAD, MW- O_2 -AD e MW-UV-AD, bem como para alga *Desmarestia anceps* utilizada no desenvolvimento dos métodos para obter as melhores condições de decomposição.

Cabe destacar que para a alga *Desmarestia anceps* o RCC foi menor quando determinado no digerido após decomposição por MW-UV-AD quando comparado com o RCC determinado no digerido após decomposição por MW- O_2 -AD, conforme pode ser observado na Fig. 16.

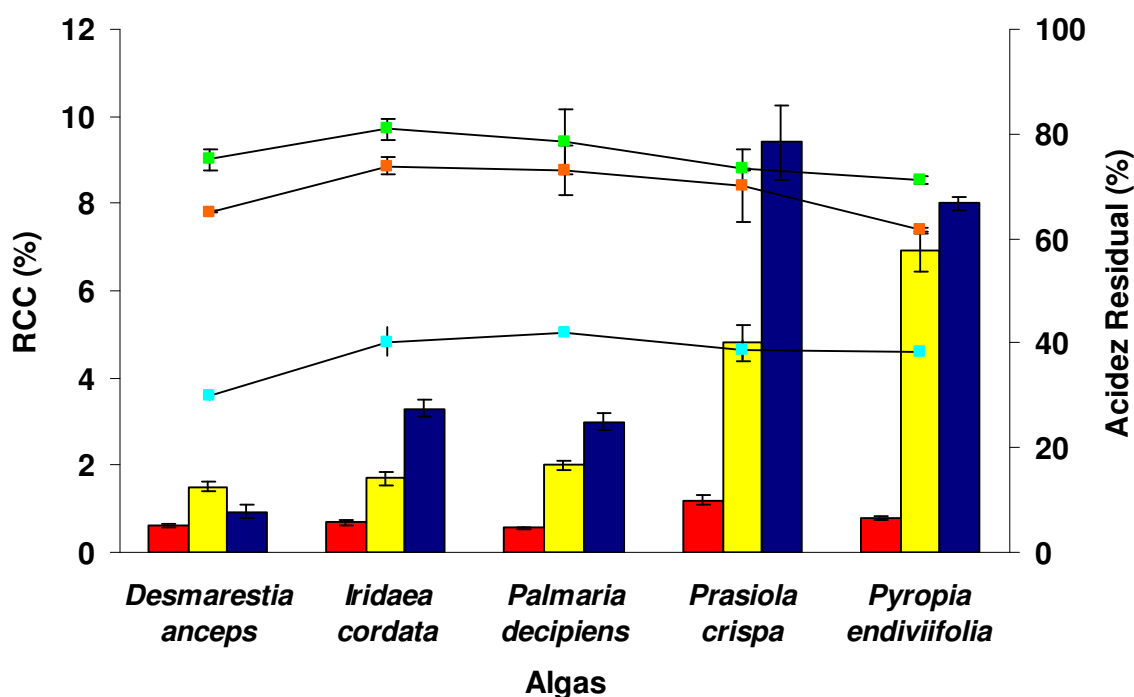


Figura 16 - Teores de carbono para as soluções obtidas após decomposição de 500 mg das algas por ■ MWAD, ■ MW-O₂-AD e ■ MW-UV-AD. Acidez residual após decomposição das algas por ■ MWAD, ■ MW-O₂-AD e ■ MW-UV-AD.

4.8 Comparação entre os diferentes procedimentos de preparo de amostras avaliados

Dentre as características dos procedimentos de preparo de amostra consideradas mais importante, podem ser citadas a massa de amostra e a concentração de ácido utilizado na etapa de decomposição da amostra, pois quanto menor a quantidade de reagente menor o risco de contaminação e, portanto menores valores para o branco analítico, favorecendo assim menores limites de detecção, além de menor geração de efluentes, o que vem a estar de acordo com os aspectos preconizados pela química verde. Além disso, o emprego de ácidos concentrados na etapa de preparo da amostra implica na necessidade de sucessivas diluições na etapa de determinação por ICP-MS, devido ao fato da concentração do ácido vir a interferir na taxa de nebulização da amostra.

Em cada procedimento de preparo de amostra foram utilizadas soluções de HNO_3 em concentrações diferentes, isso de acordo com as características de cada método. Na decomposição por MWAD foi utilizado HNO_3 conc. e para os dois métodos desenvolvidos para a decomposição de algas foram utilizados HNO_3 diluído (MW- O_2 -AD e MW-UV-AD) onde foram decompostos cerca de 500 mg de amostra. A eficiência do método MW- O_2 -AD utilizando HNO_3 3 mol l^{-1} com 5 bar de O_2 e do método MW-UV-AD utilizando HNO_3 2 mol l^{-1} pode ser comprovada pelos resultados obtidos através da análise dos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*) e por comparação com os resultados obtidos após decomposição por MWAD com HNO_3 conc. Para ambos os métodos desenvolvidos as concordâncias entre os valores certificados e os determinados foram superiores a 92% para todos os analitos. Quando comparado os resultados dos métodos desenvolvidos com o método utilizado como referência MWAD com HNO_3 conc. obteve-se concordâncias acima de 90% para quase todos os analitos. Cabe ressaltar que para a alga *Prasiola crispa* as concordâncias entre os métodos avaliados foram insatisfatórias para alguns analitos, sobretudo no método MW-UV-AD, provavelmente devido à presença de resíduos da amostra.

É importante destacar que não foi encontrado na literatura trabalhos que utilizem ácidos diluídos para a decomposição de algas, sempre é empregado ácidos concentrados individuais ou em então uma sequência de ácidos, além de utilizarem também H_2O_2 associado a esses ácidos. Ademais, é relevante salientar que o método MW-UV-AD possibilitou utilizar uma concentração de ácido ainda menor que no método MW- O_2 -AD, obtendo-se uma decomposição satisfatória, provavelmente devido à ação catalítica da radiação UV ao entrar em contato com o HNO_3 e com o O_2 presente no interior do frasco reacional, que são espécies que possuem caráter oxidante que possibilitam a oxidação da matéria orgânica da amostra (BENDICHO et al., 2010).

Para ambos os métodos desenvolvidos para a decomposição de algas, foram obtidos valores para os brancos analíticos entre 0,003 e 6,7 $\mu\text{g l}^{-1}$, sendo o maior valor de branco encontrado para o Zn. Desta forma, quanto menores os valores de branco, menores são os LODs do método de determinação, sendo encontrado neste estudo LODs entre 0,001 e 1,45 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo o maior LOD para o Zn. Além disso, baixos teores de carbono residual foram encontrados nos digeridos, menor que 10%, neste caso, o maior RCC foi encontrado após digestão da alga *Prasiola crispa* pelo

método MW-UV-AD o que é mais uma evidência da decomposição da amostra não ter sido satisfatória.

4.9 Comparação dos valores obtidos neste estudo com os resultados relatados na literatura

Fazendo um paralelo entre as espécies de algas avaliadas neste estudo pode-se verificar que na alga *Desmarestia anceps* os metais essenciais Cu e Zn, que são elementos importantes para a atividade de várias enzimas, estão em concentração semelhante a da alga *Iridaea cordata*, numa faixa de concentração que variou de 3,0 a 6,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cu e de 25 a 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Zn, em peso seco de amostra. A alga *Prasiola crispa* apresentou concentrações bastante superiores dos metais Cu e Zn, quando comparadas as encontradas nas duas algas recentemente citadas, 39,5 e 51,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. As algas *Pyropia endiviifolia* e *Palmaria decipiens* apresentaram concentrações de Cu menores do que nas demais algas investigadas, numa faixa de 1,2 a 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ e para Zn a concentração foi em uma faixa de 20 a 34 $\mu\text{g g}^{-1}$ de forma semelhante ao encontrado nas algas *Desmarestia anceps* e *Iridaea cordata*. No trabalho de Moreno et al. (1997) foram encontradas concentrações inferiores as determinadas neste trabalho, sendo de 1,19 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e de 16,48 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Zn na alga *Desmarestia* sp. Para a alga *Iridaea* sp. os autores relatam concentrações de 0,91 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e de 5,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Zn. Um possível motivo para justificar essas diferenças entre as concentrações encontradas pelos autores e as concentrações determinadas neste trabalho seria que hoje as atividades humanas na Antártica são bem mais acentuadas do que na época em que foram coletadas as amostras (1987-1989). Cabe ressaltar, que mesmo tratando-se de elementos essenciais esses podem tornar-se tóxicos em concentrações mais elevadas (SUNDA; HUNTSMAN, 1998).

Ainda com relação aos metais essenciais vale mencionar que o Mn é um metal importante para a fotossíntese e para algumas enzimas, além disso, o mesmo participa do metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos. As concentrações de Mn nas algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* variaram entre 7 e 15 $\mu\text{g g}^{-1}$. Na alga *Prasiola crispa* a concentração de Mn foi elevada, numa faixa que variou de 171 a 202 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo esse resultado superior ao relatado por

Runcie e Riddle (2004) de $154 \mu\text{g g}^{-1}$ na mesma espécie, amostrada na localidade de Brown Bay e outras regiões da Antártica. Para a alga *Pyropia endiviifolia* as concentrações de Mn ficaram entre 35 e $37 \mu\text{g g}^{-1}$. Assim, pode-se verificar que mesmo as amostras analisadas neste trabalho sendo coletadas na mesma localidade (Demay) ocorreu uma variação de concentração dos metais essenciais avaliados entre as diferentes espécies de algas analisadas, o que pode ser justificado pelas diferenças estruturais existentes entre as espécies.

Para os elementos considerados tóxicos ao meio ambiente como As, Cd e Pb que são considerados metais não essenciais as atividades metabólicas, as concentrações de As foram bastante diferentes entre as espécies, as algas *Desmarestia anceps* e *Pyropia endiviifolia* apresentaram concentrações entre 26 e $30 \mu\text{g g}^{-1}$, *Iridaea cordata* concentração de $11 \mu\text{g g}^{-1}$ e as algas *Palmaria decipiens* e *Prasiola crista* concentrações entre 2,3 e $5,9 \mu\text{g g}^{-1}$ isso pode ser explicado pelo fato de espécies diferentes de algas terem afinidades diferentes pelos metais (AKCALI; KUCUKSEZGIN, 2011). Segundo o trabalho de Ryan, McLoughlin e O'Donovan (2012) maiores concentrações de As foram encontradas nas algas marrons, que neste trabalho foi confirmado pelas concentrações de As na alga *Desmarestia anceps* seguida por menores concentrações para as algas vermelhas que neste caso são as algas *Pyropia endiviifolia*, *Iridaea cordata* e *Palmaria decipiens* e para a alga verde *Prasiola crista*.

Quando comparado a concentração de As encontrado neste trabalho com trabalho realizado por Farías et al. (2007) observou-se para a alga *Desmarestia anceps* que os resultados foram bastante semelhantes, mas para as espécies *Iridaea cordata* e *Prasiola crista* foram diferentes, fato que pode ocorrer devido à época e local de coleta serem diferentes.

Para o Cd que tem grande potencial toxicológico sobre os organismos encontrados no meio ambiente, as concentrações foram bastante semelhantes entre as algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Prasiola crista*, entre 0,12 e $0,66 \mu\text{g g}^{-1}$. A maior concentração de Cd foi encontrada na alga *Pyropia endiviifolia* sendo essa de $3,8 \mu\text{g g}^{-1}$. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Farías et al. (2002) na região de Potter Cove na Antártica para as algas *Palmaria decipiens* ($0,24 \mu\text{g g}^{-1}$) e *Iridaea cordata* ($0,55 \mu\text{g g}^{-1}$). Para as algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Prasiola crista* resultados superiores foram encontrados por Runcie e Riddle (2004) numa concentração entre 1,4 e $8,0 \mu\text{g g}^{-1}$.

No trabalho de Moreno et al. (1997) concentrações de Cd semelhantes foram encontradas para os gêneros *Desmarestia* sp. e *Iridaea* sp., 0,36 e 0,06 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Quando avaliada a concentração de Pb, que é considerado um poluente antropogênico, entre as espécies de algas analisadas neste trabalho, verificou-se que para as algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Pyropia endiviifolia* as concentrações foram entre 0,10 e 0,44 $\mu\text{g g}^{-1}$. A maior concentração de Pb foi encontrada na alga *Prasiola crispa* que foi de 1,30 $\mu\text{g g}^{-1}$. No trabalho de Runcie, Townsend e Seen (2009) a concentração de Pb encontrada na alga *Iridaea cordata* foi entre 0,6 e 21,6 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Para o Cr que é considerado essencial na forma de Cr^{+3} e tóxico na forma de Cr^{+6} foi encontrado uma grande variação de concentração entre as algas analisadas, sendo que a mais elevada concentração de Cr total foi encontrada nas algas *Desmarestia anceps* e *Prasiola crispa* onde a concentração variou entre 28 e 31 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para as demais algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Pyropia endiviifolia* as concentrações de Cr total foram entre 0,88 e 1,45 $\mu\text{g g}^{-1}$. No trabalho de Runcie e Riddle (2004) foram encontradas concentrações de Cr de 1,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ na alga *Iridaea cordata*, de 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ para a alga *Palmaria decipiens* e de 13,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ para a alga *Prasiola crispa*.

Quando avaliada a concentração de Mo, metal importante para o metabolismo de algumas enzimas, nas diferentes espécies de algas, verificou-se que as concentrações foram entre 0,20 e 0,63 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Prasiola crispa*. A maior concentração de Mo foi encontrada na alga *Pyropia endiviifolia*, sendo essa de 1,11 $\mu\text{g g}^{-1}$. Segundo o relatado no trabalho de Farías et al. (2002), foi encontrado para a alga *Palmaria decipiens* uma concentração de 0,8 $\mu\text{g g}^{-1}$, para as algas *Desmarestia anceps* e *Iridaea cordata* as concentrações ficaram abaixo do LOD do método ($< 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$), sendo as determinações realizadas por ICP OES.

O Ni atua como cofator em algumas enzimas e, neste trabalho, foram encontradas concentrações mais expressivas na alga *Desmarestia anceps* (entre 25 e 27 $\mu\text{g g}^{-1}$) e para as demais algas *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crispa* e *Pyropia endiviifolia* as concentrações foram inferiores variando entre 0,60 e 2,88 $\mu\text{g g}^{-1}$. De acordo com relatos de outros autores, para as algas *Desmarestia menziesii*, *Desmarestia antarctica*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens* e *Prasiola*

crispa foram encontradas concentrações de Ni entre 1 e 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ (RUNCIE; RIDLLE, 2004). Ainda com base em outros dados da literatura foram encontrados concentrações de Ni entre 3,36 e 8,64 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata* e *Palmaria decipiens* (FARÍAS et al., 2002).

Quando realizada uma avaliação das concentrações de V nas diferentes espécies de algas estudadas, foi possível verificar que a maior concentração foi para a alga *Prasiola crispa*, entre 19 e 24 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para a alga *Palmaria decipiens* a concentração encontrada ficou entre 7,2 e 7,6 $\mu\text{g g}^{-1}$. Para as algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata* e *Pyropia endiviifolia* as concentrações foram entre 3,0 e 3,5 $\mu\text{g g}^{-1}$. Analisando dados da literatura, foi encontrado entre 3,4 e 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ para as algas *Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata* e *Palmaria decipiens* (FARÍAS, et al, 2002).

Desta forma, para melhor estimar as concentrações obtidas para cada um dos metais avaliados para as cinco algas, foi feita uma média entre os valores determinados para cada método de preparo de amostra avaliado neste trabalho. Com relação à média, ainda cabe destacar que, apenas os resultados que não apresentaram diferença significativa (GraphPad InStat, Tukey, $P > 0,05$) com pelo menos um dos métodos foram utilizados para esse cálculo, deste modo, os valores que não se mostraram concordantes não foram empregados. Os resultados obtidos a partir da média podem ser observados na Tab. 29.

Tabela 29 - Resultados dos valores médios determinados utilizando os métodos de preparo MWAD com HNO₃ conc., MW-O₂-AD com HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂ e MW-UV-AD com HNO₃ 2 mol l⁻¹, aplicados as 5 espécies de algas, (µg g⁻¹, n=3).

Analito	<i>Desmarestia anceps</i>	<i>Iridaea cordata</i>	<i>Palmaria decipiens</i>	<i>Prasiola crispa</i>	<i>Pyropia endiviifolia</i>
As	29,0 ± 0,8	11,2 ± 1,1	5,8 ± 0,2*	**	26,0 ± 1,2
Cd	0,60 ± 0,03	0,64 ± 0,09	0,30 ± 0,03	0,13 ± 0,02	3,48 ± 0,09*
Cr	3,30 ± 0,16*	0,91 ± 0,12	1,40 ± 0,11	29,0 ± 2,0*	1,31 ± 0,14
Cu	5,20 ± 0,46	3,10 ± 0,38	1,20 ± 0,01	39,0 ± 2,0*	1,51 ± 0,01
Mn	15,0 ± 0,89*	6,70 ± 0,58	7,30 ± 0,30	200 ± 18*	37,0 ± 0,4*
Mo	0,38 ± 0,04	0,20 ± 0,02*	0,40 ± 0,04	**	1,08 ± 0,11
Ni	26,7 ± 1,1	0,60 ± 0,04	2,10 ± 0,09	2,50 ± 0,10*	2,12 ± 0,10
Pb	0,43 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,30 ± 0,02*	**	0,23 ± 0,03
V	3,31 ± 0,21*	3,30 ± 0,33	7,40 ± 0,44	**	3,07 ± 0,14
Zn	27,0 ± 1,8	26,3 ± 3,1	20,0 ± 1,1	**	34,0 ± 1,0

* Resultados que apresentaram diferença significativa com um dos métodos.

** Média não foi estimada devido os resultados terem apresentado diferenças significativas com todos os métodos.

Ao ser realizada a estimativa das concentrações dos metais em cada alga, observa-se que para a alga *Desmarestia anceps* houve diferença significativa entre os resultados obtidos para Cr e V pelo método de referência e os obtidos pelos dois métodos desenvolvidos. No entanto, vale salientar que não houve diferença significativa entre as determinações dos dois métodos desenvolvidos, permitindo assim, a obtenção da concentração desses analitos na alga, uma vez que, ambos os métodos tiveram a sua exatidão avaliada pelo uso dos CRMs BCR 060 (*Aquatic plant*) e NIST 1515 (*Apple leaves*). Nesta mesma alga, também se observa que para o Mn houve diferença significativa entre os resultados obtidos pelo método de referência e o método desenvolvido MW-UV-AD.

Quando avaliada a média da concentração dos metais na alga *Iridaea cordata* verificou-se que houve diferença significativa somente para o Mo, entre os

resultados obtidos após o método de referência e o método desenvolvido MW-O₂-AD, em função do desvio padrão das medidas do método de referência ter sido bem menor quando comparado ao desvio padrão do método desenvolvido.

Ainda com base nos resultados da Tab. 29, é possível verificar que para a alga *Palmaria decipiens* houve diferença significativa para o As entre as medidas realizadas após o método de referência e os dois métodos desenvolvidos, mas não houve diferença significativa entre os resultados dos dois métodos desenvolvidos, permitindo assim avaliar a concentração desse analito na alga. Quando avaliado o Pb nessa alga, a diferença significativa ocorreu em função da grande variação dos desvios padrões das medidas, ocasionando assim uma diferença significativa entre os resultados do método de referência e o método MW-UV-AD, uma vez que, o desvio das medidas do método MW-UV-AD foi 7 vezes menor que o desvio do método de referência.

Quando realizada a análise da alga *Prasiola crispa* ocorreu uma diferença significativa para os analitos As, Mo, Pb, V e Zn entre as medidas obtidas após decomposição utilizando todos os métodos, provavelmente devido a decomposição insatisfatória. Cabe ressaltar que para o Pb ocorreu diferença significativa entre o método de referência e o método MW-O₂-AD, possivelmente, em função do desvio padrão da medida do método de referência ser 13 vezes maior que o desvio padrão do resultado do método proposto. Para os demais analitos sempre foi possível realizar a média das medidas das concentrações entre pelo menos dois métodos, sendo que para o Cr, Cu e Mn houve diferença significativa entre os resultados do método de referência e o método MW-UV-AD. Para o Ni houve diferença significativa entre as medidas obtidas pelo método de referência e os resultados obtidos pelos dois métodos desenvolvidos, mas não houve diferença significativa entre as medidas dos dois métodos desenvolvidos, permitindo assim sabermos a concentração desse analito na alga.

Por fim, a alga *Pyropia endiviifolia* apresentou diferença significativa para o Cd e Mn entre as medidas obtidas após o método de referência e as medidas após os métodos desenvolvidos, em função da grande diferença entre o desvio padrão da medida após MWAD quando comparada aos desvios padrões das determinações após MW-O₂-AD e MW-UV-AD. Assim a média das medidas desses analitos foi realizada, devido ao fato, dos dois métodos desenvolvidos não terem apresentado diferença significativa.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos neste trabalho foi possível concluir que a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas sob pressão de oxigênio (MW-O₂-AD) e a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MW-UV-AD), ambas em sistema fechado, foram eficientes para a decomposição das algas para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, V e Zn por ICP-MS. Cabe salientar, entretanto, que para a alga *Prasiola crisper* são necessários mais estudos sobre os três métodos de decomposição, uma vez que, as decomposições não foram satisfatórias para posterior determinação de alguns metais.

A decomposição das algas utilizando o método MW-O₂-AD com solução diluída de HNO₃ foram eficientes, provavelmente devido à capacidade de regeneração do HNO₃ na presença de O₂ como reagente, aumentando deste modo a ação oxidante do ácido. Assim, foi observado uma decomposição adequada de 500 mg de amostra, utilizando uma solução de HNO₃ 3 mol l⁻¹ e 5 bar de O₂. A exatidão do método foi avaliada pela decomposição de materiais de referência certificados, quando concordâncias satisfatórias (acima de 92%) foram obtidas para todos os analitos.

A decomposição por MW-UV-AD também foi satisfatória, onde foi verificado que utilizando solução de HNO₃ 2 mol l⁻¹ e lâmpada de UV, a decomposição de 500 mg de amostra foi considerada adequada, devido a interação da radiação UV com o HNO₃. A exatidão deste método foi comprovada pela decomposição de materiais de referência certificados, obtendo-se concordâncias superiores a 93% para a maioria dos analitos.

Para todas as espécies de algas avaliadas (*Desmarestia anceps*, *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Prasiola crisper* e *Pyropia endiviifolia*) pelos métodos MW-O₂-AD e MW-UV-AD foi determinado o teor de carbono residual como um dos parâmetros utilizados para avaliar a eficiência de decomposição dos métodos, sendo possível verificar baixas concentrações de RCC (menor que 10%) em todos os digeridos após decomposição pelos métodos desenvolvidos. Além disso, foi determinado o teor de acidez residual nos digeridos como forma de avaliar a quantidade de ácido consumida para decompor as amostras, sendo que a acidez residual nos digeridos variou entre 30 e 74%.

Cabe então destacar que ambos os métodos propostos estão de acordo com as tendências para os procedimentos de preparo de amostras, o que inclui a utilização de menores volumes de ácido concentrado, menor geração de resíduos, eficiência de decomposição e, portanto, ser adequado as técnicas de determinação.

Tendo em vista, as informações obtidas a respeito da concentração de metais nas algas procedentes da Antártica avaliadas neste trabalho, verificou-se que as algas *Desmarestia anceps* e *Pyropia endiviifolia* foram as que apresentaram maiores concentrações para a maioria dos metais determinados. Fato importante é que essas algas foram coletadas praticamente no mesmo ponto, 62°13'19.30"S e 58°26'36.59"W (*Desmarestia anceps*) e 62°13'21.01"S e 58°26'36.59"W (*Pyropia endiviifolia*). A concentração de metais na alga *Desmarestia anceps* variou de 0,38 a 30 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo a menor concentração determinada para o Mo e a maior concentração para o As. Na alga *Pyropia endiviifolia* a concentração de metais determinada variou de 0,22 a 26 $\mu\text{g g}^{-1}$, sendo o menor valor determinado para o Pb e o maior valor determinado para o As. Entretanto, faz-se necessário um estudo de um número maior de espécies e com mais pontos de amostragem para que seja feita uma avaliação de possíveis danos ambientais.

Por fim, é importante enfatizar que os métodos desenvolvidos podem ser utilizados para a decomposição de diferentes algas para posterior determinação de metais, e que as algas avaliadas neste trabalho podem ser empregadas como bioindicadores da contaminação ambiental da Antártica, servindo para monitorar a qualidade ambiental desta região.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tomando por base este estudo, vale ressaltar que, novos trabalhos podem ser desenvolvidos visando à determinação de Al e Hg, uma vez que, esses metais são considerados tóxicos aos seres vivos, logo, sua determinação permitiria uma avaliação mais adequada do nível de contaminação ambiental na Antártica. Além disso, é importante que sejam determinados os níveis de metais nas espécies de algas avaliadas no presente trabalho oriundas de diferentes localidades da Antártica, tendo em vista que, esse estudo permitiria uma investigação mais detalhada da ação antropogênica neste ambiente ainda considerado primitivo.

Com relação aos procedimentos de preparo de amostra utilizados neste trabalho, torna-se relevante a avaliação da possibilidade de aplicação dos mesmos para decompor outras espécies de algas.

Adicionalmente, seria interessante a aplicação do método de decomposição por combustão iniciada por micro-ondas para as mesmas espécies de algas avaliadas neste estudo, tentando utilizar as mesmas concentrações de ácido diluído como solução absorvedora.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKCALI, I.; KUCUKSEZGIN, F. A biomonitoring study: Heavy metals in macroalgae from eastern Aegean coastal areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 637-645, 2011.

ALGAEBASE. Disponível em: < <http://www.algaebase.org/search/species/> >. Acesso em: 07 set. 2012.

ALLAN, R. Introduction: Mining and metals in the environment. **Journal of Geochemical Exploration**. v. 58, p. 95-100, 1997.

ANASTASAKIS, K.; ROSS, A. B.; JONES, J. M. Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. **Fuel**, v. 90, p. 598-607, 2011.

ANTES, F. G.; MESKO, M. F.; BARIN, J. S.; MOREIRA, C. M.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Development of multi-elemental method for quality control of parenteral component solutions using ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 98, p. 144-149, 2011.

ANTON PAAR GmbH, Multiwave 3000[®], multiwave sample preparation system; Software version v1.27-Synt, Graz, Áustria, 2003.

ANTON PAAR. Product Information, Microwave-assisted UV digestion (MUV), Graz, Áustria, pp. 1-4. <http://www.anton-paar.com>, acessado em 03/04/2012 (a).

ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H.; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57 p. 2121-2132, 2002.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 497-511, 2008.

ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, p. 638-643, 1997.

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of health and human services public health service. **Toxicological Profile for Nickel**. Atlanta: ATSDR, 2005 (a).

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of health and human services public health service. **Toxicological Profile for Zinc**. Atlanta: ATSDR, 2005 (b).

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of health and human services public health service. **Toxicological Profile for Cadmium**. Atlanta: ATSDR, 2008 (a).

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of health and human services public health service. **Toxicological Profile for Chromium**. Atlanta: ATSDR, 2008 (b).

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of health and human services public health service. **Toxicological Profile for Manganese**. Atlanta: ATSDR, 2008 (c).

ATSDR - AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. U.S. Department of health and human services public health service. **Toxicological Profile for Vanadium**. Atlanta: ATSDR, 2009.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 212-226, 2008.

BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; KNAPP, G. Trends in sample preparation using combustion techniques. In: ARRUDA, M. A. Z. **Trends in Sample Preparation**. Nova Science Publishers, 2006. p. 53-82.

BECKER, S.; QUARTINO, M. L.; CAMPANA, G. L.; BUCOLO, P.; WIENCKE C.; BISCHOF K. Review - The biology of an Antarctic rhodophyte, *Palmaria decipiens*: recent advances. **Antarctic Science**, v. 23, n. 5, p. 419-430, 2011.

BENDICHO, C.; PENA, F.; COSTAS M.; GIL, S.; LAVILLA, I. Photochemistry-based sample treatments as greener approaches for trace-element analysis and speciation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, p.681-691, 2010.

BESADA, V.; ANDRADE, J. M.; SCHULTZE, F.; GONZÁLEZ, J. J. Heavy metals in edible seaweeds commercialized for human consumption. **Journal of Marine Systems**, v. 75, p. 305-313, 2009.

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

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; MÜLLER, E. I.; SCHMIDT, L.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid. **Talanta**, v. 83, p. 1324-1328, 2011(a).

BIZZI, C. A.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M. Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 66, p. 394-398, 2011(b).

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 193-196, 2011(c).

BIZZI, C. A. **Emprego de oxigênio e peróxido de hidrogênio como auxiliares na decomposição de amostras biológicas por via úmida assistida por radiação micro-ondas**. 2012. 144f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

BRITO, G. B.; SOUZA, T. L.; BRESSY, F. C. ; MOURA, C. W. N.; KORN, M. G. A. Levels and spatial distribution of trace elements in macroalgae species from the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2238-2244, 2012.

BROUWER, P. E. M. Decomposition in situ of the sublittoral Antarctic macroalga *Desmarestia anceps* Montagne. **Polar Biology**, v. 16, p. 129-137, 1996.

BROWN, R. J. C.; MILTON, M. J. T. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 266-274, 2005.

CASTRO, J. T.; SANTOS, E. C.; SANTOS, W. P. C.; COSTA, L. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. A critical evaluation of digestion procedures for

coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 1378-1382, 2009.

CONTI, M. E.; CECCHETTI, G. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. **Environmental Research**, v. 93, p. 99-112, 2003.

COSTA, L. M.; SILVA, F. V., GOUVEIA, S. T.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 56, p. 1981-1985, 2001.

COSTA, L. M.; FERREIRA, S. L. C.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Use of Factorial Design for Optimization of Microwave-Assisted Digestion of Lubricating Oil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1269-1274, 2005.

COSTA, L. M.; SANTOS, D. C. M. B.; HATJE, V.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. Focused-microwave-assisted acid digestion: Evaluation of losses of volatile elements in marine invertebrate samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 238-241, 2009.

COSTA, A. C. S.; KRUG, F. J.; OLIVEIRA, E.; NÓBREGA, J. A.; MATIAS, T. B. Decomposição e solubilização de sólidos inorgânicos. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1^a Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p. 141-183.

DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; MOREDA-PIÑEIRO A.; BERMEJO-BARRERA, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Application of ultrasound-assisted acid leaching procedures for major and trace elements determination in edible seaweed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 66, p. 937-942, 2005.

DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; MOREDA-PIÑEIRO A.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; BERMEJO-BARRERA, P. Evaluation of na in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. **Talanta**, v. 82, p. 1668-1673, 2010.

EVANS, E. H.; GIGLIO, J. J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry - A review. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 8, p. 1-18, 1993.

FAIRHEAD, V. A.; AMSLER, C. D.; MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. Lack of defense or phlorotannin induction by UV radiation or mesograzers in *Desmarestia anceps* and *D. menziesii* (Phaeophyceae). **Journal of Phycology**, v. 42, p. 1174-1183, 2006.

FARÍAS, S.; ARISNABARRETA, S. P.; VODOPIVEZ, C.; SMICHOWSKI P. Levels of essential and potentially toxic trace metals in Antarctic macro algae. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 2133-2140, 2002.

FARÍAS, S.; SMICHOWSKI, P.; VÉLEZ, D.; MONTORO, R.; CURTOSI, A.; VODOPIVEZ, C. Total and inorganic arsenic in Antarctic macroalgae. **Chemosphere** v. 69, p. 1017-1024, 2007.

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

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G.; Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels - a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 62, p. 1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M.; KRUG, F. J.; BARIN, J. S.; ARRUDA, M. A. Z. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p. 252-275.

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

FRASER, M. M.; BEAUCHEMIN, D. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, p. 1705-1731, 2000.

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

GONZALEZ, M. H.; SOUZA, G. B.; OLIVEIRA, R. V.; FORATO, L. A.; NÓBREGA, J. A.; NOGUEIRA, A. R. A. Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. **Talanta**, v. 79, p. 396-401, 2009.

GOSAVI, K.; SAMMUT, J.; GIFFORD, S.; JANKOWSKI, J. Macroalgal biomonitors of trace metal contamination in acid sulfate soil aquaculture ponds. **Science of the Total Environment**, v. 324, p. 25-39, 2004.

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

HE, M.; WANG, Z.; TANG, H. The chemical, toxicological and ecological studies in assessing the heavy metal pollution in Le An River, China. **Water Research**, v. 32, p. 510-518, 1998.

HERNÁNDEZ-CARMONA, G.; CARRILLO-DOMÍNGUEZ, S.; ARVIZU-HIGUERA, D. L.; RODRÍGUEZ-MONTESINOS, Y. E.; MURILLO-ÁLVAREZ, J. I.; MUÑOZ-OCHOA, M.; CASTILLO-DOMÍNGUEZ, R. M. Monthly variation in the chemical composition of *Eisenia arborea* J.E. Areschoug. **Journal of Applied Phycology**, v. 21, p. 607-616, 2009.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental. In: HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Espectrometria de Massas Atômicas**. 6ª Ed., Bookman, Porto Alegre, 2009. p. 295-316 (a).

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Princípios de Análise Instrumental. In: HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Espectrometria de Emissão Atômica**. 6ª Ed., Bookman, Porto Alegre, 2009. p. 268-294 (b).

HORTA, P. A.; LAUDARES-SILVA, R.; RÖRIG, L.; DONANGELO, A.; BURGOS, D. C. Sistemas de classificação de macroalgas: bases para um estudo taxonômico. In:

PEDRINI, A. G. **Macroalgas: uma introdução à taxonomia**. 1ª Ed., Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 29-51.

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

JACKWERTH, E.; WÜRFELS, M. Pressure Digestion: Apparatus, Problems and Applications. In: STOEPLER, M. **Sampling and Sample Preparation: Practical Guide for Analytical Chemists**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Germany, 1997. p. 142-154.

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. Biological functions of the nonmetallic inorganic elements. **Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life - an introduction and guide**. John Wiley & Sons: New York, 1994. p. 318-329 (a).

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. Metals at the center of photosynthesis: magnesium and manganese. **Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life - an introduction and guide**. John Wiley & Sons: New York, 1994. p. 56-81 (b).

KAIM, W.; SCHWEDERSKI, B. Zinc: Structural and gene-regulatory functions and the enzymatic catalysis of hydrolysis or condensation reactions. **Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life - an introduction and guide**. John Wiley & Sons: New York, 1994. p. 242-264 (c).

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

KORN, M. G. A.; BOA-MORTE, E. S.; SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; SANTOS, W. P. C.; SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M. Sample preparation for the determination of metals in food sample using spectroanalytical methods - a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67-92, 2008.

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

KRUG, F. J.; SANTOS JÚNIOR, D. Erros sistemáticos no preparo de amostras. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p. 13-58.

LARREA-MARÍN, M. T.; POMARES-ALFONSO, M. S.; GÓMEZ-JUARISTI, M.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; ROCHA, S. R. Validation of an ICP-OES method for macro and trace element determination in *Laminaria* and *Porphyra* seaweeds from four different countries. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 814-820, 2010.

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

LIVINGSTONE, D. R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LOURIE, E.; PATIL, V.; GJENGEDAL, E. Efficient purification of heavy-metal-contaminated water by microalgae-activated pine bark. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, p. 493-500, 2010.

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

MATUSIEWICZ, H. Wet digestion methods. In: MESTER, Z.; STURGEON, R. **Sample preparation for trace element analysis**, Canadá, Wilson & Wilson's, 2003. p. 193-233.

MEERAVALI, N. N., KUMAR, S. J. Slurry-sampling with rapid atomization *versus* microwave digestion with conventional atomization for the determination of copper, manganese and nickel in algae matrix using transverse heated-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, p. 295-302, 2000.

MEHTA, S. K.; GAUR, J. P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p. 113-152, 2005.

MERMET, J. M. Focused-Microwave-Assisted Reactions: Atmospheric-Pressure Acid Digestion, On-Line Pretreatment and Acid Digestion, Volatile Species Production, and Extraction. In: KINGSTON, H. M., HASWELL, S. J. **Microwave-Enhanced Chemistry Fundamentals, Sample Preparation, and Applications**. Washington, American Chemical Society, 1997. p. 371-400.

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

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

MOREDA-PIÑEIRO, J.; ALONSO-RODRÍGUEZ, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Development of a new sample pre-treatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of metals in edible seaweed. **Analytica Chimica Acta**, v. 598, p. 95-102, 2007.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; ALONSO-RODRÍGUEZ, E.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; PRADA-RODRÍGUEZ, D.; BERMEJO-BARRERA, P. Trace metals in marine foodstuff: Bioavailability estimation and effect of major food constituents. **Food Chemistry**, v. 134, p. 339-345, 2012.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. A importância da análise de especiação do chumbo em plasma para a avaliação dos riscos à saúde. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 251-260, 2004.

MORENO, J. E. A.; GERPE, M. S.; MORENO, V. J. VODOPIVEZ, C. Heavy metals in Antarctic organisms. **Polar Biology**, v. 17, p. 131-140, 1997.

MORRISON, L.; BAUMANN, H. A.; STENGEL, D. B. An assessment of metal contamination along the Irish coast using the seaweed *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyceae). **Environmental Pollution**, v. 152, p. 293-303, 2008.

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

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

ORTEGA-CALVO, J. J.; MAZUELOS, C.; HERMOSIN, B.; SAIZ-JIMENEZ, C. Chemical composition of *Spirulina* and eukaryotic algae food products marketed in Spain. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, p. 425-435, 1993.

PEDRINI, A. G. Macroalgas marinhas: importância geral. In: PEDRINI, A. G. **Macroalgas: uma introdução à taxonomia**. 1ª Ed., Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 1-11.

PÉREZ, A. A.; FARÍAS, S. S.; STROBL, A. M.; PÉREZ, L. B.; LÓPEZ, C. M.; PIÑEIRO A.; ROSES, O.; FAJARDO, A. A. Levels of essential and toxic elements in *Porphyra columbina* and *Ulva* sp. from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 376, p. 51-59, 2007.

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

PHILLIPS, D. J. H. The chemistries and environmental fates of trace metals and organochlorines in aquatic ecosystems. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 193-200, 1995.

PICK, D.; LEITERER, M.; EINAX, J. W. Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS. **Microchemical Journal**, v. 95, p. 315-319, 2010.

PINTO, E.; SIGAUD-KUTNER, T. C. S.; LEITÃO, M. A. S.; OKAMOTO, O. K.; MORSE, D.; COLEPICOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**, v. 39, p. 1008-1018, 2003.

PIRES, K. M. S.; ALENCAR, D. B.; SOUSA, M. B.; SAMPAIO, A.; SAKER-SAMPAIO, S. Teores de α -caroteno e β -caroteno em macroalgas marinhas desidratadas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 2, p. 257-262, 2008.

RAI, L. C.; GAUR, J. P.; KUMAR, H. D. Protective effects of certain environmental factors on the toxicity of zinc, mercury, and methylmercury to *Chlorella vulgaris*. **Environmental Research**, v. 25, p. 250-259, 1981.

RAJFUR, M.; KLOS, A.; WACLAWEK, M. Sorption properties of algae *Spirogyra* sp. and their use for determination of heavy metal ions concentrations in surface water. **Bioelectrochemistry**, v. 80, p. 81-86, 2010.

ROCHA, S. R.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J.; GÓMEZ-JUARISTI, M.; MARÍN M. T. L. Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 330-336, 2009.

ROSA, C.; BLAKE, J. E.; BRATTON, G. R.; DEHN, L.; GRAY, M. J.; O'HARA, T. M. Heavy metal and mineral concentrations and their relationship to histopathological findings in the bowhead whale (*Balaena mysticetus*). **Science of the Total Environment**, v. 399, p. 165-178, 2008.

RUNCIE, J. W.; RIDDLE, M. J. Metal concentrations in macroalgae from East Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v. 49, p. 1114-1119, 2004.

RUNCIE, J. W.; TOWNSEND, A. T.; SEEN, A. J. The application of lead isotope ratios in the Antarctic macroalga *Iridaea cordata* as a contaminant monitoring tool. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 961-966, 2009.

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

RYAN, S.; MCLOUGHLIN, P.; O'DONOVAN, O. A comprehensive study of metal distribution in three main classes of seaweed. **Environmental Pollution**, v. 167, p. 171-177, 2012.

RYBAK, A.; MESSYASZ, B.; LESKA, B. Freshwater Ulva (Chlorophyta) as a bioaccumulator of selected heavy metals (Cd, Ni and Pb) and alkaline earth metals (Ca and Mg). **Chemosphere**, v. 89, p. 1066-1076, 2012.

SALGADO, P. E. T. Metais em Alimentos. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª Ed., Atheneu, São Paulo, 2008. p. 577-608.

SANTOS JÚNIOR, D.; KRUG, F. J. Tratamentos preliminares. In: KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. 1ª Ed. rev., Piracicaba: CENA/USP, 2010. p. 59-103.

SECO-GESTO, E. M.; MOREDA-PINHEIRO, A.; BERMEJO-BARRERA, A.; BERMEJO-BARRERA, P. Multi-element determination in raft mussels by fast microwave-assisted acid leaching and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Talanta**, v. 72, p. 1178-1185, 2007.

SERFOR-ARMAH, Y.; CARBOO, D.; AKUAMOAHA, R. K.; CHATT, A. Determination of selected elements in red, brown and green seaweed species for monitoring pollution in the coastal environment of Ghana. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 269, n. 3, p. 711-718, 2006.

SILVA, V. M.; SILVA, L. A.; ANDRADE, J. B.; VELOSO, M. C. C.; SANTOS, G. V. Determination of moisture content and water activity in algae and fish by thermoanalytical techniques. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 901-905, 2008.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. Fundamentos de Química Analítica. In: SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. **A natureza da química analítica**. 8ª Ed., Cengage Learning, São Paulo, 2006. p. 1-13 (a).

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. Fundamentos de Química Analítica. In: SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S.R. **Amostragem, Padronização e Calibração**. 8ª Ed., Cengage Learning, São Paulo, 2006. p. 163-210 (b).

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

STEWART, I. I.; OLESIK, J. W. The effect of nitric acid concentration and nebulizer gas flow rates on aerosol properties and transport rates in inductively coupled plasma sample introduction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 1249-1256, 1998 (a).

STEWART, I. I.; OLESIK, J. W. Steady state acid effects in ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, p. 1313-1320, 1998 (b).

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

SUCHAROVÁ, J.; SUCHARA, I. Determination of 36 elements in plant reference materials with different Si contents by inductively coupled plasma mass spectrometry: Comparison of microwave digestions assisted by three types of digestion mixtures. **Analytica Chimica Acta**, v. 576, p. 163-176, 2006.

SUNDA, W. G.; HUNTSMAN, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: phytoplankton as model systems. **Science of the Total Environment**, v. 219, p. 165-181, 1998.

TABARSA, M.; REZAEI, M.; RAMEZANPOUR, Z.; WAALAND, J. R. Chemical compositions of the marine algae *Gracilaria salicornia* (Rhodophyta) and *Ulva lactuca* (Chlorophyta) as a potential food source. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2500-2506, 2012.

TAVARES, T. M., CARVALHO, F. M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: Exemplos do recôncavo baiano. **Química Nova**, v. 15, n. 2, p. 147-154, 1992.

TODOLÍ, J. L.; MERMET, J. L. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 54, p. 895-929, 1999.

TORRES, M. A.; BARROS, M. P.; CAMPOS, S. C. G.; PINTO, E.; RAJAMANI, S.; SAYRE, R. T.; COLEPICOLO, P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 1-15, 2008.

TREVIZAN, L. C.; DONATI, G. L.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted procedures for sample preparation: recent developments. In: ARRUDA, M. A. Z. **Trends in Sample Preparation**. Nova Science Publishers, 2007. p. 29-52.

TUZEN, M.; VEREP, B.; OGRET MEN, A. O.; SOYLAK, M. Trace element content in marine algae species from the Black Sea, Turkey. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 151, p. 363-368, 2009.

ÜNAL, D.; IŞIK, N. O.; SUKATAR A. Effects of chromium VI stress on green alga *Ulva lactuca* (L.). **Turkish Journal of Biology**, v. 34, p. 119-124, 2010.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 25, p. 139-145, 2004.

WALTER, P. J.; CHALK, S.; KINGSTON, H. M. Overview of Microwave-Assisted Sample Preparation. In: KINGSTON, H. M., HASWELL, S. J. **Microwave-Enhanced Chemistry Fundamentals, Sample Preparation, and Applications**. Washington, American Chemical Society, 1997. p. 55-222.

WASILEWSKA, M.; GOESSLER, W.; ZISCHKA, M.; MAICHIN, B.; KNAPP, G. Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from the residual organic carbon content on selected techniques for determination of trace elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, p. 1121-1125, 2002.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Trace Elements in Human Nutrition and Health**. Geneva: WHO, 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Copper**. Geneva: WHO, 1998. (Environmental Health Criteria 200).

WIJESINGLE, W. A. J. P.; JEON, Y. Biological activities and potential cosmeceutical applications of bioactive components from brown seaweeds: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 431-443, 2011.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid. Part 1. Carbon conversion during sample decomposition. **Analytica Chimica Acta**, v. 226, p. 1-16, 1989.