



FURG

Dissertação de Mestrado

**Avaliação de Métodos de Preparo de Amostra e
Determinação de Elementos Traço por GF AAS e ICP-MS
em Crustáceo (*Sergio mirim*)**

Jaime Silvestre Mandlate

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2014

**Avaliação de Métodos de Preparo de Amostra e Determinação
de Elementos Traço por GF AAS e ICP-MS em Crustáceo
(*Sergio mirim*)**

por

JAIME SILVESTRE MANDLATE

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

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2014

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Avaliação de Métodos de Preparo de Amostra e Determinação
de Elementos Traço por GF AAS e ICP-MS em Crustáceo
(*Sergio mirim*)**

elaborada por

JAIME SILVESTRE MANDLATE

Como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte - Orientador (UFSM - RS)

Prof. Dr. Cezar Augusto Bizzi (UFSM - RS)

Prof. Dr. Carlos Francisco Ferreira de Andrade (FURG - RS)

Rio Grande, 28 de fevereiro de 2014.

Este trabalho é dedicado à toda minha família, especialmente aos meus pais, Silvestre Baecane Mandlate (falecido) e Cremilde João Matsinhe, pelo carinho, pela educação exemplar na humildade e honestidade, pelo apoio, confiança, mesmo não tendo tido oportunidade de estudar.

AGRADECIMENTOS

À Deus todo poderoso, que vem me auxiliando em toda minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande pela possibilidade de execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro prestado e à Universidade Eduardo Mondlane pela oportunidade de formação e apoio.

Ao Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte, que acreditou em mim mesmo sendo de um país desconhecido, pela orientação incansável, conhecimento transmitido, amizade, exemplo profissional e personalidade.

Aos Profs. Dr. Carlos Francisco Ferreira Andrade e Leonir André Colling, pelas valiosas contribuições, ensinamento, apoio e amizade.

Ao Prof. César Augusto Bizzi, pela participação na banca examinadora, pelas valiosas contribuições e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores, pela disponibilidade de estrutura de trabalho, junto à Universidade Federal de Santa Maria, que contribuíram para o fortalecimento do conhecimento e a execução deste e outros trabalhos.

Ao Prof. Dr. Ednei Gilberto Primel, coordenador do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (LACOM), pela oportunidade de realização e desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Fung Dai Kin e Prof^a. Dr^a. Amália Uamusse, pelo apoio, encorajamento dado durante todo o percurso.

Aos Professores Marcelo D'Oca, Leandro Bresolin, Jaqueline Buffon, Marcos Gelesky, Marcio Milani, Paulo Beck, Luciana Piovesan, Vanessa Gervini, Rodolfo Carapeli, pelo apoio, amizade e transmissão de conhecimentos.

Aos colegas Bruno Soares, Éderson Pereira, Juliana Maciel, Augusto Vieira, Sergiane, Lisiane, Gabriela, Liziara e todos amigos do LACOM, aos professores e estudantes do Laboratório de Hidroquímica (FURG) e do Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da UFSM pelo importante apoio, companheirismo, conhecimento compartilhado e pela grande amizade construída neste período.

Aos meus amigos João, Bruno Passa, Michele, Larissa, Leandro, Lissandra, Luís, Fulgêncio, Noé e todos amigos do handebol, em especial ao Prof. Manoel Luís Martins da Cruz, pelos momentos agradáveis e de alegria passados juntos, companheirismo e amizade.

Aos meus irmãos Elisabeth, David, Fernando, Aventina, Júlio e Amélia, meus filhos Silvestre e Jaime Júnior e demais familiares, pelo carinho, apoio e incentivo, que foram fundamentais neste período, ao Mendes, Elísio, Carduel, Julinho Langa, Simonal, Madala, Vicente, em especial à minha esposa Evelina pelo amor, carinho, paciência e companheirismo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	<i>viii</i>
LISTA DE TABELAS	<i>x</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xi</i>
RESUMO	<i>xiii</i>
ABSTRACT	<i>xiv</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. <i>Sergio mirim</i> - aspectos gerais	4
2.2. Técnicas utilizadas para a determinação de elementos traço	5
2.2.1. Técnicas utilizadas para a determinação de elementos traço	5
2.2.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado	6
2.2.3. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.....	7
2.2.3.1. Modificadores químicos	8
2.3. Modificadores químicos	9
2.3.1. Decomposição assistida por radiação micro-ondas	12
2.3.2. Decomposição assistida por radiação micro-ondas pressurizada com oxigênio	15
2.3.3. Decomposição assistida por radiação micro-ondas e radiação ultravioleta.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. Instrumentação	20
3.2. Reagentes	22
3.3. Amostras	23
3.4. Decomposição das amostras	24
3.4.1. Decomposição assistida por radiação micro-ondas	24
3.4.2. Decomposição assistida por radiação micro-ondas pressurizada com oxigênio	25
3.4.3. Decomposição assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta	25
3.5. Determinação do teor de carbono residual.....	27
3.6. Otimização do programa de aquecimento do equipamento de GF AAS para determinação de As, Cd, Cu, Cr e Pb	27

3.7. Limite de detecção e limite de quantificação	28
3.8. Exatidão e Precisão	28
4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	30
4.1. Pré-tratamento das amostras	30
4.2. Avaliação dos métodos de preparo de amostra	30
4.3. Otimização das condições para determinação por GF AAS.....	37
4.4. Comparação entre determinação por ICP-MS e GF AAS.....	45
4.5. Exatidão e precisão	46
4.6. Determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS nas amostras de <i>Sergio mirim</i> após decomposição por MAD	49
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	(a) Exemplar do <i>Sergio mirim</i> e (b) representação da forma e dimensão das tocas formadas no sedimento de praias arenosas.....	4
Figura 2.	Imagem do <i>Sergio mirim</i>	23
Figura 3.	Pontos de coleta das amostras de <i>Sergio mirim</i>	24
Figura 4.	Fluxograma dos procedimentos avaliados para o preparo das amostras de <i>Sergio mirim</i> para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por ICP-MS e GF AAS.....	27
Figura 5.	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para As, empregando 20 μL de solução de referência de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$	38
Figura 6.	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cd, empregando 20 μL de solução de referência de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$	38
Figura 7.	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cr, empregando 20 μL de solução de referência de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$	39
Figura 8.	Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cu, empregando 20 μL de solução de referência de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$	39

- Figura 9.** Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Pb, empregando 20 μL de solução de referência de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra com adição de $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam desvio padrão, $n = 3$... 40
- Figura 10.** Curvas de calibração de As, Cd, Cr, Cu e Pb determinado por GF AAS, com uso de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico, $n=3$ 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Condições de operação do equipamento de GF AAS.....	20
Tabela 2.	Condições operacionais do equipamento ICP-MS e ICP OES.....	21
Tabela 3.	Programa de aquecimento de forno micro-ondas para MAD.....	25
Tabela 4.	Programa de aquecimento de forno micro-ondas para MAD-UV.....	26
Tabela 5.	Programa de aquecimento para determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS.....	28
Tabela 6.	Concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb obtidos por ICP-MS e RCCs obtidos por ICP OES. Os resultados estão expressos em $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ desvio padrão (concordância com o método MAD, %).....	32
Tabela 7.	Valores de LOD e LOQ para As, Cd, Cr, Cu e Pb determinados por ICP-MS após diferentes métodos de preparo de amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$).....	33
Tabela 8.	Temperatura de pirólise e para determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS.....	43
Tabela 9.	Faixa de concentração com resposta linear e coeficientes de linearidade e coeficientes de linearidade para As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS.....	43
Tabela 10.	Comparação das técnicas de ICP-MS e GF AAS na determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb nas amostras de <i>Sergio mirim</i> , após decomposição por MAD (n = 3).....	45
Tabela 11.	Valores de LOD e LOQ para As, Cd, Cr, Cu e Pb por ICP-MS por diferentes métodos de preparo de amostras ($\mu\text{g g}^{-1}$).....	46
Tabela 12.	Determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb nos CRMs por GF AAS, após decomposição por MAD.....	48
Tabela 13.	Concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) determinados por GF AAS, após decomposição por MAD.....	49
Tabela 14.	Concentração elementar ($\mu\text{g g}^{-1}$) em organismos coletados na Lagoa dos Patos.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

1. AAS, espectrometria de absorção atômica, do inglês *atomic absorption spectrometry*
2. ANOVA, análise de variância
3. CCD, detector de carga acoplada, do inglês *charge-coupled detector*
4. CRM, material de referência certificado, do inglês *certified reference material*
5. CVG-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração química de vapor, do inglês *chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry*
6. EDL, lâmpada de descarga sem eletrodo, do inglês *electrode discharge lamp*
7. ETV, vaporização eletrotérmica, do inglês *electrothermal vaporization*
8. HCL, lâmpada de cátodo oco, do inglês *hollow cathode lamp*
9. GF AAS, espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês *graphite furnace atomic absorption spectrometry*
10. ICP OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
11. ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*
12. LA, ablação com laser, do inglês *laser ablation*
13. LOD, limite de detecção, do inglês *limit of detection*
14. LOQ, limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*
15. MAD, digestão assistida por micro-ondas, do inglês *microwave-assisted digestion*
16. MAD-O₂, digestão assistida por micro-ondas pressurizada com oxigênio, do inglês *microwave-assisted digestion pressurized with oxygen*
17. MAD-UV, digestão assistida por micro-ondas e radiação ultravioleta, do inglês *microwave-assisted digestion and ultraviolet radiation*
18. NAA, análise por ativação neutrônica, do inglês *neutron activation analysis*

19. RCC, teor de carbono residual, do inglês *residual carbon content*
20. RSD, desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*
21. USN-ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com nebulizador ultrassônico, do inglês *ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry*
22. UV, ultravioleta

RESUMO

Título: Avaliação de Métodos de Preparo de Amostra e Determinação de Elementos Traço por GF AAS e ICP-MS em Crustáceo (*Sergio mirim*)

Autor: Jaime Silvestre Mandlate

Orientador: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

Neste trabalho foram avaliados métodos de preparo de amostra para a determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb em amostras de crustáceo (*Sergio mirim*) empregando a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Foram avaliados métodos de preparo de amostra tais como a digestão assistida por micro-ondas (MAD), digestão assistida por micro-ondas pressurizada com oxigênio (MAD-O₂) e a digestão assistida por micro-ondas e radiação ultravioleta (MAD-UV). Durante a otimização dos métodos de preparo de amostra, a determinação dos elementos foi feita por ICP-MS. A eficiência de decomposição foi avaliada através da determinação do teor de carbono residual (RCC) no digerido final, o qual foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Para a determinação dos analitos por GF AAS, foi feita a otimização das temperaturas de pirólise e atomização tanto para soluções de referência quanto para as amostras, com e sem o uso de modificador. A exatidão foi avaliada através da comparação dos métodos de preparo de amostra e pela decomposição de materiais de referência certificados de músculo de peixe (DORM-2) e tecido de ostra (NIST SRM-1566b) por MAD, seguidos da determinação por GF AAS e ICP-MS. A concordância entre os valores obtidos pelo método de referência (MAD) e os valores certificados foram entre 94 e 108%. Os limites de detecção (LODs) obtidos por GF AAS foram de 0,036; 0,003; 0,049; 0,277 e 0,018 µg g⁻¹ para As, Cd, Cr, Cu e Pb, respectivamente. Os valores de RCC foram de 7,3% (MAD), 13% (MAD-O₂) e entre 5,0 e 8,8% (MAD-UV). Os métodos MAD, MAD-O₂ e MAD-UV foram adequados para a decomposição das amostras. Cabe destacar que o método MAD foi aplicado para a determinação por GF AAS em amostras de *Sergio mirim* coletadas na praia do Cassino. A concentração dos analitos variou entre 1,45 e 3,70 µg g⁻¹ para As, 0,615 e 1,13 µg g⁻¹ para Cd, 0,884 e 7,20 µg g⁻¹ para Cr, 122 e 275 µg g⁻¹ para Cu e entre 0,377 e 0,916 µg g⁻¹ para Pb.

ABSTRACT

Title: Evaluation of Sample Preparation Methods for Trace Elements Determination by GF AAS e ICP-MS in Crustacean (*Sergio mirim*)

Author: Jaime Silvestre Mandlate

Advisor: Prof. Dr. Fábio Andrei Duarte

In this work sample preparation methods were evaluated for determination of As, Cd, Cr, Cu and Pb in samples of a crustacean (*Sergio mirim*), using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Sample preparation methods such as microwave-assisted digestion (MAD), oxygen pressurized microwave-assisted digestion (MAD-O₂) microwave and ultraviolet radiation assisted digestion (MAD-UV) were evaluated. During optimization of sample preparation methods, elements determination was carried out by ICP-MS. The efficiency of sample decomposition was evaluated by the determination of residual carbon content (RCC) in digests by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). For analytes determination by GF AAS temperatures of pyrolysis and atomization were optimized using reference solutions and decomposed samples, with and without the use of chemical modifier. The accuracy was evaluated by comparison of decomposition methods as well as by analysis of certified reference materials (CRMs) of fish muscle (DORM-2) and oyster tissue (NIST SRM-1566b), after decomposition using MAD and determination by GF AAS and ICP-MS. The agreement between decomposition using MAD and certified values ranged from 94 to 108%. The limits of detection (LOD) obtained by GF AAS were 0.036; 0.003; 0.049; 0.277 and 0.018 $\mu\text{g g}^{-1}$ for As, Cd, Cr, Cu e Pb, respectively. The RCCs values were 7.3% for MAD, 13.1% for MAD-O₂ and from 5 to 8.8% for MAD-UV. The evaluated methods MAD, MAD-O₂ and MAD-UV were considered suitable for sample decomposition. In addition, MAD was used for analytes determination by GF AAS in *Sergio mirim* samples, which were collected in Cassino beach. The concentration of analytes in the samples ranged from 1.45 to 3.70 $\mu\text{g g}^{-1}$ for As, from 0.615 to 1.13 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Cd, from 0.884 to 7.20 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Cr, from 122 to 275 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Cu and from 0.377 to 0.916 $\mu\text{g g}^{-1}$ for Pb.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se observado um crescente interesse pelo estudo de organismos aquáticos como bioindicadores de contaminação ambiental. Diariamente, grandes quantidades de poluentes chegam ao ambiente marinho através do transporte e deposição atmosférica, erosão natural, ciclos geoquímicos e produtos de atividades antrópicas.¹ Alguns estudos têm mostrado a relação de organismos aquáticos com os diversos tipos de impactos que podem ocorrer no meio ambiente. Desta forma, a determinação de elementos traço no ambiente marinho tem sido relevante no sentido de avaliar os impactos oriundos de atividades antropogênicas, sendo que o estudo dos invertebrados bentônicos é um dos métodos mais eficientes para avaliar a qualidade da água e, conseqüentemente, do ambiente no entorno.²

No âmbito regional, a biota das praias do Rio Grande do Sul apresenta uma considerável variedade de espécies de invertebrados marinhos, sendo que na zona entremarés predominam espécies de moluscos e crustáceos. Estes organismos desempenham um importante papel ecológico, pois constituem uma fonte alimentar para outros invertebrados, peixes de importância comercial e aves.³ O *Sergio mirim* é uma espécie de crustáceo abundante nessa região, sendo que não existem estudos a respeito da concentração de elementos traço nesta espécie.

Entretanto, tem sido crescente o interesse no desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e com exatidão e precisão adequadas para a determinação de contaminantes em organismos marinhos, principalmente no que diz respeito à presença de metais, por serem persistentes e não sofrerem degradação. Além disso, alguns podem ser acumulativos, com elevada capacidade de biomagnificação na cadeia trófica.⁴

Dentre as principais técnicas analíticas usadas para a determinação de elementos traço em organismos aquáticos, pode-se destacar a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS),⁵ a espectrometria de emissão óptica

¹ Firat et al., *Environ. Monit. Assess.*, 2008, 147, 117-123.

² Monteiro et al., *Oecol. Bras.*, 2008, 12, 553-563.

³ Teixeira et al., *Rev. Elec., Cad. Ecol. Aquá.*, 2008, 3, 1-18.

⁴ Clark, R. B., *Marine pollution*, 2001, p. 248.

⁵ Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B*, 1989, 12, 1209-1220.

com plasma indutivamente acoplado (ICP OES)⁶ e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).⁷ Para a utilização destas técnicas, geralmente é necessário que as amostras sejam introduzidas na forma de solução. No entanto, organismos aquáticos são matrizes com elevado teor de carbono (além de diversos outros elementos), o que demanda uma etapa prévia de decomposição da amostra.^{8,9}

Para a decomposição de amostras biológicas, geralmente são empregados métodos de decomposição por via úmida ou via seca em sistemas abertos ou fechados,¹⁰ com aquecimento convencional ou assistidos por radiação micro-ondas.^{10,11} Decomposições por via seca em forno tipo mufla geralmente são inadequadas para a determinação de metais em baixas concentrações, principalmente devido à possibilidade de perdas do analito por volatilização e ao risco de contaminação. No entanto, sistemas abertos de decomposição são comumente utilizados, principalmente devido o seu baixo custo e simplicidade de operação. Da mesma forma, métodos de decomposição por via úmida em sistemas abertos geralmente são morosos e requerem misturas de grandes quantidades de ácidos concentrados para melhorar a eficiência de decomposição.^{12,13}

A decomposição assistida por micro-ondas (MAD) tanto em sistemas abertos quanto em sistemas fechados, tem se mostrado eficiente para uma grande variedade de amostras. Os sistemas fechados possuem a vantagem de operação em pressões e temperaturas elevadas, o que ocasiona o aumento da temperatura de ebulição dos ácidos. Obtendo se temperaturas elevadas a eficiência de decomposição melhora.¹² Além disso, os métodos de decomposição combinando a radiação micro-ondas e ultravioleta tem sido utilizados para aumentar a eficiência na decomposição de matrizes orgânicas. A digestão assistida por micro-ondas e radiação ultravioleta (MAD-UV) tem sido vantajosa na decomposição de matrizes orgânicas complexas, possibilitando o uso de soluções de ácidos (ou mistura) diluídos, o que minimiza o consumo de reagentes e a geração de resíduos.^{12,14} Outra alternativa recente é o emprego da digestão assistida

⁶ López *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2003, 54, 223-228.

⁷ Meche *et al.*, *Microchem. J.*, 2010, 94, 171-174.

⁸ Chakraborty *et al.*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 355, 43-47.

⁹ Cid *et al.*, *Food Chem.*, 2001, 75, 93-100.

¹⁰ Rodushkin *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 378, 191-200.

¹¹ Nemati *et al.*, *J. Hazard. Mater.*, 2010, 182, 453-459.

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.

¹³ Wasilewska *et al.*, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, 17, 1121-1125.

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

por micro-ondas pressurizada com oxigênio (MAD-O₂). Este método, quando comparado com a MAD convencional, possibilita a decomposição de amostras com grande eficiência, utilizando HNO₃ diluído e/ou H₂O₂ e oxigênio.¹⁵

Portanto, neste trabalho foram desenvolvidos e investigados métodos de preparo de amostra para a subsequente determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS e ICP-MS em amostras de *Sergio mirim* coletadas na praia do Cassino (Rio Grande/RS). Para isso, foram avaliados os métodos de MAD, MAD-O₂ e MAD-UV (com diferentes concentrações de HNO₃, com e sem adição de H₂O₂) para a decomposição das amostras. Além disso, foram otimizados parâmetros importantes para determinação por GF AAS após MAD. Cabe destacar que foi feito um estudo adicional avaliando o local de amostragem, sexo e tamanho dos exemplares de *Sergio mirim*, relacionando com a concentração dos analitos.

¹⁵ Bizzi et al., *Anal. Methods*, 2010, 2, 734-738.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Sergio mirim*

O *Sergio mirim* é um crustáceo decápode cavador, que pertence à família *Callianassidae*. Como principais características, estes organismos possuem, aproximadamente, 20 cm de comprimento, abdômen com coloração amarelada e garras em forma de pinças, sendo uma delas consideravelmente maior que a outra.^{3,16} Na Figura 1, está mostrado um exemplar de *Sergio mirim* e os caminhos (“tocas”) que podem ser formados por este organismo no sedimento.

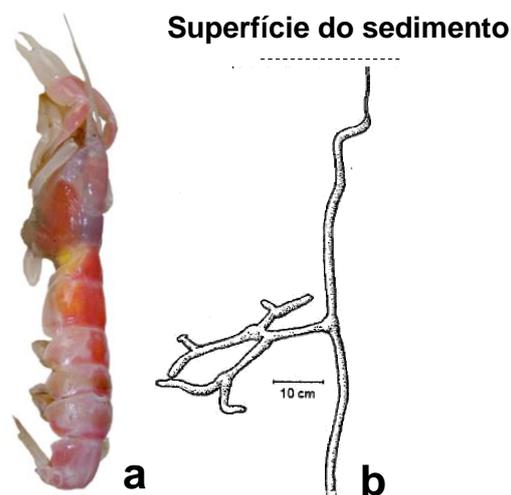


Figura 1. Exemplar do (a) *Sergio mirim* e a (b) representação da forma e dimensão das tocas formadas no sedimento de praias arenosas (adaptado por Teixeira *et al.* ³)

O *Sergio mirim* apresenta adaptações para viver em extensas galerias cavadas na areia da praia, exercendo uma intensa atividade de remoção de sedimentos que resulta na construção de um complexo sistema de túneis ou galerias. Estes organismos não são utilizados na alimentação humana, mas são usados como isca na pesca artesanal e recreativa.^{3,16}

Muitas espécies de organismos bentônicos podem bombear grandes quantidades de água (em parte constituída por água intersticial de sedimentos) para a

³ Teixeira *et al.*, *Rev. Elec., Cad. Ecol. Aqua.*, 2008, 3, 1-18.

¹⁶ Rodrigues, S. D., Tese de Doutorado em Ciências, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, 1966.

parte externa de suas tocas.¹⁷ Por outro lado, a atividade de alimentação suspensiva (alimentação a base de compostos orgânicos em suspensão na coluna d'água) pode movimentar grandes quantidades de água através dos tubos no interior do substrato.^{17,18,19} Um grande número de indivíduos (aproximadamente 450 m⁻²) pode significar uma remobilização de sedimento de aproximadamente 100 kg de sedimento (seco) m⁻² ano⁻¹. Desta forma, a bioturbação causada por este organismo pode promover o fluxo de diversos elementos traço.¹⁹

Sabe-se que para detectar mudanças e atribuí-las a um impacto ambiental, existe a necessidade de dados pré-impacto.^{2,4} Até o momento, não existem informações a respeito do tipo e quantidade de elementos traço presente no *Sergio mirim*. Portanto, considerando a importância da proteção e conservação do meio ambiente, com especial enfoque ao meio aquático e seus ecossistemas, existe uma necessidade crescente do desenvolvimento de métodos analíticos adequados e viáveis para a determinação de elementos traço, com o objetivo de entender o comportamento destes organismos, além de sua possível utilização como bioindicadores ambientais.

2.2. Técnicas de determinação de elementos traço

2.2.1. Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A ICP OES é uma das técnicas analíticas para determinação elementar bastante utilizada atualmente, principalmente devido a sua capacidade multielementar, ampla faixa linear e os relativamente baixos limites de detecção (LOD).²⁰ A técnica baseia-se na emissão de radiação a partir dos elementos excitados em um plasma indutivamente acoplado formado, geralmente, por argônio.²⁰ O plasma, por definição, é um gás parcialmente ionizado que pode atingir temperaturas de até 10000 K, as quais são suficientemente elevadas para causar a atomização, excitação ou mesmo ionização de grande parte dos elementos. Com o desenvolvimento dos detectores de carga acoplada (CCD) combinados com o uso de espectrômetros de alta resolução (como sistema óptico do tipo *Echelle*), tornou-se possível a determinação multielementar e

² Monteiro *et al.*, *Oecol. Bras.*, 2008, 12, 553-563.

⁴ Clark, R. B., *Marine pollution*, 2001, p. 248.

¹⁷ Colin *et al.*, *Bull. Mar. Sci.* 1986, 38, 19-24.

¹⁸ Griffen *et al.*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 2004, 269, 223-236.

¹⁹ Pezzuto, P. R., *Mar. Ecol.*, 1998, 19, 89-109.

²⁰ Broekaert, J. A. C., *Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas*, 2002, p. 306.

simultânea. Esta característica, associada à elevada sensibilidade da técnica, possibilita a determinação de elementos em concentrações da ordem de partes por milhão (mg L^{-1} ou $\mu\text{g g}^{-1}$) ou mesmo, partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng g^{-1}) para alguns elementos.²⁰

Atualmente, a técnica de ICP OES vem sendo aplicada para a determinação de uma série de elementos em uma grande variedade de amostras. Para a introdução da amostra na forma de solução, são necessários procedimentos de decomposição que, geralmente, utilizam ácidos concentrados ou misturas destes. Entretanto, o uso destes reagentes pode causar efeito de matriz, além de diminuir a vida útil de alguns componentes dos equipamentos. Como alternativa ao pré-tratamento da amostra, podem ser utilizadas, em alguns casos, técnicas de introdução da amostra na forma de suspensões ou, ainda, na forma sólida utilizando a vaporização eletrotérmica (ETV) ou ablação com laser (LA).^{10,20}

2.2.2. Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

A ICP-MS é uma das técnicas analíticas de maior sensibilidade empregadas na determinação de elementos, podendo atingir facilmente LODs da ordem de partes por bilhão ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng g^{-1}) e, em alguns casos, da ordem de partes por trilhão (ng L^{-1} ou pg g^{-1}). Em termos de instrumentação, o plasma indutivamente acoplado para os equipamentos de ICP OES e ICP-MS apresenta as mesmas características (conforme abordado no *item 2.2.1*). Entretanto, a técnica de ICP-MS baseia-se na separação de íons carregados positivamente formados no plasma, empregando um espectrômetro de massa. Nesta etapa, os íons são separados de acordo com a sua razão massa-carga (m/z) e enviados para o detector. Através da aplicação de uma combinação de corrente contínua e alternada nas barras metálicas, geralmente um quadrupolo (analisador de massa), é possível a seleção de um íon específico, enquanto outros íons com diferentes m/z são enviados para a parte externa do analisador de massa.²⁰ Esta técnica possibilita a detecção multielementar sequencial rápida, a qual, aliada a uma elevada sensibilidade, faz desta técnica uma das mais utilizadas para a determinação de elementos traço e ultratraço em uma grande variedade de amostras.²¹

¹⁰Rodushkin *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 378, 191-200.

²⁰Broekaert, J. A. C., *Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas*, 2002, p. 306.

²¹Becker, J. S., *Int. J. Mass Spectrom.*, 2003, 228, 127-150.

Entretanto, o preparo de amostra prévio é indispensável para esta técnica, assim como para as demais técnicas espectrométricas, principalmente no que diz respeito à análise de amostras com elevado teor de carbono. A presença de carbono pode causar interferências, o que pode variar de acordo com o potencial de ionização e a razão m/z do analito.²² Além disso, a presença de carbono na interface entre a tocha e o espectrômetro de massa, pode causar deposição deste elemento e entupimento da interface, limitando o transporte dos analitos até o espectrômetro de massa. Por isso, é de extrema importância a utilização de métodos de decomposição de amostra eficientes, proporcionando baixos teores de carbono residual (RCC) nos digeridos.²²

2.2.3. Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

A espectrometria de absorção atômica (AAS) baseia-se na absorção de energia radiante oriunda de espécies atômicas no estado fundamental e gasoso. Cada espécie atômica possui um espectro de absorção constituído por linhas espectrais características das possíveis transições eletrônicas envolvendo os elétrons mais externos de cada elemento. A instrumentação em AAS é constituída por cinco componentes principais: i) fonte de radiação; ii) atomizador; iii) monocromador; iv) detector; e v) sistema de registro de sinal. Após a introdução da amostra no sistema de nebulização, o elemento é levado à condição de uma dispersão atômica gasosa através da qual é incidido um feixe de radiação proveniente de uma fonte de radiação específica.^{23,23} Dentre as fontes de radiação mais utilizadas, destacam-se a lâmpada de cátodo oco (HCL) e a lâmpada de descarga sem eletrodo (EDL), porém esta última é menos utilizada.^{23,24}

Dentre as formas de atomização (chama, geração de hidretos e forno de grafite), o emprego do forno de grafite (GF AAS) tem sido amplamente aceito devido à adequada sensibilidade para a determinação de elementos em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, ou mesmo ng L^{-1} em alguns casos. Esta técnica possui atributos que a tornam adequada para vários tipos de amostras, tais como ambientais, geológicas, biológicas, farmacológicas, entre outras. Além disso, a técnica permite a análise de

²² Allah, P., *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1497-1498.

²³ Volynsky, A. B.; Krivan, V., *J. Anal. Atom. Spectrometry*. 1996, 11, 159-164.

²⁴ Welz, B.; Sperling, M., *Atomic absorption spectrometry*, 1999, p. 234.

amostras líquidas, bem como amostras sólidas na forma de suspensões ou mesmo através da análise direta na forma sólida.²⁰

O desenvolvimento de um método de determinação por GF AAS inicia-se, habitualmente, pelo estudo do programa de aquecimento de forno de grafite. Este estudo é importante, pois possibilita encontrar uma condição ideal de temperatura entre a solução de referência aquosa e a amostra, uma vez que idealmente as curvas são feitas com soluções aquosas. Esta otimização consiste no tratamento da amostra em diferentes temperaturas de secagem, pirólise, atomização e limpeza, as quais devem ser cuidadosamente avaliadas para cada analito e matriz.^{9,25} Contudo, o uso de modificadores químicos pode favorecer a redução de interferências, além de alterar a volatilidade do analito ou da matriz.^{5,23,26}

2.2.3.1. Modificadores químicos

O desenvolvimento da técnica GF AAS foi marcado por alguns efeitos adversos causados por algumas matrizes. Apesar da boa seletividade e sensibilidade, o uso desta técnica requer cuidados especiais devido a problemas causados por interferências, principalmente de natureza não espectral. Estas interferências, na fase condensada e na fase de vapor, tem como efeito principal a diminuição da população de átomos no estado fundamental, o que compromete a sensibilidade. Estas interferências podem estar associadas à perda do analito por volatilização na etapa de pirólise, ou pela volatilização simultânea do analito com a matriz durante a etapa de atomização.^{23,24}

Nestes casos, o uso de modificadores químicos tem sido uma alternativa viável para alteração da volatilidade do analito ou da matriz, diminuindo drasticamente estes efeitos indesejáveis.^{26,27} Os modificadores químicos podem ser definidos como compostos que são introduzidos no tubo de grafite (atomizador) simultaneamente com a amostra com o objetivo de reduzir consideravelmente as interferências da matriz.^{26,28}

⁵ Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B*, 1989, 12, 1209-1220.

⁹ Cid *et al.*, *Food Chem.*, 2001, 75, 93-100.

²⁰ Broekaert, J. A. C., *Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas*, 2002, p. 306.

²³ Volynsky, A. B.; Krivan, V., *J. Anal. Atom. Spectrometry*, 1996, 11, 159-164.

²⁴ Welz, B.; Sperling, M., *Atomic absorption spectrometry*, 1999, p. 234.

²⁵ Gontad *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 1165-1172.

²⁶ Ediger, R. D., *At. Absorp. Newsletter*, 1975, 14, 127-130.

²⁷ Sardans *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2010, 65, 97-112.

²⁸ Volynsky, A. B.; Wennrich, R., *Talanta*, 2003, 59, 277-286.

As características de um modificador químico ideal podem ser definidas como: *i)* ser efetivo para um grande número e formas de analitos; *ii)* apresentar baixo sinal de fundo (*background*); *iii)* não interferir negativamente na vida útil do tubo de grafite; *iv)* estar disponível em alta pureza; *v)* que não sejam elementos rotineiramente determinados através por GF AAS (ex: As, Cd, Cr, Pb, entre outros); *vi)* possuir baixa toxicidade; *vii)* ser estável durante um longo tempo de conservação e *viii)* ser de baixo custo.^{24,27,28}

O objetivo principal do uso dos modificadores químicos consiste na atomização seletiva do analito a partir da matriz.^{24,26,28} De maneira geral, o analito pode encontrar-se em três situações com relação à matriz: *i) volatilidade menor que a matriz*: a matriz pode ser eliminada durante a etapa de pirólise, permitindo a vaporização/eliminação do analito de forma seletiva prevenindo quaisquer interferências espectrais, porém alguns modificadores químicos podem ser utilizados de maneira a facilitar a modificação/eliminação da matriz, sem perda de analito; *ii) volatilidade similar à da matriz*: o modificador químico altera as propriedades físico-químicas do analito e permite a estabilização/eliminação da matriz ou aumento/estabilização da volatilidade do analito de maneira a atingir a vaporização seletiva; *iii) volatilidade maior que a matriz*: esta situação, geralmente, não exige o uso de modificadores químicos para estabilizar termicamente os analitos durante a etapa de pirólise, sendo que ocorre principalmente durante a determinação de compostos inorgânicos refratários onde, geralmente, a matriz não pode ser eliminada na etapa de pirólise. Como a matriz apresenta uma vaporização mais lenta que o analito, o ambiente de vaporização e atomização ocorre na presença de poucos concomitantes.^{24,28}

2.3. Métodos de preparo de amostra

De maneira geral, a amostra deve ser convertida na forma mais adequada para a técnica analítica utilizada na quantificação. Na maioria dos casos, pode-se empregar um método de decomposição, separação ou extração. Para que um método de decomposição seja eficiente, torna-se necessária a remoção completa da matriz, onde os analitos devem estar, preferencialmente, presentes na forma iônica previamente à

²⁴ Welz, B.; Sperling, M., *Atomic absorption spectrometry*, 1999, p. 234.

²⁷ Sardans *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2010, 65, 97-112.

²⁸ Volynsky, A. B.; Wennrich, R., *Talanta*, 2003, 59, 277-286.

etapa de determinação.⁶ Por isso, cada vez mais cresce o interesse pelo desenvolvimento de métodos de preparo de amostra que forneçam digeridos apropriados para as mais variadas técnicas analíticas.^{29,30} Além disso, um método de preparo de amostra eficiente deve apresentar características como: simplicidade, rapidez, menor consumo e mínima manipulação de reagentes, preparo simultâneo de um número apreciável de amostras, segurança, mínimo risco de perdas do analito, baixo custo e garantia da exatidão e precisão dos resultados.¹²

A escolha de método de preparo de amostra adequado depende do tipo de matriz, do analito e sua concentração, da técnica de determinação e da precisão e exatidão desejadas.^{12,14,31,32,33} Os métodos para preparo de amostras com alto teor de matéria orgânica para a posterior determinação elementar, geralmente são baseados no aquecimento de um ácido mineral oxidante adicionado à amostra, podendo ser utilizado apenas um único ou uma mistura de ácidos. Dentre os ácidos mais utilizados, destacam-se o HNO₃, HCl, H₂SO₄, HClO₄ e HF, na presença ou não de H₂O₂ como oxidante auxiliar.^{12,31,34} A presença desses reagentes, combinada com aquecimento, permite a decomposição da matéria orgânica e inorgânica presente nas amostras, transferindo os analitos para a solução. Os métodos de decomposição por via úmida em sistemas abertos possuem a vantagem de poder utilizar quantidades de amostra relativamente elevadas (até 3 g), possibilitando a obtenção de baixos LODs.^{12,35} Por outro lado, como a temperatura atingida em sistemas abertos é menor quando comparada com sistemas fechados, este fato requer o uso de misturas de ácidos para melhorar a eficiência de decomposição de matrizes com alto teor de matéria orgânica. Cabe salientar que, problemas relacionados com contaminação e perdas de analitos voláteis são comuns em sistemas abertos, caracterizando uma das principais desvantagens deste método.¹⁰

⁶ López *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2003, 54, 223-228.

¹⁰ Rodushkin *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, 1999, 378, 191-200.

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

²⁹ Gouveia *et al.*, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2000, 11, 261-265.

³⁰ Mesko *et al.*, *Microchem. J.*, 2006, 82, 183-188.

³¹ Araújo *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, 2121-2132.

³² Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E., *Quim. Nova*, 1997, 20, 638-643.

³³ Flores *et al.*, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1865-1870.

³⁴ Abu-Samra *et al.*, *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1475.

³⁵ Ashoka *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, 2009, 653, 191-199.

Os sistemas fechados de decomposição de amostra têm sido comumente relatados na literatura para a decomposição de amostras com elevado teor de matéria orgânica e/ou contendo estruturas carbônicas com relativa estabilidade (por exemplo, grafite, alguns fármacos, materiais de alta pureza, entre outros). Pode-se dizer que, atualmente, o estado da arte em decomposições por via úmida em sistemas fechados, consiste no aquecimento de ácidos oxidantes com auxílio da radiação micro-ondas, aliados ao uso de frascos fechados e confeccionados com materiais de alta pureza.^{12,31,33,34}

No trabalho desenvolvido por Rodushkin *et al.*,¹⁰ foi feito um comparativo entre os métodos de decomposição por via úmida em sistema aberto (bloco digestor) e MAD para determinação de 35 elementos em plantas. Na decomposição com bloco digestor, foram utilizados 10 mL HNO₃ 14 mol L⁻¹ com aquecimento por 24 h a 65°C. No método MAD, foi utilizada uma mistura de 5 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹ e 0,5 mL de H₂O₂ a 30% (m/m) com tempo de decomposição de 1 h empregando uma potência de 600 W. A determinação dos elementos foi feita por ICP OES e ICP-MS. A exatidão foi avaliada através do uso de material de referência certificado (CRM) de folhas de pessegueiro (SRM 1547) e foram obtidas concordâncias com os valores certificados de cerca de 80% para decomposição em bloco digestor e de cerca de 95% para MAD.

No que diz respeito à eficiência, geração de resíduos e segurança dos métodos de decomposição de amostras assistidos por micro-ondas, recentemente têm sido relatadas na literatura modificações instrumentais para atender a esses requisitos. Neste contexto, destacam-se a combustão iniciada por micro-ondas (MIC),^{30,33} a decomposição assistida por micro-ondas pressurizada com oxigênio (MAD-O₂)¹⁵ e a decomposição assistida por micro-ondas e radiação ultravioleta (MAD-UV).¹⁴ A seguir, serão detalhados alguns métodos de decomposição por via úmida assistidos por micro-ondas em sistemas fechados, que são comumente utilizados para a decomposição de matrizes orgânicas.

¹⁰ Rodushkin *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 378, 191-200.

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

¹⁵ Bizzi *et al.*, *Anal. Methods*, 2010, 2, 734-738.

³⁰ Mesko *et al.*, *Microchem. J.*, 2006, 82, 183-188.

³¹ Araújo *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, 2121-2132.

³³ Flores *et al.*, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1865-1870.

³⁴ Abu-Samra *et al.*, *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1475.

2.3.1. Decomposição assistida por micro-ondas

Os primeiros experimentos empregando fornos micro-ondas domésticos foram feitos em 1975, onde foi proposta a decomposição de amostras de tecidos vegetais e animais em frascos abertos com auxílio da radiação micro-ondas.³⁴ Esses experimentos mostraram as vantagens relacionadas ao uso da radiação micro-ondas comparada aos sistemas convencionais de aquecimento para a decomposição de amostras.³⁴ O uso da radiação micro-ondas tem como principal diferença a forma como ocorre o aquecimento da solução. Nos sistemas convencionais de aquecimento, a transferência de energia acontece por condução, onde primeiramente são aquecidas as paredes do frasco de decomposição e, em seguida, o calor é transferido para a solução. No entanto, a utilização de frascos de decomposição transparentes à radiação micro-ondas permite a interação direta entre radiação e solução, onde a absorção da radiação é imediatamente convertida em calor, proporcionando o aquecimento do meio reacional.¹² Neste caso, a temperatura do meio aumenta pelos mecanismos de condução iônica e rotação de dipolos. Por condução iônica, o calor é gerado através de perdas por fricção que ocorrem através da migração de íons dissolvidos, sob a ação de um campo eletromagnético, provocando um aumento de temperatura. Ademais, as perdas dependem do tamanho, da carga, da condutividade dos íons dissolvidos e das interações destes com o solvente. O mecanismo de aquecimento por rotação de dipolo, está relacionado com o alinhamento das moléculas com o campo elétrico oscilante das micro-ondas aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um estado desordenado e a energia que foi absorvida para esta orientação nestes dipolos é dissipada na forma de calor.^{12,32}

Com o advento da instrumentação analítica, equipamentos modernos têm sido desenvolvidos para decomposições assistidas por micro-ondas. Alguns modelos permitem o controle de temperatura e pressão dos frascos de decomposição em tempo real, através do uso de tecnologia baseada em termometria, com sensores de fibra óptica e transdutores, possibilitando a determinação da temperatura do meio reacional *in situ*. Além disso, o uso de frascos de decomposição confeccionados com materiais

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.

³² Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E., *Quim. Nova*, 1997, 20,638-643

³⁴ Abu-Samra *et al.*, *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1475.

de alta pureza e alta resistência mecânica, permitem efetuar a decomposição de amostras em sistemas fechados, admitindo pressões elevadas (até cerca de 150 bar, dependendo da matriz), o que confere uma maior eficiência de decomposição.¹²

Cid *et al.*,⁹ efetuaram a decomposição de amostras de peixe utilizando MAD para subsequente determinação de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn por GF AAS, utilizando 4 mL de HNO₃ concentrado. Para avaliar a exatidão foram utilizados CRMs de fígado bovino (NIST 1577b) e alfafa (IAEA-V10), onde foram obtidas boas concordâncias com os valores certificados, variando entre 97 e 105% para todos os analitos.

Em um trabalho desenvolvido por Araujo *et al.*,³¹ foi avaliada a eficiência de decomposição com diferentes concentrações de HNO₃ (2 a 14 mol L⁻¹) com auxílio de H₂O₂ (1 mL) para a decomposição de amostras de plantas (250 mg) empregando MAD. Os autores também avaliaram a influência da quantidade de ácido residual nos digeridos para a determinação dos analito por ICP OES. A eficiência de decomposição das diferentes soluções foi avaliada comparando os valores de RCC nos digeridos, os quais foram inferiores a 12% para todos os digeridos. Mesmo com maior valor de RCC (11,3%, massa de carbono/massa da amostra), foi escolhida a solução de HNO₃ 2 mol L⁻¹ para a decomposição das amostras, pois as recuperações foram satisfatórias para todos os analitos.

Ashoka *et al.*,³⁵ fizeram um estudo comparativo entre diferentes métodos de preparo de amostra para decomposição de peixe e CRMs (fígado de peixe - DOLT-3 e tecido de peixe - IAEA-407), visando a determinação de 41 elementos por ICP-MS. Neste estudo, os autores comparam os métodos de decomposição por via úmida com bloco digestor, via seca e MAD em sistema fechado. A decomposição por via úmida foi feita utilizando diferentes soluções ou misturas de ácidos: i) 3 mL de HNO₃ e 2 mL HCl concentrados, com aquecimento em banho maria a 85 °C por 2 h; ii) 3 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ 30% (v/v) , com aquecimento em banho maria a 85 °C por 2 h; iii) 3 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL de H₂O₂ 30% (v/v), empregando MAD a 180°C por 1 h; iv) 3 mL de HNO₃ concentrado e 2 mL H₂O₂ 30% (v/v), empregando MAD em sistema de alta pressão a 180°C por 1 h; v) 5 mL HNO₃ concentrado decomposição de cinzas da amostra (preparadas a 450°C por 36 h), em sistema

⁹ Cid *et al.*, *Food Chem.*, 2001, 75, 93-100.

³¹ Flores *et al.*, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1865-1870

³⁵ Ashoka *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2009, 653, 191-199.

aberto, com aquecimento em placa de aquecimento. De um modo geral, os autores relataram que os métodos por via úmida em sistema aberto foram morosos, ineficientes na decomposição da matéria orgânica e a perda dos analitos voláteis na decomposição foi significativa, sendo que os melhores resultados foram obtidos por MAD.

López *et al.*,⁶ propuseram a determinação de Cd, Cu, Pb e Zn em amostras de lagosta e determinação por ICP OES. A decomposição das amostras (100 mg) foi feita por MAD em sistema fechado, onde foi utilizada uma mistura de 3 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹ e 1 mL de H₂O₂ 35% (v/v). O programa de aquecimento do forno micro-ondas foi de 25 min e a temperatura máxima atingida durante a decomposição foi de 170 °C. Para avaliação da exatidão do método, foram feitos ensaios de recuperação, onde as recuperações variaram entre 80 e 110%.⁶

Meche *et al.*,⁷ fizeram a determinação de Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sn, Sr, e Zn em amostras de diferentes espécies de peixes do Rio Piracicaba (Piracicaba, SP, Brasil). Os 14 analitos foram determinados por ICP OES e a decomposição das amostras foi feita com 10 mL HNO₃ concentrado utilizando a MAD, foi atingida uma temperatura máxima de 180 °C e tempo de aquecimento de 20 min. A exatidão do método foi avaliada com ensaios de recuperação, as quais variaram entre 93 e 104%.⁷

Cabe ressaltar que, os métodos assistidos por radiação micro-ondas, vêm sendo amplamente utilizados devido às vantagens associadas como rapidez, segurança, menor geração de resíduos, boa eficiência de decomposição de diferentes matrizes, compatibilidade dos digeridos com diferentes técnicas de quantificação, baixo risco de perda de analitos voláteis e a decomposição de um número considerável de amostras simultaneamente.^{6-8,11,12,25,31,35-39}

Neste sentido, têm sido reportados na literatura trabalhos de decomposição por via úmida que visam à redução de resíduos gerados durante o preparo de amostras,

⁶ López *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2003, 54, 223-228.

⁷ Meche *et al.*, *Microchem. J.*, 2010, 94, 171-174.

⁸ Chakraborty *et al.*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 355, 43-47.

¹¹ Nemati *et al.*, *J. Hazard. Mater.*, 2010, 182, 453-459.

¹² Krug, J. F., Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 2010, p. 340.²⁵ Gontad *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 1165-1172.

³¹ Araújo *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, 2121-2132.

³⁵ Ashoka *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, 2009, 653, 191-199.

³⁶ Lambie, K. J.; Hill, S. J., *Analyst*, 1998, 123, 103-133.

³⁷ Limbeck, A., *Anal. Chim. Acta*, 2006, 575, 114-119.

³⁸ Gesto *et al.*, *Talanta*, 2007, 72, 1178-1185.

³⁹ Bizzi *et al.*, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

principalmente no que diz respeito à utilização de ácidos diluídos, porém sem a perda de eficiência de decomposição. Dentre estes métodos, pode-se destacar métodos de MAD-O₂ e MAD-UV.^{14,15}

2.3.2. Decomposição assistida por micro-ondas pressurizada com oxigênio

Recentemente, tem sido relatado na literatura o emprego de sistemas fechados assistidos por radiação micro-ondas com frascos pressurizados com oxigênio para a decomposição de amostras com elevado teor de matéria orgânica, porém utilizando ácidos diluídos. A eficiência de decomposição com ácidos diluídos em sistemas fechados pressurizados com oxigênio e HNO₃ diluído, foi discutida em um trabalho desenvolvido por Bizzi *et al.*¹⁵ Neste trabalho, os autores reportaram que durante o processo de oxidação da matéria orgânica com HNO₃ diluído, possivelmente ocorre a formação de espécies nitrogenadas provenientes da decomposição deste ácido, onde o NO_(g) desempenha um papel importante. Esta espécie (NO_(g)), na presença de O_{2(g)} em excesso, pode proporcionar a regeneração *in situ* do HNO₃ no frasco de decomposição, permitindo, desta forma, uma eficiência de decomposição similar às obtidas empregando HNO₃ concentrado. O procedimento proposto foi desenvolvido com amostras de fígado bovino (100 e 500 mg). Foram avaliadas diferentes concentrações de HNO₃ (entre 0,1 e 14 mol L⁻¹) e pressões de oxigênio entre 5 e 20 bar. Os resultados mostraram que a pressão de 5 bar de oxigênio e o uso de HNO₃ 2 mol L⁻¹ foram suficientes para a decomposição completa da amostra (RCC inferior a 15%). Adicionalmente, também foi feito um experimento sem a presença de oxigênio e, também, na presença de 20 bar de argônio. Foi observado pelos autores que a decomposição na ausência de oxigênio ou com 20 bar de argônio, os digeridos apresentaram resíduos sólidos em suspensão e coloração fortemente amarelada, evidenciando a necessidade do O_{2(g)} para o processo de regeneração do HNO₃. Nas condições ideais informadas pelos autores (HNO₃ 2 mol L⁻¹ e 5 bar de oxigênio)³⁹, foi possível decompor até 500 mg de amostra, com RCC inferior a 14%. A exatidão foi

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

³⁹ Bizzi *et al.*, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

avaliada aplicando o método proposto em CRMs e os resultados apresentaram concordância com os valores certificados entre 96 e 105%.¹⁵

Em outro trabalho desenvolvido por Bizzi *et al.*,³⁹ foram decompostas amostras de plantas utilizando o método MAD-O₂. Foram avaliadas concentrações de HNO₃ de 2 a 14 mol L⁻¹ e pressões de oxigênio entre 5 e 20 bar para a decomposição das amostras e subsequente determinação de Al, Ca, Fe, K, Mg e Na por ICP OES. Os autores observaram que utilizando uma solução de HNO₃ 3 mol L⁻¹ e pressão de oxigênio de 5 bar, foi possível decompor eficientemente 500 mg de amostra. Os digeridos finais apresentaram um teor de ácido residual inferior a 8% e RCC inferior a 5%.³⁹

O método MAD-O₂ também foi aplicado para a decomposição de amostras de leite em pó, utilizando HNO₃ 2 mol L⁻¹ e pressão de 7,5 bar de oxigênio para a subsequente determinação de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na e Zn por ICP OES. A concentração de Hg também foi determinada, porém foi empregada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração química de vapor (CVG-ICP-MS).⁴⁰ Nestas condições, foi possível decompor até 500 mg de amostra, com RCC inferior a 10%. A exatidão do método foi avaliada através do uso de CRMs, onde foram obtidas concordâncias entre 95 e 104% com os valores certificados.⁴⁰

2.3.3. Decomposição assistida por micro-ondas e radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta (UV) constitui a porção do espectro eletromagnético situada entre a região do visível e raios-X, com comprimentos de onda (λ) entre 40 e 400 nm. Esta radiação contém energia suficiente para promover transições eletrônicas nas ligações químicas de vários compostos, em especial moléculas orgânicas. A primeira etapa que ocorre nas reações que empregam radiação UV (também chamadas reações fotoquímicas) é a absorção de energia, ocasionando a formação de espécies excitadas que, em sua maioria são muito instáveis, as quais evoluem por meio de processos não fotoquímicos (secundários), podendo dar origem a rearranjos internos, ionização, ou ainda, na quebra de ligações químicas.¹² A cisão homolítica de

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.

¹⁵ Bizzi *et al.*, *Anal. Methods*, 2010, 2, 734-738.

³⁹ Bizzi *et al.*, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

⁴⁰ Bizzi *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2011, 66, 394-398.

ligações químicas resulta em moléculas dotadas de elétrons desemparelhados, gerando radicais livres, os quais geram espécies extremamente reativas, com características oxidantes.¹²

Em solução aquosa, este processo pode envolver a formação de agentes oxidantes intermediários, como o O₃ e H₂O₂. No entanto, de um modo geral, o radical hidroxila ([•]OH) pode ser considerado uma das principais espécies oxidantes presentes no meio reacional. Além disso, a geração de radicais livres pode ser potencializada com a utilização de agentes auxiliares, como H₂O₂, NO₂⁻, NO₃⁻, de acordo com as equações de 1 a 7.^{12,41-43}



A formação de radicais livres e a sucessiva clivagem dos compostos orgânicos de alta massa molecular é o ponto chave do preparo de amostra com emprego da radiação UV, pois resulta em eficiente decomposição ou, pelo menos, na fragmentação de estruturas orgânicas complexas que poderiam interferir na etapa de quantificação.⁴²

A decomposição empregando a radiação UV tem sido utilizada para amostras líquidas, como águas naturais, efluentes de sistemas de tratamento de esgoto doméstico e industriais, fluídos biológicos, bebidas e extratos de solos.⁴² Sua utilização tem ganhado destaque com o aprimoramento das técnicas eletroquímicas, as quais requerem o uso de soluções com baixo teor de matéria orgânica dissolvida.¹⁴ Por isso, a oxidação completa dos constituintes da matriz, principalmente em amostras

¹² Krug, J. F., *Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar*, 2010, p. 340.³⁹ Bizzi *et al*, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

⁴¹ De Laat *et al.*, *Chemosphere*, 1999, 39, 15, 2693.

⁴² Golimowski, J.; Golimowska, K., *Anal. Chim. Acta*, 1996, 325, 111-133.

⁴³ Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R., *Quim. Nova.*, 2003, 26, 913-921.

biológicas, é de extrema importância para obter resultados com exatidão e precisão satisfatórios.

Com a aplicação simultânea da radiação micro-ondas e UV, tem-se um sinergismo entre o efeito térmico e a ação fotoquímica. Este tipo de sistema apresenta elevada eficiência devido à lâmpada UV ser ativada pela radiação micro-ondas e se encontrar imersa na solução. Este procedimento apresenta algumas desvantagens, como a não possibilidade de ativação da lâmpada à baixas temperaturas e os superaquecimentos, podem causar falhas de emissão de radiação micro-ondas, interrompendo a emissão do radiação UV.¹²

As lâmpadas UV são confeccionadas em quartzo e preenchidas com argônio e vapor de Cd à baixa pressão. Essas lâmpadas em temperaturas de 250 a 280 °C atingem as condições ideais de pressão de vapor (0,001 a 0,02 Torr) para a geração de radiação UV na região entre 200 e 280 nm. A lâmpada UV é constituída por uma haste contendo uma lâmina de Mo, recoberta em quartzo, que desempenha o papel de antena que absorve a radiação micro-ondas. A oscilação do campo eléctrico é transmitida para o filamento de W, localizado entre a placa de Mo e o bulbo de quartzo, que excita os vapores de Cd, emitindo a radiação UV no comprimento de onda principal de 228 nm.^{12,14,43}

O uso da MAD-UV, de um modo geral, reduz o tempo de preparo da amostra e os digeridos apresentam baixos valores de RCC. Entretanto, o uso de frascos que suportam altas pressões exige precauções adicionais de segurança e fornos de micro-ondas apropriados, sendo estes itens fundamentais para a segurança do operador.¹²

Em geral, a degradação de materiais sólidos com elevado teor de carbono não é satisfatória em procedimentos foto-oxidativos convencionais. Uma alternativa proposta em 2001 por Florian e Knapp,¹⁴ permite que matrizes orgânicas complexas sejam eficientemente decompostas com o emprego simultâneo da radiação micro-ondas e UV.¹⁴ Os autores desenvolveram lâmpadas UV ativadas por radiação micro-ondas, inseridas em frascos de decomposição convencionais para a digestão de leite desnatado. Os resultados obtidos apresentaram algumas vantagens quando

¹² Krug, J. F., Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 2010, p. 340.³⁹ Bizzi et al, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

²⁵ Gontad et al., *Eur. Food Res. Technol.* 2008, 227, 1165–1172.

⁴³ Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R., *Quim. Nova.*, 2003, 26, 913-921.

comparados aos sistemas convencionais de decomposição com radiação UV, pois foi observada uma maior eficiência de decomposição.²⁵ O tempo de preparo das amostras também foi reduzido em cerca de cinco vezes e os teores de RCC foram da ordem de 50 vezes inferiores empregando o sistema MAD-UV. Mesmo com o uso de pequenos volumes de agentes oxidantes (HNO_3 e H_2O_2), a concordância entre os resultados obtidos e valores certificados para Cd, Cu, Fe e Pb foram entre 96 e 112%. As determinações dos analitos foram feitas por GF AAS e o RCC foi determinado por ICP OES.¹⁴

Recentemente Pereira *et al.*,⁴⁴ fizeram a decomposição de amostras de petróleo bruto para a determinação dos elementos da série do lantanídeos (Ce, Dy, Er, Eu, Ho, Gd, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, Y e Yb) por ICP-MS com nebulizador ultrassônico (USN). Os autores avaliaram o uso de uma mistura entre HNO_3 (entre 1 e 14 mol L^{-1}) e H_2O_2 (entre 1 e 4 mol L^{-1}). Com o método proposto foi possível decompor cerca de 500 mg da amostra, utilizando a mistura de 5 mL de HNO_3 4 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 4 mol L^{-1} . Com estas condições foram obtidos valores de RCC inferiores a 13%. Os LOQs para os elementos avaliados foram consideravelmente baixos, entre 0,3 e 2,0 ng g^{-1} . Cabe destacar que a concordância entre os métodos MAD e MAD-UV foi entre 97 e 108%, empregando USN-ICP-MS para quantificação dos analitos. Adicionalmente, foi feita a determinação de La, Sm e Yb por análise por ativação neutrônica (NAA), e a concordância com o método MAD-UV foi entre 84 a 114%.⁴⁴

¹⁴ Florian, D.; Knapp, G., *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

⁴⁴ Pereira *et al*, *Anal. Chem.*, 2013, 85, 11034-11040.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Instrumentação

A determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb foi feita em um espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer, modelo AA800, EUA), equipado com sistema de atomização com forno de grafite, corretor de fundo por efeito Zeeman, amostrador automático (modelo AS92), com aquecimento transversal do tubo e lâmpadas de cátodo oco como fonte da radiação. As condições de operação do espectrômetro estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de operação do equipamento de GF AAS.

Parâmetros	Elementos				
	As	Cd	Cu	Cr	Pb
Comprimento de onda (nm)	193,7	228,8	324,8	357,9	283,3
Fenda espectral (nm)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Corrente da lâmpada (mA)	18	4	15	25	10

Os analitos também foram determinados utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer SCIEX, modelo ELAN DRC II, Canadá), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard[®], tipo A, EUA), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália), tocha de quartzo com tubo injetor de 2 mm d.i., cone de amostragem e *skimmer* de platina. O plasma foi gerado a partir de argônio de alta pureza (99,998%, White Martins, Brasil). Na Tabela 2, estão mostradas as condições de operação do equipamento de ICP-MS.

A determinação do teor de carbono residual (RCC) foi feita empregando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (PerkinElmer, modelo Optima 4300 DV, EUA) com vista axial, com uma tocha de quartzo (Glass Expansion, Inc.) com tubo injetor de quartzo (2 mm d.i.), câmara de nebulização

ciclônica (Glass Expansion, Inc.) e nebulizador concêntrico (Meinhard®). As condições operacionais para a determinação de RCC estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições operacionais dos equipamentos de ICP-MS e ICP OES.

Parâmetros	ICP-MS	ICP OES
Potência do gerador de rádio frequência (W)	1300	1500
Vazão do gás principal (L min ⁻¹)	15	14
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,2	1,0
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	1,10	0,70
Lente iônica	<i>auto lens on</i>	-
Isótopos monitorados (<i>m/z</i>)	⁷⁵ As, ¹¹¹ Cd, ⁶³ Cu, ⁵² Cr e ²⁰⁶ Pb	-
Comprimento de onda (nm)	-	C 193,091

As amostras foram digeridas em forno micro-ondas (Anton Paar, modelo Multiwave 3000®, Áustria), equipado com um rotor com capacidade para até 8 frascos de quartzo, com volume interno de 80 mL e sistema de controle de pressão e temperatura (pressão e temperatura máximas de operação de 80 bar e 280 °C, respectivamente). O equipamento dispõe de sensores de temperatura e pressão que permitem o acompanhamento destes parâmetros em tempo real e, ainda, permitem o monitoramento da potência irradiada durante a execução do programa de aquecimento. A descontaminação dos frascos de quartzo, bem como os suportes de teflon usados nas decomposições com lâmpadas UV foram feitos com 6 mL de HNO₃ concentrado. O programa de aquecimento do forno micro-ondas para este procedimento consistiu de: *i*) 1000 W durante 10 min; *ii*) 0 W durante 20 min (etapa de resfriamento). As lâmpadas UV foram descontaminados mergulhando em HNO₃ 14 mol L⁻¹ e aquecendo em placa de aquecimento por 30 min. Após, todo o material (frascos de quartzo, lâmpadas de radiação UV e tampas de Teflon®) foram lavados com água ultrapura.

A secagem das amostras foi feita em estufa ou por liofilização empregando um liofilizador (Liobras, modelo LIOTOP L101, Brasil). Após a secagem, as amostras foram cominuídas em moinho criogênico (Spex CertiPrep, modelo 6750, EUA). As pesagens

foram feitas em uma balança analítica com resolução de 0,0001 g e capacidade máxima de 210 g (Bioprecisa, modelo FA2104N, Brasil). A lavagem das vidrarias e o preparo das soluções foram feitos utilizando água ultrapura (resistividade de 18,2 M Ω cm), obtida a partir de um sistema de purificação (Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q UV3[®], EUA).

Os tratamentos estatísticos foram feitos com auxílio do programa *InStat*, versão 3.0 (Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc., Microsoft Corporation). Para comparação de médias foi usado o teste *t-student*. Para a comparação de duas ou mais médias, foi usada a análise de variância (ANOVA), optando-se pelo teste de múltiplas comparações de *Tukey-Kramer*, com um nível de confiança de 95%.

3.2. Reagentes

Todas as soluções foram preparadas utilizando água ultrapura. As soluções de referência aquosas para determinação por GF AAS foram preparadas por diluição adequada de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de As, Cd, Cu, Cr e Pb (Merck, Alemanha) em HNO₃ 5% (v/v). Como modificador químico para as determinações por GF AAS, foi avaliado o uso de uma solução de 1000 mg L⁻¹ de Pd (Merck). Para os métodos de decomposição, foram utilizados HNO₃ concentrado (65 %, d = 1,39 g mL⁻¹, Merck) ou diluições a partir deste ácido e H₂O₂ 30% (d = 1,11 g mL⁻¹, Merck).

A calibração do instrumento de ICP-MS foi feita empregando soluções de referência preparadas a partir de solução de estoque multielementar contendo 10 mg L⁻¹ (SCP33MS, SPC Science, Canadá). A curva de calibração para as medições por ICP-MS foi feita com concentrações entre 0,025 e 10 μ g L⁻¹ para todos os analitos.

As soluções de referência de carbono usadas para a determinação do RCC por ICP OES foram preparadas a partir da dissolução de ácido cítrico (Merck) em água, com contração de 10 a 750 mg L⁻¹. Como padrão interno foi utilizada soluções de ítrio (1 mg L⁻¹, Spex CertPrep), adicionadas em todos os digeridos, soluções de referência e brancos.

Toda a vidraria e demais materiais de laboratório, foram descontaminados por imersão em solução de HNO₃ 10% (v/v) durante 48 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura. O material volumétrico foi seco à temperatura ambiente, enquanto que o material não volumétrico foi submetido à secagem em estufa a 50 °C.

Para a pressurização dos frascos de quartzo, quando empregada a MAD-O₂, foi utilizado oxigênio (White Martins) com pureza de 99,999%.

3.3. Amostras

As amostras de crustáceo *Sergio mirim* (Figura 2) foram coletadas na região sul do Rio Grande do Sul, na praia do Cassino, Rio Grande/RS.



Figura 2. Imagem do *Sergio mirim*.

A coleta das amostras foi feita com auxílio de uma bomba de sucção confeccionada em PVC, com 10 cm de diâmetro. As coletas foram feitas em diferentes pontos da praia do Cassino (Figura 3), nos meses de novembro de 2012 (navio Altair) e em maio de 2013 (Farol Sarita). Após a coleta, as amostras foram transportadas para o laboratório (sob refrigeração), lavadas com água com água ultrapura e conservadas a -20 °C. Em seguida, as amostras foram classificadas por sexo e idade. Após a identificação, as amostras foram submetidas a procedimentos de secagem (80 °C em estufa, por 48 h) ou liofilização (por 24 h) e, em seguida, cominuídas em moinho criogênico, com 2 ciclos de congelamento e 2 ciclos de moagem.

Para o desenvolvimento e otimização dos métodos de preparo, foram utilizadas amostras de *Sergio mirim* inteiro (sem a separação entre casca e tecido), as quais passaram pelos mesmos processos de secagem e moagem, porém sem distinção de sexo e idade.



Figura 3. Pontos de coleta das amostras de *Sergio mirim*.

3.4. Decomposição das amostras

Foram avaliados três métodos de preparo de amostras (MAD, MAD-O₂ e MAD-UV) para subsequente determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS e ICP-MS.

3.4.1. Decomposição assistida por micro-ondas

O procedimento MAD constituiu no uso das condições recomendadas pela literatura,^{5,6,11} onde foram pesados, aproximadamente, cerca de 500 mg de amostra, a qual foi transferida para os frascos de decomposição de quartzo. Em seguida, foram adicionados 6 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹ e os frascos foram submetidos ao programa de aquecimento, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de aquecimento para o método MAD.

Etapa	Potência (W)	Permanência (min)	Rampa (W min ⁻¹)	Exaustão
1	1000	-	5	Fan 1
2	1000	10	-	Fan 1
3	0	20	-	Fan 2

⁵ Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B*, 1989, 12, 1209-1220.

⁶ López *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2003, 54, 223-228.

¹¹ Nemati *et al.*, *J. Hazard. Mater.*, 2010, 182, 453-459.

Após a decomposição, o rotor foi retirado do forno de micro-ondas e introduzido no interior da capela, onde a pressão dos frascos foi cuidadosamente aliviada. Em seguida, os digeridos foram aferidos a 30 mL com água ultrapura. Por fim, a concentração de As, Cd, Cu, Cr e Pb foi determinada por GF AAS e ICP-MS. O RCC dos digeridos foi determinado por ICP OES.

3.4.2. Decomposição assistida por micro-ondas pressurizada com oxigênio

O método de MAD-O₂ proposto neste trabalho, consistiu na utilização de um forno micro-ondas convencionalmente empregado nas decomposições por via úmida. Neste caso, o frasco de quartzo foi pressurizado com oxigênio, conforme descrito por Bizzi, *et al.*¹⁵ Inicialmente, foram pesados cerca de 500 mg de amostra, a qual foi transferida para os frascos de quartzo juntamente com 6 mL de HNO₃ 3 mol L⁻¹. Os frascos foram fechados e pressurizados com oxigênio (10 bar), através da válvula originalmente projetada para alívio de pressão após a decomposição.^{15,39} O programa de aquecimento utilizado foi o mesmo do método MAD e está mostrado na Tabela 3. Após a decomposição, a pressão nos frascos foi cuidadosamente aliviada e os digeridos foram aferidos a 30 mL com água ultrapura. A concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb nos digeridos foi determinada por ICP-MS e o RCC determinado por ICP OES.

3.4.3. Digestão assistida por micro-ondas e radiação ultravioleta

O método MAD-UV foi desenvolvido com base no trabalho desenvolvido por Florian e Knapp.¹⁴ Desta forma, foram pesados cerca de 500 mg de amostra e transferidos para frascos de quartzo do forno de micro-ondas. Em seguida, foram inseridas as lâmpadas UV nos frascos e adicionados 15 mL de HNO₃ diluído ou mistura com H₂O₂. O volume 15 mL da solução para decomposição foi selecionado de acordo com recomendação do fabricante, uma vez que o bulbo da lâmpada UV deve ficar totalmente submerso na solução. O programa de aquecimento utilizado para o método MAD-UV está mostrado na Tabela 4.

¹⁴ Florian *et al.*, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1515-1520.

¹⁵ Bizzi *et al.*, *Anal. Methods*, 2010, 2, 734-738.

³⁹ Bizzi *et al.*, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

Tabela 4. Programa de aquecimento do forno micro-ondas para MAD-UV.

Etapa	Potência (W)	Permanência (min)	Rampa (W min ⁻¹)	Exaustão
1	400	10	10	Fan 2
2	900	10	10	Fan 2
3	0	20	-	Fan 3

Após a decomposição, a pressão nos frascos foi cuidadosamente aliviada, os digeridos finais foram aferidos a 35 mL com água ultrapura. A concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb nos digeridos foi determinada por ICP-MS e o RCC determinado por ICP OES.

Para o método de MAD-UV, foram avaliadas soluções de HNO₃ com concentração de 1, 2, 4 e 7 mol L⁻¹. Além disso, também foram avaliadas misturas contendo de HNO₃ 1 mol L⁻¹ juntamente com 1, 2 ou 3 mL de H₂O₂ (volume total da solução de decomposição sempre mantido em 15 mL).

Na Figura 4, está mostrado um fluxograma com os métodos de preparo de amostra avaliados neste trabalho. Durante a otimização dos métodos MAD, MAD-O₂ e MAD-UV, a determinação dos analito foi feita por ICP-MS, com utilização da amostra de organismo inteiro. Após a otimização dos métodos, as amostras foram separadas por local, sexo e idade, decompostas pelo método MAD e determinadas por GF AAS.

3.5. Determinação do teor de carbono residual

Uma das formas de avaliar a eficiência de decomposição de matrizes contendo carbono é através da determinação do RCC no digerido final. O procedimento de determinação do RCC foi adaptado do trabalho desenvolvido por Flores *et al.*³³ Previamente a determinação, foi adicionado o padrão interno às soluções, as quais foram purgadas com argônio por 1 min, visando a remoção do CO₂ dissolvido na solução para não obter resultados superestimados e reduzir o desvio padrão relativo (RSD) nas determinações por ICP OES. Após a purga, a solução foi levada rapidamente para a determinação, de modo a evitar que a solução absorva novamente

³³ Flores *et al.*, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1865-1870.

o CO_2 do ambiente. O RCC foi expresso em porcentagem de massa de carbono por massa da amostra.

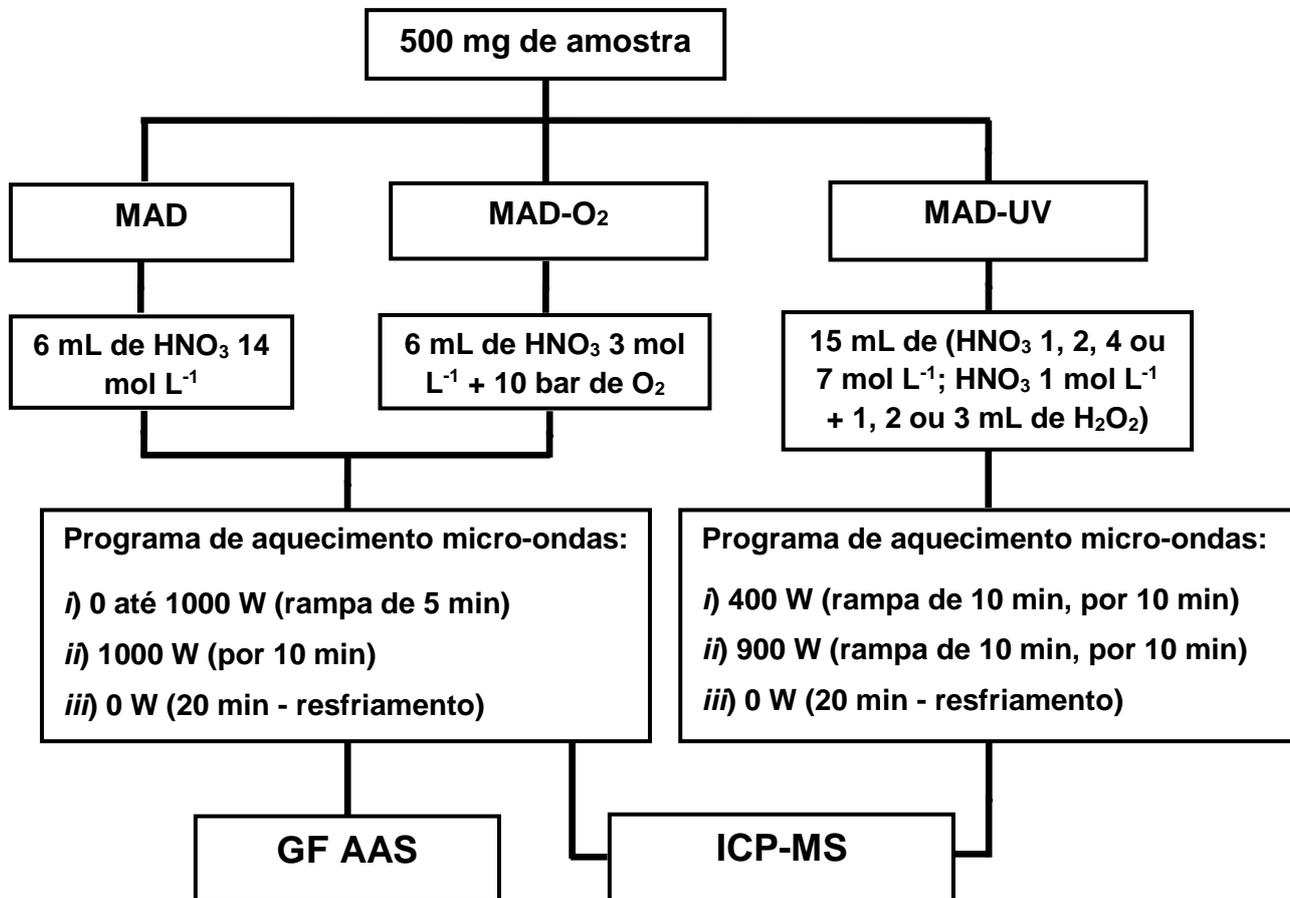


Figura 4. Fluxograma dos métodos avaliados para o preparo das amostras de *Sergio mirim* para posterior determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por ICP-MS e GF AAS (somente após MAD).

3.6. Otimização do programa de aquecimento do equipamento de GF AAS para determinação de As, Cd, Cu, Cr e Pb

Inicialmente, os tubos de grafite foram condicionados termicamente a 2300 °C. As leituras foram feitas após a descontaminação dos tubos, aplicando ciclos de aquecimento consecutivos até que os valores das determinações sem adição de qualquer solução fossem considerados desprezíveis (absorbância integrada inferior a 0,0002 A-s). As curvas de temperatura de pirólise e atomização foram otimizadas

individualmente para cada analito nas soluções de referência e nos digeridos (MAD, ver item 3.4.1 dos Materiais e Métodos). Também foi feita a avaliação do uso de modificador químico, pela adição de 5 μL de solução 1000 mg L^{-1} de Pd (totalizando 5 μg) durante a otimização das curvas de pirólise e atomização para soluções de referência e digeridos. As principais condições do programa de aquecimento do tubo de grafite estão mostradas na Tabela 5.

Tabela 5. Programa de aquecimento para determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS.

Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Rampa ($^{\circ}\text{C s}^{-1}$)	Permanência (s)	Vazão de Ar (L min^{-1})
Secagem	110	1	20	0,25
Secagem	130	15	20	0,25
Pirólise	*	10	15	0,25
Atomização	*	0	5	-
Limpeza	2500	1	3	0,25

*Os valores estão mostrados na otimização feita para cada elemento (Tabela 6 - item 4.2.).

3.7. Limite de detecção e limite quantificação

O LOD é definido como a concentração mínima do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. O LOQ é a concentração mínima que pode ser quantificada com exatidão e precisão aceitáveis. O LOD e o LOQ foram determinados como a concentração equivalente a 3 e 10 vezes o desvio padrão de dez medições do branco, respectivamente.⁴⁸ Para cada método de preparo de amostra e técnicas de detecção, serão apresentados os respectivos valores de LOD e LOQ.

3.8. Exatidão e precisão

Exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A precisão é um termo geral utilizado para avaliar a dispersão de

⁴⁸ INMETRO, http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf acessado em: 01 de novembro de 2013.

resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.⁴⁹

A exatidão e precisão das medições por GF AAS, após decomposição por MAD (n = 3), foi avaliada através da análise de CRMs de músculo de peixe (DORM-2) e tecido de ostra (NIST SRM-1566b). A exatidão foi avaliada de acordo com a concordância entre os valores observados pelas medições empregando MAD e GF AAS com os valores certificados pelos CRMs. Outra forma utilizada para avaliar a exatidão foi a comparação dos resultados obtidos pelo diferentes métodos de decomposição com a determinação pelas técnicas de ICP-MS e GF AAS. A precisão foi expressa como RSD entre as sucessivas medidas.

⁴⁹ BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003 acessado em: 01 de novembro de 2013.

4. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1. Pré-tratamento das amostras

Um ponto importante que foi considerado durante a captura do *Sergio Mirim* foi a maré. Devido à dificuldade de coleta em períodos de maré alta (a zona de captura submersa), todas as coletas foram feitas em períodos de maré baixa. O tamanho dos organismos (aproximadamente 20 organismos por coleta) variaram entre 33 e 110 mm, os quais foram separados em dois grupos, os com tamanho maior que 60 mm (de maior idade) e os com tamanho menor que 60 mm (de menor idade). As amostras também foram classificadas por sexo, onde os machos tem característica de possuir pares de quelas com tamanhos diferentes.

Inicialmente, a secagem das amostras foi feita em estufa a 80 °C durante 48 h. Depois deste período, foi verificado que as amostras apresentaram consistência oleosa devido ao elevado teor de gordura, o que dificultaria uma posterior etapa de moagem. Então, optou-se por utilizar a liofilização. Diferentemente da secagem em estufa, a liofilização mostrou-se adequada para posterior moagem da amostra, pois nesta condição as amostras não apresentaram uma camada oleosa na superfície.

4.2. Avaliação dos métodos de preparo de amostra

Para a avaliação dos métodos de preparo de amostra, o método MAD foi comparado com os métodos MAD-O₂ e MAD-UV. Para MAD-UV, foram avaliadas diferentes concentrações de HNO₃ (1, 2, 4 e 7 mol L⁻¹) e a mistura de HNO₃ 1 mol L⁻¹ com 1, 2 e 3 mL de H₂O₂. Na Tabela 6 estão mostrados os valores de concentração dos analitos (As, Cd, Cr, Cu e Pb) e valores de RCC determinados por ICP-MS e ICP OES, respectivamente. Na Tabela 7, estão mostrados os valores de LOD e LOQ, obtidos para a técnica ICP-MS, após decomposição por MAD, MAD-O₂ e MAD-UV método.

Cabe salientar que, durante a discussão, os métodos de preparo de amostra foram comparados com MAD, devido à MAD ser o método comumente empregado para decomposição de amostras biológicas.^{6-11,27,30,31,35,38}

-
- ⁶ López *et al.*, *Ecotox. Environ. Safe.*, 2003, 54, 223-228.
⁷ Meche *et al.*, *Microchem. J.*, 2010, 94, 171-174.
⁸ Chakraborty *et al.*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 355, 43-47.
⁹ Cid *et al.*, *Food Chem.*, 2001, 75, 93-100.
¹⁰ Rodushkin *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 378, 191-200.
¹¹ Nemati *et al.*, *J. Hazard. Mater.*, 2010, 182, 453-459.
²⁷ Sardans *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2010, 65, 97-112.
³⁰ Mesko *et al.*, *Microchem. J.*, 2006, 82, 183-188.
³¹ Araújo *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, 57, 2121-2132.
³⁵ Ashoka *et al.*, *Anal. Chim. Acta.*, 2009, 653, 191-199.
³⁸ Gesto *et al.*, *Talanta*, 2007, 72, 1178-1185.

Tabela 6. Concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb obtidos por ICP-MS e valores de RCC (% m/m). Os resultados estão expressos em $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ desvio padrão (concordância com MAD, %), n = 3.

Método	Concentração					RCC
	As	Cd	Cr	Cu	Pb	
MAD (HNO_3 14 mol L^{-1})	$10,0 \pm 0,1$	$1,60 \pm 0,033$	$5,51 \pm 0,37$	273 ± 7	$0,562 \pm 0,026$	$7,3 \pm 0,8$
MAD- O_2 (HNO_3 3 mol L^{-1})	$10,6 \pm 0,2$ (106)	$1,67 \pm 0,05$ (106)	$4,76 \pm 0,32$ (87)	280 ± 8 (102)	$0,570 \pm 0,017$ (102)	$13,1 \pm 2,6$
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1} + 3 mL H_2O_2)	$10,7 \pm 0,3$ (107)	$1,70 \pm 0,02$ (106)	$5,08 \pm 0,33$ (92)	278 ± 5 (102)	$0,591 \pm 0,021$ (105)	$5,0 \pm 0,6$
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1} + 2 mL H_2O_2)	$10,2 \pm 0,1$ (102)	$1,62 \pm 0,01$ (100)	$4,70 \pm 0,34$ (85)	$267 \pm 0,8$ (98)	$0,556 \pm 0,005$ (100)	$5,8 \pm 0,6$
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1} + 1 mL H_2O_2)	$10,6 \pm 0,4$ (106)	$1,69 \pm 0,04$ (106)	$4,49 \pm 0,27$ (83)	280 ± 3 (102)	$0,543 \pm 0,045$ (97)	$7,0 \pm 0,4$
MAD-UV (HNO_3 7 mol L^{-1})	$10,1 \pm 0,1$ (101)	$1,57 \pm 0,05$ (100)	$5,10 \pm 0,51$ (93)	251 ± 4 (92)	$0,511 \pm 0,015$ (91)	$5,8 \pm 0,6$
MAD-UV (HNO_3 4 mol L^{-1})	$10,7 \pm 0,1$ (107)	$1,72 \pm 0,01$ (106)	$6,40 \pm 0,50$ (116)	294 ± 3 (107)	$0,639 \pm 0,056$ (111)	$5,0 \pm 0,6$
MAD-UV (HNO_3 2 mol L^{-1})	$11,0 \pm 0,3$ (110)	$1,77 \pm 0,03$ (112)	$6,00 \pm 0,21$ (109)	293 ± 6 (107)	$0,579 \pm 0,044$ (104)	$8,5 \pm 1,3$
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1})	$10,2 \pm 0,2$ (102)	$1,56 \pm 0,08$ (98)	$2,61 \pm 0,26$ (53)	237 ± 50 (87)	$0,469 \pm 0,012$ (84)	$8,3 \pm 1,4$

Tabela 7. Valores de LOD e LOQ para As, Cd, Cr, Cu e Pb determinados por ICP-MS após diferentes métodos de preparo de amostra ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Método de preparo	As		Cd		Cr		Cu		Pb	
	LOD	LOQ								
MAD (HNO_3 14 mol L^{-1})	0,021	0,070	0,002	0,007	0,042	0,140	0,150	0,500	0,004	0,013
MAD- O_2 (HNO_3 3 mol L^{-1})	0,013	0,043	0,002	0,007	0,042	0,140	0,055	0,183	0,002	0,007
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1} + 3 mL H_2O_2)	0,011	0,037	0,001	0,003	0,158	0,527	0,002	0,007	0,002	0,007
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1} + 2 mL H_2O_2)	0,004	0,013	0,001	0,003	0,013	0,043	0,383	1,28	0,002	0,007
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1} + 1 mL H_2O_2)	0,011	0,037	0,019	0,063	0,011	0,037	0,049	0,163	0,004	0,013
MAD-UV (HNO_3 7 mol L^{-1})	0,009	0,030	0,003	0,010	0,096	0,320	0,007	0,023	0,002	0,007
MAD-UV (HNO_3 4 mol L^{-1})	0,002	0,007	0,008	0,027	0,056	0,187	0,174	0,580	0,004	0,013
MAD-UV (HNO_3 2 mol L^{-1})	0,018	0,060	0,001	0,003	0,047	0,157	0,644	2,15	0,002	0,007
MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1})	0,022	0,073	0,003	0,010	0,011	0,037	0,049	0,163	0,002	0,007

Como mostrado na Tabela 6, os resultados para MAD e determinação por ICP-MS foram de $10,0 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, $1,60 \pm 0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd, $5,51 \pm 0,37 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, $273 \pm 7,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e $0,562 \pm 0,026 \mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. De acordo com o aspecto dos digeridos obtidos após aplicação do método MAD, os mesmos apresentaram-se límpidos e com indícios de decomposição completa. Durante a decomposição, os valores de temperatura e pressão máximos obtidos foram de $190 \text{ }^\circ\text{C}$ e 58 bar, respectivamente. Cabe salientar que, estas condições de temperatura e pressão estão abaixo das condições de operação máximas que o equipamento pode atingir. O RCC obtido foi de $7,3 \pm 0,8\%$ (Tabela 6) após decomposição por MAD. Os LODs para a determinação por ICP-MS após MAD (Tabela 7) foram de 0,021; 0,002; 0,042; 0,150 e $0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Cr, Cu e Pb, respectivamente.

Nas determinações após preparo das amostras por MAD-O₂, as concentrações dos analitos foram de $10,6 \pm 0,19 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, $1,67 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd, $4,76 \pm 0,32 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, $280 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e $0,570 \pm 0,017 \mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. Embora os resultados tenham sido bastante concordantes com os obtidos por MAD, os digeridos apresentaram uma coloração fortemente amarelada, evidenciando do ponto de vista qualitativo, a decomposição incompleta da matéria orgânica. Neste caso, o valor de RCC ($13,1 \pm 2,6\%$) foi aproximadamente 2 vezes maior do que o obtido por MAD. Os valores de temperatura e pressão máximas foram de $190 \text{ }^\circ\text{C}$ e 70 bar, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 7, os LODs obtidos para MAD-O₂ foram de 0,013; 0,002; 0,042; 0,055 e $0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Cr, Cu e Pb, respectivamente.

Na determinação por MAD-UV, a concentração foi de $10,6 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, $1,69 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd, $4,49 \pm 0,27 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, $280 \pm 3 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e $0,547 \pm 0,045$ para Pb), para a condição otimizada (HNO_3 1 mol L^{-1} com adição 1 mL de H_2O_2). As amostras decompostas por MAD-UV apresentaram, de um modo geral, um aspecto levemente amarelado e, como esperado, este efeito foi mais pronunciado quando utilizado somente HNO_3 1 mol L^{-1} . Os valores de RCC para MAD-UV (todas as condições avaliadas) variaram entre 5,0 e 8,5%. Os valores máximos de temperatura e pressão foram de $195 \text{ }^\circ\text{C}$ e 58 bar, respectivamente.

Através dos resultados mostrados na Tabela 6, observa-se que da mesma forma que foi identificada visualmente menor eficiência de decomposição para a condição de HNO_3 1 mol L^{-1} , quantitativamente, foi observado um dos maiores valores de RCC (8,3

$\pm 1,4\%$). Esta condição (MAD-UV HNO_3 1 mol L^{-1}) foi a que apresentou os valores mais baixos de concentração para Cr ($2,61 \pm 0,26 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($237 \pm 50 \mu\text{g g}^{-1}$) e Pb ($0,469 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$), isto pode estar relacionado com a disponibilidade dos analitos na solução, devido às condições do meio, tais como o pH, uma vez que se utilizou uma solução de HNO_3 muito diluída. Para MAD-UV, pode-se observar que os LODs (Tabela 7) variaram de 0,002 a 0,022; de 0,001 a 0,019; de 0,011 a 0,158; de 0,002 a 0,644 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de 0,002 a 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Cr, Cu e Pb, respectivamente. Estes valores de LOD podem ser considerados baixos e adequados para as determinações por ICP-MS.

De um modo geral, as concordâncias para As entre os resultados obtidos após MAD- O_2 e MAD-UV e o método de referência (MAD) foram adequadas. Comparando os resultados obtidos para As após MAD- O_2 , pode-se observar uma concordância de 106% em relação ao obtido por MAD. Comparados os resultados obtidos após MAD-UV com MAD, estes apresentaram concordância satisfatória (entre 102 e 106%) para todas as soluções avaliadas. Comparando os valores encontrados para MAD- O_2 e MAD-UV, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) quando comparados com MAD.

Os valores de concentração de Cd obtidos por MAD- O_2 foram concordantes (106%) com os obtidos por MAD. A concordância dos valores obtidos por MAD-UV e MAD esteve entre 100 a 112% para todas as soluções avaliadas. Além disso, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores encontrados para os métodos avaliados. Cabe ressaltar que, mesmo com o uso de HNO_3 em baixas concentrações (1 mol L^{-1}), foi obtida concordância de 100% para Cd (Tabela 6), comparando MAD e MAD-UV. Estes resultados também foram concordantes com o trabalho publicado por Florian e Knapp,¹⁴ no qual foi obtida boa eficiência na decomposição de amostras utilizando soluções diluídas de HNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e 1 mL de H_2O_2 , para posterior determinação de Cd.¹⁴

O método de MAD- O_2 apresentou concordância de 87% para Cr quando comparado com MAD. A decomposição utilizando MAD-UV para determinação de Cr em amostras de *Sergio mirim* mostrou-se eficiente quando foram utilizadas soluções de HNO_3 2, 4 e 7 mol L^{-1} , quando comparadas com MAD (concordância entre 93 e 116%). Por outro lado, o uso de HNO_3 1 mol L^{-1} não foi eficiente, com concordância de 53% com MAD. No entanto, utilizando uma solução de HNO_3 1 mol L^{-1} com adição de H_2O_2

(1, 2 ou 3 mL), houve um aumento significativo da concentração de Cr, que resultou em concordâncias próximas a 100% em comparação com MAD. Além disso, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) comparando MAD-O₂, MAD-UV (em todas as condições, exceto para MAD-UV com HNO₃ 1 mol L⁻¹) e MAD. É importante ressaltar que, a adição de apenas 1 mL de H₂O₂ à solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹ foi suficiente para o aumento significativo da concentração de Cr. Este fato pode ser atribuído à formação de radicais hidroxila no interior do frasco reacional devido à presença de H₂O₂, o que pode evitar a formação de compostos insolúveis de Cr ou a adsorção no frasco de reação.

Empregando a MAD-O₂, a concordância dos resultados para Cu com MAD foi de 102%. Observando os valores encontrados para Cu após MAD-UV, comparados com aqueles encontrados após MAD, pode-se observar concordância entre 92 e 107% para as soluções de HNO₃ 2, 4 ou 7 mol L⁻¹, assim como para a mistura de HNO₃ 1 mol L⁻¹ com 1, 2 ou 3 mL de H₂O₂. No entanto, utilizando uma solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹, a concordância foi de apenas 87%. Em trabalhos descritos na literatura, foi relatada a determinação de Cu em amostras de fígado bovino³⁹ e leite em pó⁴⁰ e determinação por ICP OES, empregando HNO₃ de 2 mol L⁻¹. Nestes casos, foram obtidas concordâncias próximas a 100% com valores certificados dos CRMs analisados.

Da mesma forma que para Cr, para Cu foi observada influência na adição de H₂O₂ à solução de HNO₃ 1 mol L⁻¹, aumentando a eficiência de decomposição, o que possibilitou a obtenção de concordâncias próximas a 100% com adição de apenas 1 mL de H₂O₂. Os valores de Cu, após decomposição por MAD-O₂ e MAD-UV (para todas as condições avaliadas) não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$), quando comparados com a MAD.

De acordo com os resultados para Pb, foi observada concordância de 102%, comparando MAD-O₂ e MAD. Este resultado está de acordo com os encontrados por Bizzi *et al.*,⁴⁰ onde foi feita a decomposição de leite em pó e subsequente determinação de Pb por ICP OES, utilizando HNO₃ 2 mol L⁻¹.⁴⁰ Entretanto, pode-se observar que utilizando o método MAD-UV para digestão de amostras de *Sergio mirim*, com soluções de HNO₃ 2, 4 e 7 mol L⁻¹, a concordância foi satisfatória, quando comparada à MAD, o qual apresentou concordâncias entre 91 e 111%. Entretanto,

³⁹ Bizzi *et al.*, *Talanta*, 2011, 83,1324-1328.

⁴⁰ Bizzi *et al.*, *Spectrochim. Acta Part B*, 2011, 66, 394-398.

quando foi utilizada uma solução de HNO_3 1 mol L^{-1} , a concordância foi de apenas 84%. Da mesma forma que para Cr e Cu, utilizando a mistura de HNO_3 1 mol L^{-1} e H_2O_2 (1, 2, ou 3 mL) a concordância aumentou, onde foram obtidas concordâncias entre 100 e 105%. Também foi possível observar que para Pb, os métodos de MAD- O_2 e MAD-UV (para todas as condições avaliadas) não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$), quando comparados com MAD.

Em resumo, exceto para Cr, quando empregada a decomposição por MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1}), todos os métodos apresentaram boas concordâncias em comparação com MAD e determinação por ICP-MS. No entanto, devido à indisponibilidade de instrumentação neste período do trabalho e por ser o método usual de decomposição de amostras biológicas, optou-se em utilizar a MAD para os experimentos posteriores. Com o objetivo de comparar os resultados obtidos por ICP-MS (após decomposição por MAD), foi utilizada a GF AAS como técnica de comparação.

4.3. Otimização das condições para determinação por GF AAS

O ajuste dos principais parâmetros do programa de aquecimento do forno de grafite geralmente é feito através da otimização das temperaturas de pirólise e atomização. Esta otimização é comumente efetuada nas amostras e nas soluções de referência, com o objetivo de avaliar o comportamento térmico dos analitos nas duas situações, a fim de atingir uma condição de compromisso, onde se obtém maior intensidade de sinal e menor RSD. Além disso, também pode ser feita a avaliação do uso de modificadores químicos, com o objetivo de estabilizar termicamente os analitos ou a matriz. Desta forma, a avaliação das temperaturas de pirólise e atomização ideais para quantificação dos analito foi feita a fim de obter uma condição ideal de operação sem perda do analito, com a eliminação completa da matriz e, conseqüentemente, com baixos sinais de fundo.^{8,9} Para isso, foram avaliadas diferentes temperaturas de pirólise e atomização tanto para as soluções de referência, quanto para as amostras, ambos com e sem o uso de Pd como modificador químico. Para o estudo da temperatura de pirólise, foi mantida a temperatura de atomização recomendada pelo fabricante para cada analito (2000 °C para As, 1500 °C para Cd, 2300 °C para Cr, 1800 °C para Cu e 1600 °C para Pb), enquanto que para o estudo da temperatura de atomização fixou-se

⁸ Chakraborty *et al.*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 355, 43-47.

⁹ Cid *et al.*, *Food Chem.*, 2001, 75, 93-100.

a temperatura de pirólise otimizada para cada analito. Nas Figuras de 5 a 9 estão mostradas as curvas de pirólise e atomização para As, Cd, Cr, Cu e Pb.

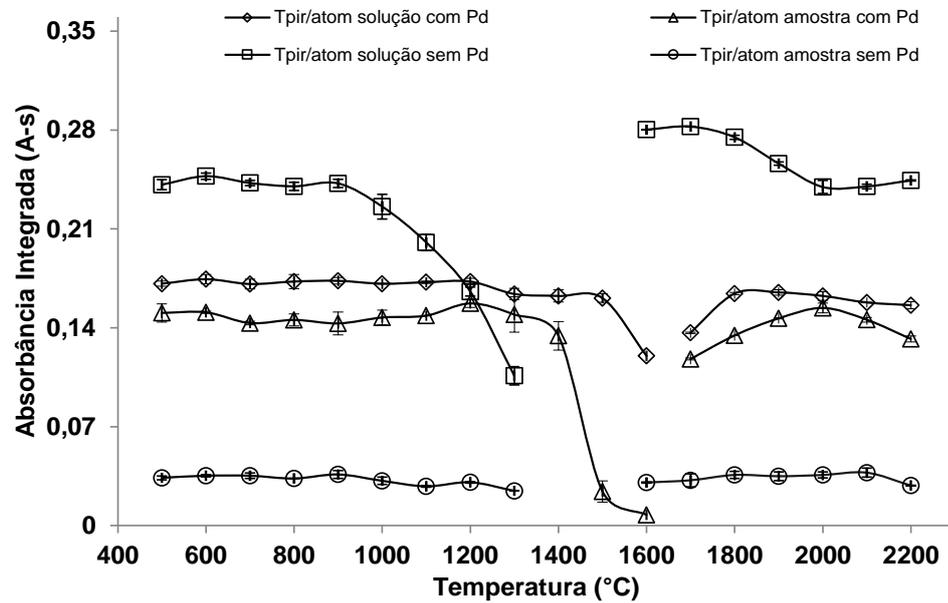


Figura 5. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para As, empregando 20 μL de solução de referência de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$.

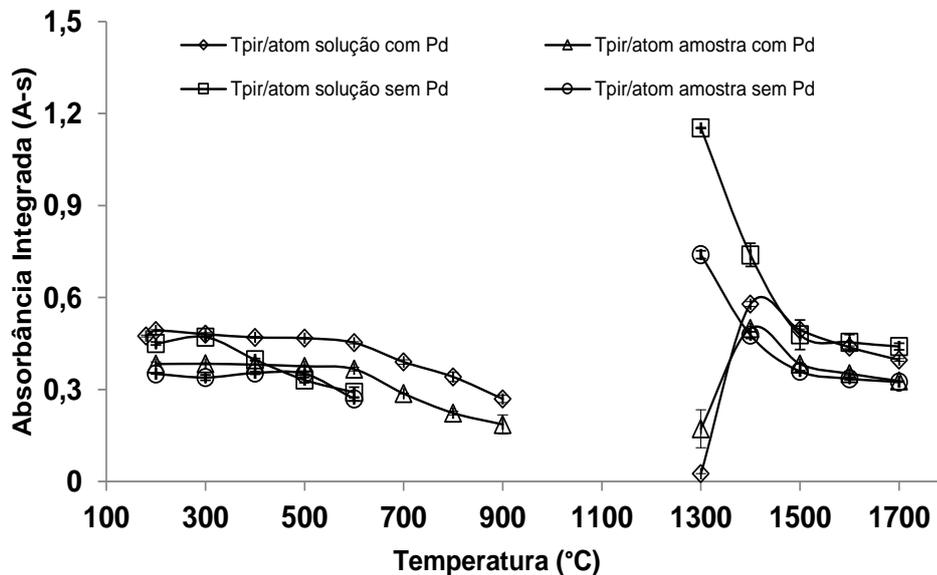


Figura 6. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cd, empregando 20 μL de solução de referência de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$.

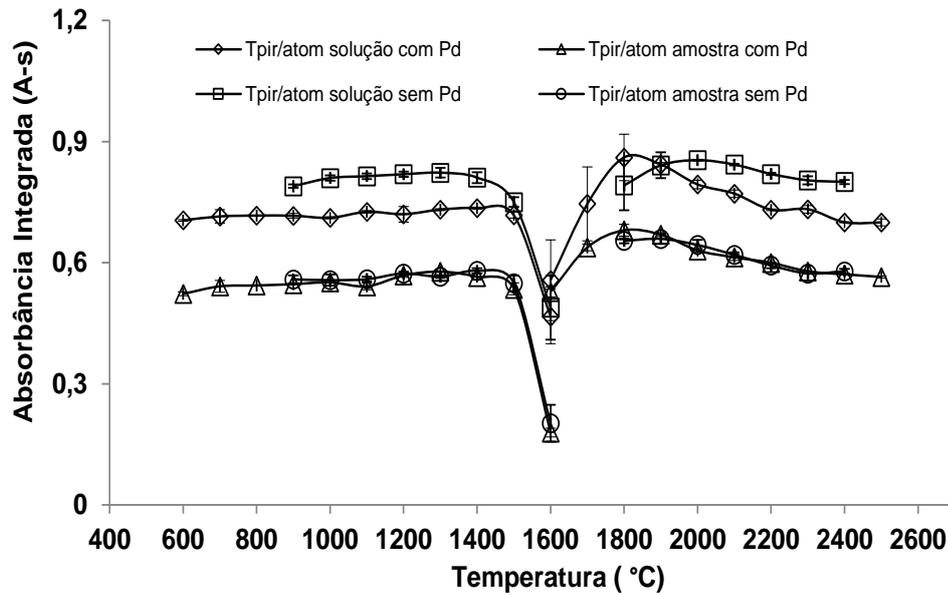


Figura 7. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cr, empregando 20 μL de solução de referência de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$.

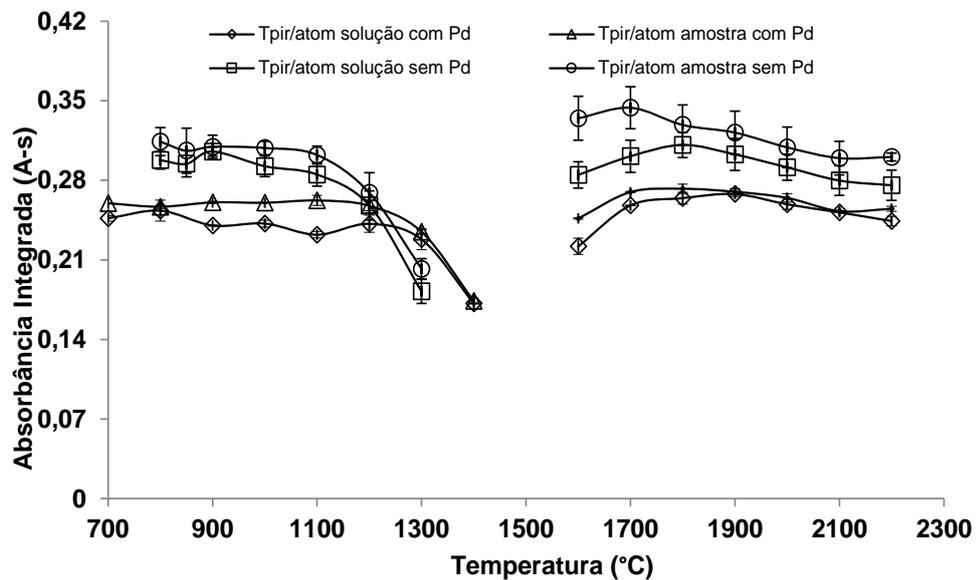


Figura 8. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Cu, empregando 20 μL de solução de referência de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$.

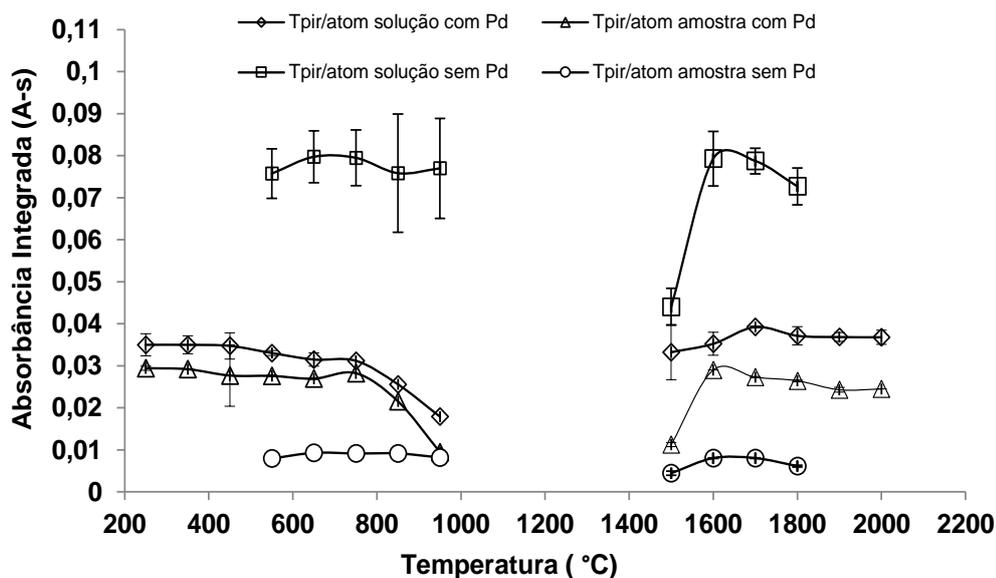


Figura 9. Curvas de temperaturas de pirólise e atomização para Pb, empregando 20 μL de solução de referência de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ ou 20 μL de amostra com adição de 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e 5 μg de Pd (quando necessário). As barras de erro representam o desvio padrão, $n = 3$.

A partir das curvas de pirólise, foi possível observar que para o As (Figura 5), a intensidade de sinal em absorbância começou a diminuir a partir de 900 $^{\circ}\text{C}$ para a solução de referência, sem o uso de Pd. Ao utilizar Pd, verificou-se uma estabilização térmica do analito, o qual permaneceu com intensidade de sinal constante até 1500 $^{\circ}\text{C}$, quando se observou uma diminuição significativa do mesmo. Contrariamente, para as amostras, o uso de Pd não teve influência na estabilização do analito, mas proporcionou um aumento de aproximadamente 3 vezes em intensidade de sinal. Comparando as curvas de pirólise utilizando Pd para a amostra e para solução de referência, observou-se que 1200 $^{\circ}\text{C}$ foi a condição de maior intensidade de sinal para as duas situações. Da mesma forma, na atomização, foi observado o mesmo comportamento no que diz respeito à intensidade de sinal para a amostra, solução de referência com e sem o uso de Pd. Comparando as curvas de atomização para a amostra e solução de referência com Pd, observou-se que em 1800 $^{\circ}\text{C}$ obteve-se maior intensidade de sinal para a solução. Entretanto, para a amostra, a temperatura com maior intensidade de sinal foi de 2000 $^{\circ}\text{C}$. Assim, esta foi a temperatura escolhida,

pois foi considerada a condição de compromisso entre a atomização na amostra e a solução de referência.

Conforme mostrado na Figura 6, o uso de Pd para Cd mostrou uma estabilização térmica do analito até 600 °C para as soluções de referência. Comparando com a situação em que não foi usado Pd, foi observada uma redução na intensidade do sinal a partir de 300 °C. O mesmo comportamento foi obtido para a amostra na pirólise, onde a intensidade de sinal começou a diminuir a partir de 600 °C utilizando Pd. Sem o uso de Pd, o sinal para amostra começou a perder em intensidade a partir de 500 °C. No entanto, a temperatura de 500 °C foi escolhida como a condição ideal de pirólise utilizando Pd, considerando a temperatura com maior intensidade de sinal para amostra e solução de referência. Na atomização, quando não foi utilizado Pd, foram observados sinais arrastados nas temperaturas de 1300 e 1400 °C para a amostra e solução de referência, respectivamente. Por isso, estas temperaturas não foram consideradas para a escolha da temperatura de atomização ideal. Dessa forma, foram comparadas as curvas de atomização para a amostra e solução de referência com Pd, e a temperatura de 1500 °C foi escolhida por apresentar a maior intensidade de sinal. Cabe salientar que, de um modo geral, o uso de Pd juntamente com a amostra, proporcionou menores sinais de fundo e uma melhora no perfil dos sinais.

Para Cr (Figura 7), foi observada uma pequena diferença na temperatura de pirólise (1500 °C) na qual começou a ocorrer perda do analito, para a solução de referência utilizando Pd, comparado à situação em que o mesmo não foi utilizado (1400 °C). No entanto, para as amostras, o comportamento foi similar em ambas as situações. Comparando as curvas de pirólise para a amostra e para a solução de referência com Pd, foi observado um perfil bastante similar para as duas, onde a temperatura de 1400 °C foi escolhida como ideal por apresentar a máxima intensidade de sinal em absorbância para ambos. Na atomização, da mesma forma que para o Cd, o uso de Pd também proporcionou uma melhora nos sinais, especialmente em relação à redução do sinal de fundo. Comparando as curvas de atomização para a amostra e solução de referência, a temperatura com máxima intensidade de sinal observada foi de 1800 °C para ambas. No entanto, obteve-se um desvio padrão elevado nesta condição e, por isso, 2000 °C foi escolhida como condição de compromisso entre as duas situações, utilizando Pd.

Conforme mostrado na Figura 8, para Cu também foi observada uma estabilização térmica do analito (até 1200 °C) quando Pd foi utilizado tanto para a amostra quanto para as soluções de referência. Na ausência de Pd, pode-se considerar que a partir de 1100 °C começou a ocorrer perda do analito para ambas as situações. Comparando as curvas de pirólise para a amostra e para a solução de referência utilizando Pd, a condição que apresentou máxima intensidade de sinal para ambas as situações, foi a temperatura de 800 °C, a qual foi escolhida como temperatura ideal. Na atomização, comparando as curvas para amostra e solução de referência com Pd, observou-se que em 1900 °C foram obtidas as máximas intensidades de sinal para ambas e, por isso, esta temperatura foi escolhida como ideal para a atomização de Cu. Cabe ressaltar que, da mesma forma que para Cd e Cr, o uso de Pd também proporcionou uma melhora nos sinais de absorbância e menores sinais de fundo.

Para Pb, inicialmente foi observado que o sinal de absorbância era muito baixo para as amostras e, por isso, foi feita adição de analito após a decomposição para atingir a concentração final de 15 µg L⁻¹. Para Pb, não foi observado decréscimo na intensidade do sinal tanto para a amostra quanto para as soluções de referência sem o uso de Pd. Cabe salientar que, foram obtidos elevados valores de RSD para todas as condições de temperatura avaliadas para a solução de referência sem o uso de modificador químico, mostrando que o uso de Pd diminuiu as diferenças entre as leituras. Além disso, utilizando modificador, foi observado um aumento de sinal (de aproximadamente 4 vezes) para as amostras. A temperatura de pirólise escolhida foi de 650 °C, pois apresentou a maior intensidade de sinal para a amostra utilizando Pd. Para a solução de referência, o sinal mais intenso foi obtido para a temperatura de 750 °C. No entanto, após esta temperatura, começou a ocorrer redução no sinal do analito e, considerando que elementos voláteis como o Cd e Pb, podem ser perdidos na pirólise, 650 °C também foi considerada como condição ideal para a solução de referência, satisfazendo uma condição de compromisso entre as curvas de pirólise na amostra e nas soluções de referência. Na atomização, comparando as curvas para a amostra e solução de referência com Pd, 1600 °C foi escolhida como temperatura de atomização por ser a temperatura que apresentou maior intensidade de sinal para amostra. Para a solução, isso não foi observado, pois a temperatura de atomização que forneceu maior intensidade de sinal foi 1700 °C. No entanto, considerando a

volatilidade do Pb e, a fim de estabelecer uma condição de compromisso entre o comportamento térmico do Pb na amostra e na solução de referência, 1600 °C foi escolhida como temperatura de atomização para o Pb, utilizando Pd. Desta forma, um resumo a respeito das temperaturas de pirólise e atomização otimizadas para cada elemento está mostrada na Tabela 8.

Tabela 8. Temperatura de pirólise e atomização (com uso de 5 µg de Pd) selecionadas para a determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS.

Elemento	Temperatura de pirólise (°C)	Temperatura de atomização (°C)
As	1200	2000
Cd	500	1500
Cr	1400	2000
Cu	800	1900
Pb	650	1600

Após a otimização das condições de operação do instrumento de GF AAS para todos os analitos, como foi encontrada uma condição de compromisso entre as soluções de referência e amostra, foram construídas curvas de calibração com soluções de referência aquosas preparadas a partir de soluções estoque, juntamente com a adição de 5 µg Pd. As curvas apresentaram boa linearidade, com valores de coeficiente de correlação (R^2) maiores que 0,99. Adicionalmente, na Tabela 9 estão mostrados os intervalos de concentração para as curvas de calibração para a determinação dos analito por GF AAS, além de seus respectivos valores de R^2 . As curvas de calibração estão mostradas na Figura 10.

Tabela 9. Faixa de concentração com a faixa linear, coeficientes de correlação e massa característica para As, Cd, Cu, Cr e Pb por GF AAS.

Parâmetro	As	Cd	Cr	Cu	Pb
Intervalo de linearidade ($\mu\text{g L}^{-1}$)	30 - 90	5 - 25	30 - 75	15 - 75	5 - 30
R^2	0,9953	0,9993	0,9957	0,9997	0,9960
Massa característica (pg)	32	2,5	5,5	142	36

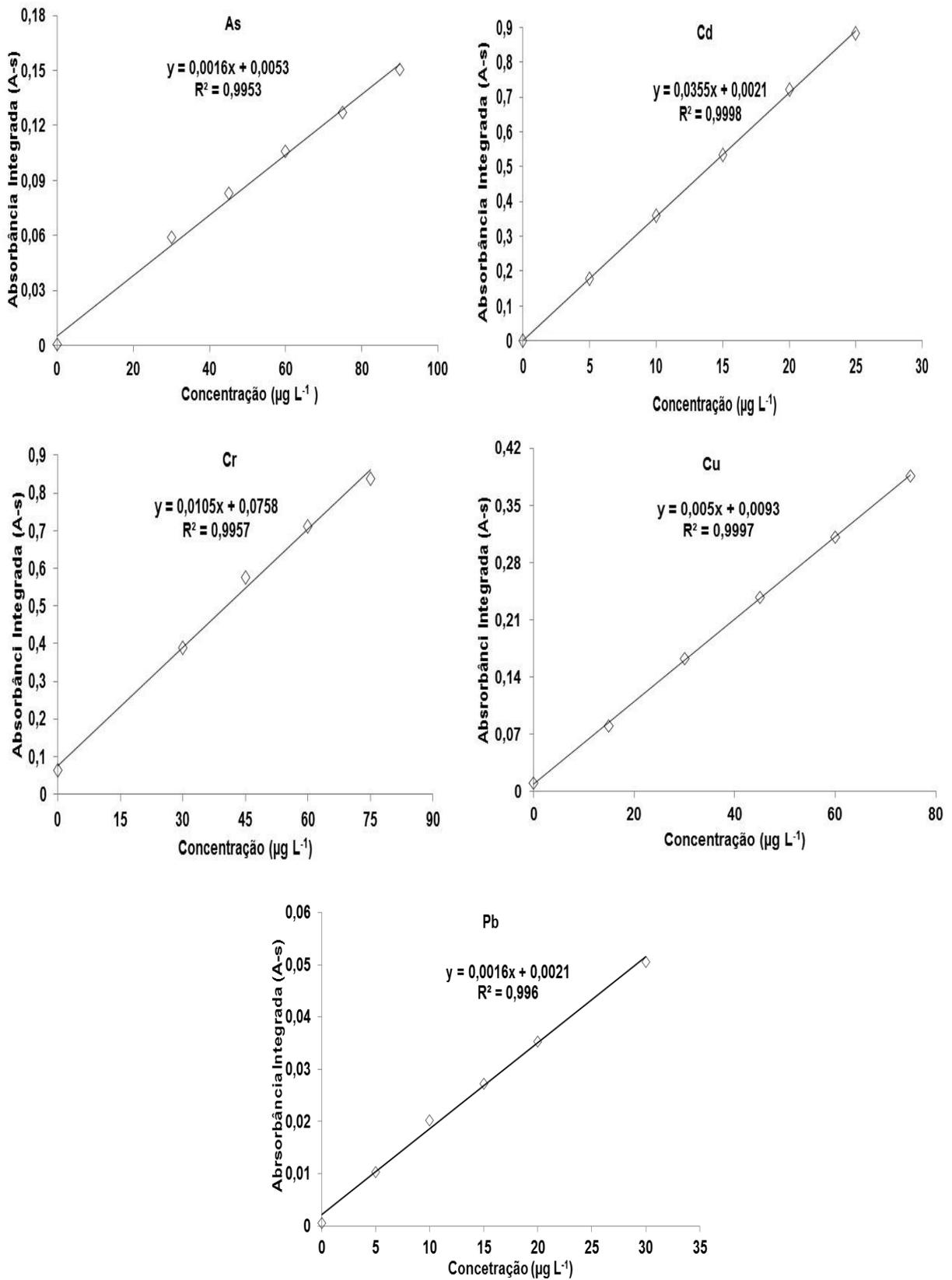


Figura 10. Curvas de calibração para As, Cd, Cr, Cu e Pb, por GF AAS com uso de Pd como modificador químico, n = 3.

4.4. Comparação entre determinação por ICP-MS e GF AAS

Na Tabela 10 estão mostrados os valores de concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb na amostra de *Sergio mirim* inteiro (utilizada na avaliação dos métodos de preparo de amostra) determinados por ICP-MS e GF AAS, após decomposição por MAD.

Tabela 10. Comparação dos resultados pelas técnicas de ICP-MS e GF AAS na determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb nas amostras de *Sergio mirim* após decomposição por MAD (n = 3).

Elemento	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Concordância (%)
	ICP-MS	GF AAS	
As	10,6 \pm 0,1	1,51 \pm 0,10	14
Cd	1,60 \pm 0,03	1,80 \pm 0,03	112
Cr	5,51 \pm 0,37	5,41 \pm 0,21	98
Cu	273 \pm 7	256 \pm 5	94
Pb	0,562 \pm 0,026	0,609 \pm 0,012	108

Foi observado boa concordância entre a concentração dos analitos avaliados neste estudo tanto por ICP-MS quanto por GF AAS, com concordância variando entre 94 e 112% para Cd, Cr, Cu e Pb. No entanto, para As, os resultados foram diferentes, e esta diferença pode ser atribuída ao fato do *Sergio mirim* ter o seu habitat em regiões de praia com alto teor de sal, o que possibilita a incorporação de íons Cl^- . Diversos trabalhos têm relatado que os íons Cl^- geram interferência na determinação de ^{75}As por ICP-MS devido à formação de íons poliatômicos no plasma pela combinação de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, enriquecendo o sinal do isótopo $^{75}\text{As}^+$.^{49,50} Por outro lado, a elevada concentração de carbono também pode contribuir para o aumento do sinal de As, devido a interferências por transferência de carga.⁴⁹

Na Tabela 11, estão mostrados os valores de LOD e LOQ para As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS.

⁴⁹ Antes *et al.*, *Talanta*, 2010, 83, 364-369.

⁵⁰ Todolí, J. L.; Mermet, J. M., *Spectrochim. Acta Part B.*, 2006, 61, 239-283.

Tabela 11. Valores de LOD e LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) para As, Cd, Cu, Cr e Pb por GF AAS e ICP-MS após MAD.

Elemento	GF AAS		ICP-MS	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
As	0,036	0,120	0,021	0,070
Cd	0,003	0,010	0,002	0,007
Cr	0,049	0,163	0,042	0,140
Cu	0,277	0,923	0,150	0,500
Pb	0,018	0,060	0,004	0,013

Os valores de LOD obtidos para determinação dos analito por GF AAS, foram de 0,036; 0,003; 0,049; 0,277 e 0,018 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As, Cd, Cr, Cu e Pb, respectivamente. De um modo geral, os valores de LOD foram adequados para a faixa de concentração dos analitos nas amostras. Além disso, os LODs obtidos por GF AAS estiveram praticamente na mesma ordem de grandeza que os obtidos por ICP-MS, com a exceção do Pb que foi cerca de quatro vezes maior para GF AAS do que para ICP-MS. Além disso, os valores de LOD obtidos neste estudo estão em conformidade com os comumente encontrados na literatura onde foi empregado o método MAD para biológicas, seguido da determinação dos analitos por GF AAS.^{8,9}

4.5. Exatidão e precisão

No presente trabalho, a exatidão e precisão do método foram avaliadas aplicando o método de preparo de amostra MAD na decomposição dos CRMs DORM-2 e SRM-1566b, com posterior determinação por GF AAS. Para avaliar a exatidão também foi feita a comparação entre os resultados obtidos por ICP-MS e GF AAS, conforme mostrado na Tabela 10. A quantificação dos analitos nos CRMs foi feita empregando curva de calibração com soluções de referência aquosas. Na Tabela 12 estão mostrados os resultados para os CRMs e a concordância com os valores certificados.

⁸ Chakraborty *et al.*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 355, 43-47.

⁹ Cid *et al.*, *Food Chem.*, 2001, 75, 93-100.

A aplicação do método MAD e quantificação por GF AAS nos CRMs apresentaram boa concordância com os valores certificados para todos os analitos avaliados, com variação entre 94 e 108%. Os valores de RSD para as determinações foram inferiores a 8%, que pode ser considerado bom para determinações de analitos em baixas concentrações.

Tabela 12. Determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb nos CRMs por GF AAS, após decomposição por MAD. Resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1} \pm$ desvio padrão (n = 3).

Elemento	DORM-2			NIST SRM-1566b		
	Valor Certificado	Valor encontrado	Concordância (%)	Valor Certificado	Valor encontrado	Concordância (%)
As	$18,0 \pm 1,1$	$17,4 \pm 0,4$	97	$7,65 \pm 0,65$	$7,39 \pm 0,14$	98
Cd	$0,043 \pm 0,008$	$< 0,057$	-	$2,48 \pm 0,08$	$2,47 \pm 0,34$	99
Cr	$34,7 \pm 5,5$	$32,0 \pm 1,2$	92	NI	$< 0,005$	-
Cu	$2,34 \pm 0,16$	$2,54 \pm 0,04$	108	$71,6 \pm 1,6$	$75,9 \pm 7,7$	106
Pb	$0,065 \pm 0,007$	$0,062 \pm 0,004$	95	$0,308 \pm 0,009$	$0,307 \pm 0,015$	100

NI = não informado

4.6. Determinação de As, Cd, Cr, Cu e Pb por GF AAS nas amostras de *Sergio mirim* após decomposição por MAD

O método MAD foi aplicado para a decomposição de amostras de *Sergio mirim* coletadas em dois períodos. Cabe ressaltar que, estes organismos vivem em uma região complexa de mistura da água do mar com elevado teor de salinidade (quando a maré é alta) com a água doce que chega às regiões de praia, quando a maré está baixa. Esta zona complexa de mistura é denominada por estuário subterrâneo. Por isso, considerando a complexidade da região e a necessidade de entender a dinâmica dos elementos estudados neste trabalho, as amostras foram separadas por sexo e idade (tamanho), nas quais o método otimizado foi aplicado. Na Tabela 13, estão mostradas as concentrações de As, Cd, Cr, Cu e Pb encontradas nas amostras de *Sergio mirim* coletadas na Praia do Cassino.

Tabela 13. Concentração de As, Cd, Cr, Cu e Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) determinados por GF AAS após decomposição por MAD (n = 3).

Amostras	As	Cd	Cr	Cu	Pb
CMNA ₁	3,70 ± 0,12	0,808 ± 0,021	7,20 ± 0,58	222 ± 8	0,916 ± 0,060
CMS ₁	2,02 ± 0,31	1,13 ± 0,04	2,88 ± 0,01	275 ± 12	0,390 ± 0,016
CMS ₂	2,44 ± 0,27	0,615 ± 0,101	2,46 ± 0,15	122 ± 1	0,826 ± 0,023
CFNA ₁	2,30 ± 0,10	0,633 ± 0,020	1,45 ± 0,08	207 ± 9	0,766 ± 0,097
CFNA ₂	1,58 ± 0,05	0,675 ± 0,048	0,884 ± 0,014	213 ± 6	0,377 ± 0,018
CFS ₁	2,40 ± 0,20	0,894 ± 0,020	3,75 ± 0,19	269 ± 3	0,625 ± 0,043
CFS ₂	1,45 ± 0,03	0,942 ± 0,018	1,45 ± 0,09	244 ± 6	0,553 ± 0,030

CMNA₁: organismo macho com tamanho menor que 60 mm, coletado no navio Altair; CMS₁: organismo macho com tamanho menor que 60 mm, coletado no Farol Sarita; CMS₂: organismo Macho com tamanho maior que 60 mm, coletado no Farol Sarita; CFNA₁: organismo fêmea com tamanho menor que 60 mm, coletado no navio Altair; CFNA₂: organismo fêmea com tamanho maior que 60 mm, coletada no navio Altair; CFS₁: organismo fêmea com tamanho menor que 60 mm, coletada no Farol Sarita; CFS₂: organismo fêmea com tamanho maior que 60 mm, coletada no Farol Sarita.

A concentração dos analito nos machos com tamanho inferior a 60 mm variaram entre 2,02 e 3,70 $\mu\text{g g}^{-1}$ para As; 0,808 e 1,13 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cd; 2,88 e 7,20 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cr; 222 e 275 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e entre 0,390 e 0,916 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. As concentrações encontradas nas fêmeas foram similares às encontrados nos machos, com exceção de Cr, onde foi observado um valor elevado para a amostra de macho (CMNA₁).

Por outro lado, a concentração dos analito nos machos com tamanho superior a 60 mm foram de $2,44 \pm 0,27 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, $0,615 \pm 0,101 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd, $2,46 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cr, $122 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cu e $0,826 \pm 0,023 \mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. Nas fêmeas, foram encontrados valores de As entre 1,45 e $1,58 \mu\text{g g}^{-1}$, Cd entre 0,675 e $0,942 \mu\text{g g}^{-1}$, Cr entre $0,884 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,45 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu entre 213 e $244 \mu\text{g g}^{-1}$ e Pb entre 0,377 e $0,553 \mu\text{g g}^{-1}$. As concentrações encontradas nos machos são um pouco mais elevadas em relação às fêmeas para todos analitos, exceto para Cd.

Comparando os valores de concentração dos machos com tamanhos diferentes, coletados no farol Sarita, pode se observar que a concentração de Cd e Cu é mais elevada nos organismos com tamanho menor (CMS₁), para As e Cr são relativamente similares, enquanto que para Pb foram observadas concentrações inferiores que nos organismos com tamanho superior (CMS₂). Para as fêmeas coletadas no mesmo local (farol Sarita), a concentração de As e Cr foi maior nos organismos de tamanho inferior a 60 mm (CFS₁) do que nos encontrados para os organismos com tamanho superior a 60 mm (CFS₂). Por outro lado, as concentrações foram similares para Cd, Cu e Pb. As fêmeas coletadas no navio Altair, tiveram concentrações de As e Cr maiores em organismos com tamanho inferior (CFNA₁) em relação aos de tamanho superior (CFNA₂). Para Cd, Cu e Pb, as concentrações foram similares. De um modo geral, os organismos juvenis são propensos a absorver mais alguns elementos do que os organismos adultos, devido à sua atividade metabólica maior no período de crescimento.^{51,52} Cobre foi o único elemento essencial estudado, fato que explica sua elevada concentração em todas as amostras, visto que este elemento desempenha diversas funções biológicas e é utilizado em grandes quantidades nos crustáceos, devido a sua grande capacidade de carrear oxigênio nos pigmentos sanguíneos do organismo.^{1,55}

Na Tabela 14, está mostrada a concentração de elementos em alguns organismos utilizados como bioindicadores ao longo da região em estudo. Através de um comparativo entre os elementos acumulados nestes organismos e no *Sergio mirim*, é possível inferir sobre a qualidade dos recursos hídricos. Embora ocorra distinção nos hábitos alimentares e locais de ocorrência entre os organismos, algumas

¹ Firat et al., *Environ. Monit. Assess.*, 2008, 147, 117-123.

⁵¹ Riget et al., *Mar. Poll. Bull.*, 1996, 32, 745-751.

⁵² Phillips, D. J. H., *Mar. Biol.*, 1976, 38, 59-69.

⁵⁵ Phillips, D. J. H., *Environ. Poll.*, 1977, 13, 281-317.

características se destacam entre ambos. O *Sergio mirim*, por apresentar uma baixa mobilidade, se assemelha à condição de organismos fixos como o mexilhão e a craca. Por outro lado, o camarão, apesar de ser móvel, é o crustáceo que apresenta mais semelhança com o *Sergio mirim* em relação ao modo de alimentação.

De acordo com estudos realizados em 2011 por Pereira *et al.*,⁵⁶ os autores avaliaram o teor de metais em mexilhão provenientes de uma região próxima à Praia de Cassino (Tabela 14). Nesse trabalho, foram encontradas concentrações de elementos similares aos encontrados no *Sergio mirim*. Outros autores também determinaram alguns elementos em camarão,^{57,58} cracas^{58,59} e mexilhão^{54,60} provenientes da Lagoa dos Patos (próxima à região em estudo), nos quais os níveis dos elementos encontram-se na mesma ordem que os encontrados no presente trabalho, com a exceção de Cu.^{51,52} No caso do *Sergio mirim*, foram encontradas concentrações de Cu de, aproximadamente, 10 a 20 vezes maiores que no mexilhão e na craca. Este fato pode estar relacionado ao modo de alimentação e habitat diferentes.

Cabe salientar que, não foram encontrados estudos feitos para o *Sergio mirim* e que este é um trabalho inicial, onde não será possível ter uma avaliação de qualquer tipo de impacto ambiental. Contudo, os resultados mostrados neste trabalho marcam o início para estudos que servirão de suporte para futuros trabalhos. Ademais, a concentração de elementos no *Sergio mirim* coincide com o encontrado para os demais organismos (*background* regional). Como este organismo ocorrer ao longo de toda a extensão de praia durante o ano todo, recomenda-se o seu uso como bioindicador, uma vez que os demais organismos comumente utilizados ocorrem somente em locais ou em períodos específicos, o que dificulta sua captura.

⁵¹ Riget *et al.*, *Mar. Poll. Bull.*, 1996, 32, 745-751.

⁵² Phillips, D. J. H., *Mar. Biol.*, 1976, 38, 59-69.

⁵⁶ Pereira *et al.*, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2012, 23, 846-853.

⁵⁷ Garcia, J. G.; Niencheski, L. F. H., *Trop. Oceanogr. online*, 2012, 40, 227-239.

⁵⁸ Garcia, J. G., Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 2011.

⁵⁹ Baraj *et al.*, *Water, Air and Soil Pollution*, 2003, 145, 205-214.

⁶⁰ Corradi, C. E., Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 2002.

Tabela 14. Concentração elementar ($\mu\text{g g}^{-1}$) em organismos coletados na Lagoa dos Patos.

Organismo	Elementos					Referência
	As	Cd	Cr	Cu	Pb	
Mexilhão dourado (<i>limnoperna fortunei</i>)	0,64 \pm 0,08	0,18 \pm 0,11	1,22 \pm 0,09	10,0 \pm 0,1	0,39 \pm 0,06	54
Camarão-rosa (<i>farfantepenaeus paulensis</i>)	0,04 - 6,85	0,19 - 0,30	0,07 - 0,54	10,6 - 80	0,02 - 1,88	55
Craca (<i>Balanus improvisus</i>)	-	1,27*	-	10,4*	-	56
Mexilhão (<i>perna perna</i>)	-	0,086 - 1,0	0,53 - 2,96	3,77 - 20,6	0,35 - 1,23	57

* valores informados sem desvio padrão.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, os métodos de decomposição por micro-ondas em sistemas fechado, foram eficientes para a decomposição de amostras de *Sergio mirim* e posterior determinação de As, Cd, Cu, Cr e Pb pelas técnicas de ICP-MS e GF AAS.

A exatidão da técnica GF AAS na determinação de As, Cd, Cu, Cr e Pb, após decomposição das amostras *Sergio mirim* por MAD, foi avaliada com o uso dos CRMs DORM-2 e SRM-1566b, onde as concordâncias com os valores certificados variaram entre 92 e 106%, com RSDs inferiores a 8%. Além disso, a concordância entre os resultados obtidos por GF AAS e ICP-MS também foram satisfatórias (94 a 110%), exceto para As, devido à possível presença íons Cl^- e/ou carbono residual que geram interferência espectral, enriquecendo o sinal do isótopo ^{75}As no ICP-MS. Cabe destacar que os valores de LOD foram adequados tanto para as determinações por ICP-MS quanto para GF AAS.

Os métodos MAD- O_2 e MAD-UV (em todas condições avaliadas), apresentaram boas concordâncias quando comparados com MAD para todos os analitos avaliados. Cabe destacar que não foram obtidos resultados satisfatórios empregando MAD-UV (HNO_3 1 mol L^{-1}) para posterior determinação de Cr, porém com a adição de 1 mL de H_2O_2 foi possível melhorar significativamente a concentração Cr e obter boas concordâncias.

Entre os métodos avaliados, MAD- O_2 apresentou menor eficiência na decomposição da matéria orgânica (RCC = 13%) em relação à MAD e MAD-UV (RCC inferior a 9% para os dois métodos). É importante ressaltar que para MAD- O_2 não foram otimizadas as principais condições do método, tais como concentração de HNO_3 e pressão de O_2 , fato que poderia favorecer na redução dos valores de RCC.

Os métodos MAD- O_2 e MAD-UV apresentaram vantagens em relação à MAD, principalmente pela possibilidade de utilização de ácidos diluídos (HNO_3 3 mol L^{-1} e HNO_3 1 mol L^{-1} + 1 mL H_2O_2 , respectivamente) na decomposição, gerando deste modo menores quantidades de resíduos e sem comprometer a qualidade dos resultados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Firat, Ö.; Gök, Çoğun, H. Y.; Yüzereroğlu, T. A.; Kargin, F.; Concentrations of Cr, Cd, Cu, Zn and Fe in crab *charybdis longicollis* and shrimp *penaeus semisulcatus* from the Iskenderun Bay, Turkey. *Environ. Monit. Assess.*, **2008**, 147, 117-123.
2. Monteiro, T.; Oliveira, L. G.; Godoy, B. S.; Biomonitoramento da qualidade de água utilizando macroinvertebrados bentônicos: adaptação do índice biótico BMWP' à bacia do rio Meia Ponte-GO. *Oecol. Bras.*, **2008**, 12, 553-563.
3. Teixeira, M. F.; Torres, S. F.; Capitoli, R. R.; Principais moluscos e crustáceos decapados da praia do Cassino, RS. *Rev. Elec., Cad. Ecol. Aquá.*, **2008**, 3, 1-18.
4. Clark, R. B.; Marine pollution. 5th Edition, Oxford, 2001, p. 248.
5. Sturgeon, R. E.; Graphite furnace atomic absorption analysis of marine samples for trace metals. *Spectrochim. Acta Part B*, **1989**, 12, 1209-1220.
6. López, F. J. S.; Garcia, M. D. G.; Morito, N. P. S.; Vidal, J. L. M.; Determination of heavy metals in crayfish by ICP-MS with a microwave- assisted digestion treatment. *Ecotox. Environ. Safe.*, **2003**, 54, 223-228.
7. Meche, A.; Martins, M. C.; Lofrano, B. E. S. N.; Hardaway, C. J.; Merchant, M.; Verdade, L.; Determination of heavy metals by inductively couple plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. *Microchem. J.*, **2010**, 94, 171-174.
8. Chakraborty, R.; Das, A. K.; Cervera, M. L.; Guardia, M.; Determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave-assisted digestion of animal tissues and sewage sludge. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 355, 43-47.
9. Cid, B. P.; Boia, C; Pombo, L.; Rebelo, E.; Determination of trace metals in fish species of the Ria de Aveiro (Portugal) by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chem.*, **2001**, 75, 93-100.

10. Rodushkin, I.; Ruth, T.; Huhtasaari, A.; Comparison of two methods for elemental determinations in plant material by ICP techniques. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 378, 191-200.
11. Nemati, K.; Bakar, N. K. A.; Abas, M. R. B.; Sobhanzadeh, E.; Low, K. H.; Comparative study on open system digestion and microwave assisted digestion methods for metal determination in shrimp sludge compost, *J. Hazard. Mater.*, **2010**, 182, 453-459.
12. Krug, J. F.; Métodos de preparo de amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Edição rev., Piracicaba, **2010**, p. 340.
13. Wasilewska, M.; Goessler, W.; Zischka, M.; Maichin, B.; Knapp, G.; Efficiency of oxidation in wet digestion procedures and influence from residual organic carbon content on selected techniques for determinations of trace elements. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2002**, 17, 1121-1125.
14. Florian, D.; Knapp, G.; High-temperature, microwave UV digestion: a promising sample preparation technique of trace elements analysis. *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1515-1520.
15. Bizzi, C. A.; Flores, E. M. M.; Picoloto, R. S.; Barin, J. S.; Nóbrega, J. A.; Microwave-assisted digestion in closed vessel: effect of pressurization with oxygen on digestion process with diluted nitric acid, *Anal. Methods*, **2010**, 2, 734-738.
16. Rodrigues, S. D.; Estudos sobre Callianassa: sistemática, biologia e anatomia. Tese de Doutorado em Ciências, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, 1966.
17. Colin, P. L.; Suchanek, T. H.; Mcmurtry, G. Water pumping and particulate resuspension by callianassids (Crustacea: Thalassinidea) at Enewetak and Bikini Atolls, Marshall Islands. *Bull. Mar. Sci.* **1986**, 38, 19-24.
18. Griffen, B. D.; DeWitt, T. H.; Langdon, C. Particle removal rates by the mud shrimp *Upogebia pugettensis*, its burrow, a commensal clam: effects on estuarine phytoplankton abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2004**, 269, 223-236.

19. Pezzuto, P. R.; Population Dynamics of *Sergio mirim* (RODRIGUES 1971) (Decapoda:Thalassinidea: Callianassidae) in Cassino Beach, Southern Brazil. *Mar. Ecol.*, **1998**, 19, 89-109.
20. Broekaert, J. A. C.; Analytical atomic spectrometry with flames and plasmas, Wiley-VCH, Weinheim, Alemanha, **2002**, p. 306.
21. Becker, J. S.; Dietze, H. J.; State-of-the-art in inorganic mass spectrometry for analysis of high-purity materials. *Int. J. Mass Spectrom.*, **2003**, 228, 127-150.
22. Allah, P.; Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 1497-1498.
23. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. Princípios de Análise Instrumental. 5ª Edição, Bookman, **2005**, p. 834.
24. Welz, B.; Sperling, M.; Atomic absorption spectrometry. Wiley-VHC Verlag GmbH, 3th completely revised edition, Alemanha, **1999**, p. 234.
25. Gontad, B. C.; Alonso, M. C. B.; Villar, M. D. B.; Va´zquez, E. P.; Hermelo, P. H.; Barrera, P. B.; Study of a microwave digestion method for total arsenic determination in marine mussels by electrothermal atomic absorption spectrometry: application to samples from the Ria de Arousa. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1165–1172.
26. Ediger, R. D., Atomic absorption analysis with the graphite furnace using matrix modification. *At. Absorp. Newsletter*, **1975**, 14, 127-130.
27. Sardans, J.; Montes, F.; Peñuelas, J.; Determination of As, Cd, Cu, Hg, and Pb in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, **2010**, 65, 97-112.
28. Volynsky, A. B.; Wennrich, R.; Efficiency of Pt and Ir modifiers for the simultaneous determinations of As, Se and In in a sodium sulphate matrix by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*, **2003**, 59, 277-286.
29. Gouveia, S. T.; Fatibello-Filho, O.; Nóbrega, J. A.; Infra-red heating as an alternative technique for fast sample preparation. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2000**, 11, 261-265.

30. Mesko, M. F.; Moraes, D. P.; Barin, J. S.; Dressler, V. L.; Knapp, G., Flores, E. M. M.; Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. *Microchem. J.*, **2006**, 82, 183-188.
31. 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 plants materials, *Spectrochim. Acta Part B*, **2002**, 57, 2121-2132.
32. Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E.; Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: O estado da arte, *Quim. Nova*, **1997**, 20,638-643.
33. Flores, E. M. M.; Mesko. M. F.; Moraes, D. P.; Pereira, J. S. F.; Mello, P. A.; Barin, J. S. e Knapp, G.; Determination of halogens in coal after digestion using microwave-induced combustion technique. *Anal. Chem.*, **2008**, 80, 1865-1870.
34. Abu- Samra, A.; Morris, J. S.; Koirtiyohann, S. R.; Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1475.
35. Ashoka, S.; Peake, B. M.; Bremner, G.; Hageman, K. J.; Malcolm, R. R.; Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 653, 191-199.
36. Lamble, K. J.; Hill, S. J.; Microwave digestion procedures for environmental matrices, *Analyst*, 1998, 123, 103-133.
37. Limbeck, A.; Microwave-assisted UV-digestion procedure for the accurate determination of Pd in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 575, 114-119.
38. Gesto, E. M. S.; Pineiro, A. M.; Barrera, A. B.; Barrera, P. B.; Multi-element determination in raft mussels by fast microwave-assisted acid leaching and inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Talanta*, **2007**, 72, 1178-1185.
39. 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*, **2011**, 83,1324-1328.
40. Bizzi, C. A.; Barin, J. S.; Garcia, E. E., Nóbrega, J. A.; Dressler, V.L.; Flores, E. M. M.; Improvements of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric

- acid using oxygen as auxiliary reagent, *Spectrochim. Acta Part B*, **2011**, 66, 394-398.
41. De Laat, J.; Gallard, H.; Anelin, S.; Legube, B.; Comparative study of the oxidation of atrazine and acetone by H₂O₂/UV, Fe(III)/UV, Fe(III)/ H₂O₂/UV and Fe(II) or Fe(III)/ H₂O₂. *Chemosphere*, **1999**, 39, 15, 2693.
 42. Golimowski, J.; Golimowska, K.; UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental sample. *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 325, 111-133.
 43. Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R.; O uso da radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. *Quim. Nova*, **2003**, 26, 913-921.
 44. Pereira, J. S. F.; Picoloto, R. S.; Pereira, L. S. F.; Guimarães, R. C. L.; Guarnieri, R. A.; Flores, E. M. M.; High- efficiency microwave-assisted digestion combined to in situ ultraviolet radiation for the determination of rare earth elements by ultrasonic nebulization ICP-MS in crude oils. *Anal. Chem.*, **2013**, 85, 11034-11040.
 45. Anton Paar, Disponível em: <http://www.anton-paar.com/>, acessado em: 31 de outubro de 2013.
 46. Sodré, F. F.; Zamora, P. G. P.; Grassi, M. T.; Digestão fotoquímica, assistida por micro-ondas, de águas naturais: Aplicação em estudos de partição e especiação de cobre. *Quim. Nova*, **2004**, 27, 695-700.
 47. INMETRO, Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos, DOQCGCRE-008, 2007. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/cgcre/doq/doq-cgcre-8_03.pdf acessado em: 01 de novembro de 2013.
 48. BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 junho 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003 acessado em: 01 de novembro de 2013.
 49. Antes, F.G.; Duarte, F. A.; Mesko, M. F.; Nunes, M. A. G.; Pereira, V. A.; Müller, E. I.; Dressler, V.L.; Flores, E. M. M.; Determination of toxic elements in coal by ICP-MS after digestion using microwave-induced combustion, *Talanta*, **2010**, 83, 364-369.

50. Todolí, J. L.; Mermet, J. M.; Sample introduction systems for analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochim. Acta Part B.*, **2006**, 61, 239-283.
51. Riget, F.; Johansen, P.; Asmund, G.; Influence of length on element concentration in blue mussels (*Mytilus edulis*). *Mar. Poll. Bull.*, **1996**, 32, 745-751.
52. Phillips, D. J. H.; The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. *Mar. Biol.*, **1976**, 38, 59-69.
53. Phillips, D. J. H. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments: a review. *Environ. Poll.*, **1977**, 13, 281-317.
54. Pereira, E. R.; Soares, B. M.; Vieira, J. P.; Mai, A. C. G.; Picoloto, R. S.; Muller, E. I.; Flores, E. M. M.; Duarte, F. A.; Assessment of inorganic contaminants in golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in Southern Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, 23, 846-853.
55. Garcia, J. G.; Niencheski, L. F. H.; Avaliação Temporal da acumulação de elementos traço no camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* no estuário da lagoa dos patos, RS, Brasil. *Trop. Oceanogr.*, **2012**, 40, 227-239.
56. Garcia, J. G.; Acumulação de elementos traço em organismos no estuário da lagoa dos patos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 2011.
57. Baraj, B.; Niencheski, L. F.; Corradi, C.; trace metals content trend of mussel *perna perna* (Linnaeus, 1758) from the Atlantic coast of southern Brazil. *Water, Air and Soil Pollution*, **2003**, 145, 205-214.
58. Corradi, C. E.; Avaliação da costa de Rio Grande através da bioacumulação de metais pesados por mexilhões, cracas e camarões no estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 2002.