

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

Gustavo Gohlke

**AVALIAÇÃO DA COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA
O PREPARO DE AMOSTRAS DE INSETOS COMESTÍVEIS E
POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb**

Santa Maria, RS

2022

Gustavo Gohlke

**AVALIAÇÃO DA COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA O
PREPARO DE AMOSTRAS DE INSETOS COMESTÍVEIS E POSTERIOR
DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Química Bacharelado da Universidade
Federal de Santa Maria como requisito parcial
para a obtenção do título de **Bacharel em
Química**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Alessandra Schneider Henn

Santa Maria, RS

2022

Gustavo Gohlke

**AVALIAÇÃO DA COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA O
PREPARO DE AMOSTRAS DE INSETOS COMESTÍVEIS E POSTERIOR
DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb**

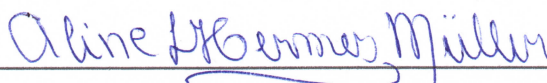
Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Química Bacharelado da
Universidade Federal de Santa Maria como
requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Química.

Aprovado em 25 de agosto de 2022.



Alessandra Schneider Henn, Dr.^a (UFSM)

(Orientadora)



Aline Lima Hermes Müller, Dr.^a (UFSM)

Santa Maria, RS

2022

DEDICATÓRIA

A todos que tiveram suas vidas perdidas ou prejudicadas pela negligência com a ciência e educação durante o governo de Jair Bolsonaro. Àqueles que acreditam que o filho da faxineira e do agricultor também pode ter acesso ao ensino federal, gratuito e de qualidade. Aos meus pais pelo esforço para que eu pudesse cursar o ensino superior na UFSM.

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria**, ao curso de **Química Bacharelado** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)** pela oportunidade de execução deste trabalho.

À Prof^a. **Alessandra S. Henn**, pela orientação neste trabalho, pelo apoio, amizade, exemplo de profissional e por todos os conhecimentos transmitidos durante a iniciação científica.

À Prof^a **Aline L. H. Müller**, por participar como membro da banca examinadora, pelo exemplo de profissional e pelas sugestões feitas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. **Érico M. M. Flores**, pelo exemplo de profissional, apoio, ensinamentos, conselhos, incentivos, pela oportunidade de iniciação científica e de desenvolver este trabalho no LAQIA. .

Aos colegas e professores do **LAQIA/CEPETRO** pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial ao **Thiago C. Pereira**, pela contribuição direta no desenvolvimento deste trabalho e pela amizade. A **Vitoria H. Cauduro** pela ajuda, ensinamentos e amizade. Ao **Cristian R. Andriolli** por toda a ajuda prestada.

Ao Prof. **Juliano S. Barin** pelas análises centesimais e exemplo de profissional.

.Aos colegas de iniciação científica e amigos **Ana Paula F. Padilha**, **Emanuele Frozi**, **Giancarlo R. Machado** , **Luana Formagini** e **Luana R. Farias** por todo o auxílio prestado neste trabalho.

Aos colegas de graduação e amigos **Artur F. Burg**, **Érica Gilioli**, **Larissa Mota**, **Ramon Prates** e **Nicole W. da Silva** pela amizade, convivência e auxílio.

Ao **Instituto Federal do Rio Grande do Sul (IFRS)- Campus Feliz**, por ter me propiciado uma formação ímpar, que fez com que eu tivesse acesso ao ensino superior. Em especial aos professores do IFRS-*Campus Feliz*, **Alessandra Smaniotto**, **Francisco R. Cunha** e **Matheus F. Pedrotti** por terem me cativado a continuar na área de química.

Aos meus familiares por todo o apoio durante a graduação.

“Você não deve esperar construir um mundo melhor sem melhorar as pessoas. Cada um de nós deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Skłodowska Curie

A Lei da serendipidade: a sorte favorece quem tenta

RESUMO

AVALIAÇÃO DA COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DE INSETOS COMESTÍVEIS E POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb

AUTOR: Gustavo Gohlke

ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Alessandra Schneider Henn

O consumo de insetos comestíveis vem sendo uma alternativa frente a demanda por alimentos. Porém, metais potencialmente tóxicos (como As, Cd e Pb) podem estar presentes nesses artrópodes devido aos substratos utilizados na produção, podendo prejudicar a saúde do consumidor. Diante disso, metodologias analíticas para a determinação de As, Cd e Pb neste tipo de amostra precisam ser desenvolvidas. Dentre as técnicas analíticas disponíveis, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) destaca-se pelo caráter multielementar e por possuir baixos limites de quantificação (LOQ). Contudo, operando no modo convencional, os equipamentos de ICP-MS necessitam que a amostra a ser analisada esteja na forma líquida, o que requer uma etapa prévia de preparo de amostra. A combustão iniciada por micro-ondas (MIC) é um método de preparo de amostra que destaca-se por utilizar soluções diluídas e resultar em digeridos com baixos valores de carbono em solução, se comparada aos métodos de digestão ácida convencionais. Por conta disso, este trabalho avalia o emprego da MIC para o preparo de amostras de insetos comestíveis para posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Para isso, diferentes amostras de insetos (grilo, gafanhoto, besouro e larva de *tenebrio molitor*) foram secas, moídas e prensadas na forma de comprimidos. Avaliou-se a massa máxima de amostra (100 a 600 mg), a concentração da solução de HNO₃ usada como solução absorvedora (3 a 14,4 mol L⁻¹) e o tempo de refluxo (5 a 15 min). Como método de referência empregou-se a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC). A exatidão foi avaliada por comparação dos resultados com os valores obtidos pelo método de referência e pela análise dos materiais de referência certificados (CRMs, DORM-3 e DORM-5). O teor de carbono nas soluções obtidas foi determinado por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a concentração de As, Cd e Pb por ICP-MS. A MIC possibilitou a combustão de até 500 mg de amostra e concordâncias acima de 90% para As, Cd e Pb foram obtidas utilizando-se uma solução absorvedora de HNO₃ 7 mol L⁻¹ e 5 min de refluxo para as amostras com teores de cinzas de até 4,5%. Além disso, para ambos os CRMs não houve diferença significativa (teste *t-student*) entre os valores certificados de As, Cd e Pb e os obtidos após a MIC. O teor de carbono nas soluções obtidas por MIC foi menor que 13,6 mg L⁻¹, ao passo que as soluções obtidas após o método de referência apresentaram um teor de 150 mg L⁻¹ de C. Para a MIC, obteve-se LOQs de 0,007, 0,003 e 0,040 µg g⁻¹ para As, Cd e Pb respectivamente, demonstrando que o método proposto é adequado para o preparo de amostras de insetos comestíveis e posterior determinação de As, Cd e Pb em baixas concentrações.

Palavras-chave: MIC. Insetos comestíveis. Elementos potencialmente tóxicos

ABSTRACT

EVALUATION OF MICROWAVE-INDUCED COMBUSTION FOR SAMPLE PREPARATION OF EDIBLE INSECTS AND FURTHER DETERMINATION OF As, Cd, and Pb

AUTOR: Gustavo Gohlke

ADVISOR: Prof.^a Dr.^a Alessandra Schneider Henn

The consumption of edible insects has been an alternative to the demand for food. However, potentially toxic metals (such as As, Cd, and Pb) can be present in these arthropods due to the substrates used in the production, which can affect the consumer's health. Therefore, analytical methodologies for the determination of As, Cd, and Pb in this type of sample need to be developed. Among the available analytical techniques, inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) stands out for its multi-elemental character and for having low limits of quantification (LOQ). Nevertheless, operating in conventional mode, ICP-MS equipment requires that the sample to be analyzed is in liquid form, which demands a previous sample preparation step. Microwave-induced combustion (MIC) is a sample preparation method that stands out because it uses dilute solutions and results in digests with low values of carbon in solution compared to conventional acid digestion methods. Because of this, this work evaluates the use of MIC for the sample preparation of edible insect for further determination of As, Cd, and Pb by ICP-MS. For this, different insect samples (cricket, grasshopper, beetle and tenebrio molitor larvae) were dried, ground, and pressed into tablet form. The maximum sample mass (100 to 600 mg), the concentration of the HNO₃ solution used as absorber solution (3 to 14.4 mol L⁻¹) and the reflux time (5 to 15 min) were evaluated. Microwave-assisted acid digestion in a single reaction chamber (MAWD-SRC) was employed as a reference method. The accuracy was evaluated by comparing the results with the values obtained by the reference method and by analyzing the certified reference materials (CRMs, DORM-3 and DORM-5). The carbon content of the obtained solutions was determined by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP-OES) and the concentration of As, Cd and Pb by ICP-MS. The MIC permitted combustion of up to 500 mg of sample and concordances above 90% for As, Cd and Pb were obtained using a 7 mol L⁻¹ HNO₃ absorber solution and 5 min reflux for the samples with ash contents up to 4.5%. Furthermore, for both CRMs there was no significant difference (*t-student* test) between the certified values for As, Cd and Pb and those obtained after MIC. The carbon content in the solutions obtained by MIC was less than 13.6 mg L⁻¹, whereas the solutions obtained after the reference method had a content of 150 mg L⁻¹ of C. For MIC, LOQs of 0.007, 0.003, and 0.040 µg g⁻¹ were obtained for As, Cd, and Pb respectively, demonstrating that the proposed method is suitable for the preparation of edible insect samples and further determination of As, Cd, and Pb at low concentrations.

Keywords: MIC. Edible insects. Potentially toxic elements

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Vantagens da MAWD e dos métodos clássicos de combustão. Adaptado de Flores, *et. al.* (2007)⁷.24
- Figura 2. Representação do sistema utilizado na MIC. Adaptado de Anton Paar (2019)⁵¹.....25
- Figura 3. Sistema de decomposição por MAWD.SRC: A) Forno de micro-ondas; B) Frascos de quartzo.27
- Figura 4. Sistema de MIC. A) Forno de micro-ondas Multiwave Pro[®]; B) Suporte de quartzo para o processo de combustão C) Frascos de quartzo com suporte.....28
- Figura 5. Amostras de insetos utilizadas neste trabalho: A) Grilo; B) Gafanhoto; C) Besouro; D) Larva de *tenebrio molitor*.....31
- Figura 6. Suporte com *pallet* da amostra “A”.31
- Figura 7. Resumo do procedimento de MIC. A) Adição do iniciador de combustão; B) Frasco com a solução absorvedora e amostra; C) Frascos posicionados no rotor; D) Pressurização com O₂; E) Conjunto de frascos no interior do forno de micro-ondas; F) Combustão da amostra. As flechas em azul representam o fluxo das operações.....34
- Figura 8. Fluxograma dos procedimentos experimentais feitos neste estudo.....37
- Figura 9. Suporte de quartzo com fuligem devido a combustão incompleta na condição com 600 mg de amostra.43
- Figura 10. Resultados de concordância para As (■), Cd (■) e Pb (■) em diferentes concentrações de HNO₃. A linha tracejada representa 100% de concordância.....44
- Figura 11. Resultados de concordância para As (■), Cd (■) e Pb (■) em diferentes tempos de refluxo, utilizando HNO₃ 5 mol L⁻¹ como solução absorvedora. A linha tracejada representa 100% de concordância.45

Figura 12. Resultados de concordância para As (■), Cd (■) e Pb (■) nas amostras estudadas. A linha tracejada representa 100% de concordância47

Figura 13 Resíduo após o procedimento de MIC da amostra "D".48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo de métodos de preparo de amostra usados para insetos comestíveis e posterior determinação elementar.	22
Tabela 2. Parâmetros operacionais dos equipamentos de ICP-OES e ICP-MS.....	29
Tabela 3. Descrição das amostras de insetos.	31
Tabela 4. Composição centesimal das amostras de insetos.	39
Tabela 5. Concentração de micronutrientes e macronutrientes nas amostras estudadas obtidas por ICP-OES após MAWD-SRC (média ± SD, n=3).	40
Tabela 6. Valores de referência para As, Cd e Pb obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MAWD-SRC e digestão ácida com aquecimento convencional (média ± SD, n=3).	41
Tabela 7. Valores certificados de As, Cd e Pb para os CRMs DORM-5 e DORM-3 e obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MAWD-SRC e digestão ácida com aquecimento convencional (média ± SD, n=3)	42
Tabela 8. Valores certificados de As, Cd e Pb para os CRMs DORM-5 e DORM-3 e obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MIC (média ± SD, n=3).	46
Tabela 9. Valores de As, Cd e Pb para as amostras de insetos comestíveis obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MIC (média ± SD, n=3)	49
Tabela 10. Limites máximos permitidos para As, Cd e Pb em crustáceos segundo a RDC N° 42, de 29 de agosto de 2013, ANVISA.	49
Tabela 11. Comparação entre os métodos de preparo de amostra empregados neste estudo.	50
Tabela 12. LODs e LOQs para os três métodos de preparo de amostra empregados neste trabalho em ng g^{-1}	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CRM	Material de referência certificado, do inglês, <i>Certified reference material</i>
CVG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração química de vapor, do inglês, <i>chemical vapor generation atomic absorption spectroscopy</i> .
EFSA	Autoridade Europeia de Segurança Alimentar, do inglês, <i>European Food Safety Authority</i>
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectroscopy</i> .
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, do inglês, <i>grafite furnace atomic absorption spectroscopy</i> .
HG-AAS	Espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, do inglês, <i>hydride generation atomic absorption spectroscopy</i>
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
LOD	Limite de detecção, do inglês, <i>limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação, do inglês, <i>limit of quantification</i>
MAWD	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion</i>
MAWD-SRC	Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion with single reaction chamber</i>
MIC	Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, <i>microwave-induced combustion</i>

PTFE

Politetrafluoretileno, do inglês *polytetrafluoroethylene*

TAD AAS

Espectrometria de absorção atômica com decomposição térmica e almagamação, do inglês , *thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrometry*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. INSETOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA	19
2.2. TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM INSETOS.....	20
2.3. MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	21
2.3.1. Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas	23
2.3.2. Combustão iniciada por micro-ondas	24
3. MATERIAS E MÉTODOS	26
3.1. INSTRUMENTAÇÃO	27
3.2. REAGENTES	29
3.3 AMOSTRAS.....	30
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	32
3.5. PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO	32
3.6. MÉTODOS DE REFERÊNCIA	33
3.6.1. Digestão ácida com aquecimento convencional	33
3.6.2. Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação	33
3.7. COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS	34
3.7.1. Avaliação da massa de amostra	35
3.7.2. Avaliação da concentração da solução absorvedora	35
3.7.3. Avaliação do tempo de refluxo	35
3.8. CÁLCULO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO	35
3.9. TRATAMENTO DOS DADOS	35
3.10. RESUMO DOS PROCEDIMENTOS	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	39
4.2. MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE AS, CD E PB POR ICP-MS	41
4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA MIC PARA A DETERMINAÇÃO DE AS, CD E PB POR ICP-MS.....	42
4.3.1. Avaliação da massa de amostra	42
4.3.2. Avaliação da solução absorvedora	43
4.3.3. Avaliação do tempo de refluxo	45
4.4. AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DA MIC	46

4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE INSETOS COMESTÍVEIS	46
4.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGADOS NESTE ESTUDO.....	50
5. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

O consumo de insetos comestíveis, comum em culturas asiáticas, latino-americanas e africanas, vem sendo uma alternativa frente a demanda por alimentos.¹ Os insetos possuem um valor nutricional maior do que as de proteínas convencionais, podendo conter maiores teores de vitaminas, minerais e lipídios, do que a carne de suínos, por exemplo.² A criação de insetos também é mais vantajosa do que a de ruminantes, suínos e de aves, já que estes artrópodes dificilmente adoecem, são onívoros, se reproduzem rápido e possuem grandes populações.² Além do mais, a criação de insetos apresenta vantagens ambientais, uma vez que utiliza cerca de quarenta vezes menos água do que o manejo de bovinos, permite a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, além de liberar menos gases prejudiciais na atmosfera.³

Frente a estas vantagens, é preciso garantir que esta fonte de alimento esteja livre de contaminantes, inclusive de metais potencialmente tóxicos, tais como As, Cd e Pb.⁴ A determinação de As, Cd e Pb comumente é feita utilizando técnicas baseadas em plasma, tais como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A ICP-MS se demonstra vantajosa nesse caso, uma vez que as concentrações de As, Cd e Pb estão na ordem de ng g^{-1} , neste tipo de matriz. Contudo, operando no modo convencional, os equipamentos de ICP-MS requerem que a amostra esteja na forma líquida, necessitando assim uma etapa prévia de preparo de amostra.^{5,6}

Dentre os métodos de preparo de amostras comumente empregados para amostras orgânicas e posterior determinação elementar, pode-se citar a digestão ácida com aquecimento convencional e a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MAWD).⁷ Apesar da sua vasta utilização, estes métodos geralmente necessitam do uso de volumes elevados de ácidos concentrados, fato que contribui para a geração de resíduos potencialmente tóxicos.⁸ Outro problema associado a estes métodos, são os elevados teores de carbono e a elevada acidez residual do digerido, o que pode vir a causar interferências na determinação por ICP-MS.⁹

Os métodos de combustão destacam-se no preparo de amostras de caráter orgânico, possibilitando o uso de soluções diluídas e resultando em digeridos com baixos teores de carbono em solução.¹⁰ Dentre os métodos de combustão pode-se

citar a combustão por via seca em forno tipo mufla, a bomba de combustão e o frasco de Schöniger.⁷ Contudo, estes métodos apresentam desvantagens como: perda de analitos por volatilização na combustão via seca; contaminação por metais na bomba de combustão e problemas na ignição do sistema no frasco de Schöniger.^{7,10}

Em comparação com os métodos clássicos de preparo de amostra para determinação elementar, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) destaca-se por utilizar soluções diluídas, evitar a perda de analitos por volatilização, diminuir contaminações e permitir a combustão de elevadas massas de amostra, resultando em baixos limites de quantificação (LOQ) e detecção (LOD).¹¹ Dessa forma, a MIC vem sendo utilizada para diversas matrizes de alimentos, tais como leite em pó, algas, frutos do mar, chocolate, mel, farinha, cereais e castanhas, entre outros.¹²⁻¹⁹

Diante disso, o objetivo do presente trabalho é avaliar a MIC como método de preparo de amostras de insetos comestíveis para posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Para tal, foram avaliados parâmetros do método de MIC, como a massa máxima de amostra passível de decomposição, o tipo e a concentração da solução absorvedora e o tempo de refluxo. Além disso, a exatidão do método foi avaliada pela comparação dos resultados obtidos por MIC com os valores obtidos após a decomposição por via úmida em câmara única de reação (MAWD-SRC) e pela análise de materiais de referência certificados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção, serão apresentados aspectos gerais sobre os insetos na alimentação humana, bem como a importância da determinação de arsênio, cádmio e chumbo neste tipo de matriz. Em seguida serão discutidas técnicas analíticas para a determinação de As, Cd e Pb, bem como os métodos de preparo de amostras usados para decomposição de amostra orgânicas, com enfoque na combustão iniciada por micro-ondas.

2.1. INSETOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA

O aumento demográfico vem trazendo o esgotamento dos recursos necessários para a sobrevivência, incluindo os suprimentos alimentares. Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), estima-se que a população em 2050 será de 9 bilhões de pessoas, o que pode indicar um aumento de 60% na demanda por alimentos, culminando na expansão de áreas de cultivo e manejo, ato que possui impacto ambiental negativo.²⁰ Diante disso, a entomofagia (consumo de insetos) pode se tornar uma alternativa frente ao carência de alimentos.²¹

Os insetos são animais artrópodes, se adaptam com facilidade ao ambiente, reproduzem-se rápido (cerca de duas semanas), dificilmente adoecem, possuem grandes populações e são onívoros, fatores que contribuem para a produção em larga escala.^{1, 21} Cabe destacar que a criação de insetos utiliza menos água (cerca de 4.341 m³ por tonelada) se comparada, por exemplo, o de ruminantes (154.115 m³ por tonelada), além do menor tempo até a etapa de consumo (semanas para insetos e anos para bovinos).³

As principais espécies de insetos consumidas incluem besouros (*Coleoptera*), formigas (*Formicidae*), abelhas (*Anthophila*), gafanhotos (*Caelifera*), cigarrinhas (*Dalbulus Maidis*), cupins (*Isoptera*) e moscas (*Diptera*). A ingestão desses insetos pode ser feita em diferentes fases de seu desenvolvimento, como ovos, larvas, pupas e adultos.²² Levando em conta os aspectos bromatológicos, os insetos são ricos em proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (principalmente Ca, Fe, K, Mg e Se), podendo superar os teores contidos em fontes de proteínas convencionais.²³ Estudos demonstram que o consumo de 100 g de lagartas, por exemplo, fornece 76% da ingestão diária recomendada de proteínas e quase 100% da ingestão diária recomendada de vitaminas para humanos.²⁴ Em relação aos minerais, os insetos contêm mais ferro e cálcio do que a carne bovina, suína e de frango.²²

Diante dos benefícios do consumo de insetos, deve-se garantir que esta fonte de alimento esteja livre de contaminantes microbiológicos, micológicos, parasitários e químicos, que possam causar algum mal ao consumidor.²⁵ Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA), a presença de contaminantes em insetos é influenciada principalmente pelo método de produção, espécies, estágio de colheita e substrato usado no processo de criação.⁴

Dentre os possíveis contaminantes, os elementos potencialmente tóxicos (As, Cd e Pb) merecem atenção, uma vez que devido a magnificação trófica podem se bioacumular, causando efeitos agudos e crônicos em animais e seres humanos.^{4, 26}

2.2. TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS POTENCIALMENTE TÓXICOS EM INSETOS

A determinação de metais e semimetais em amostras de insetos vem sendo feita utilizando-se técnicas como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).^{25, 27-29}

A FAAS é amplamente empregada quando a concentração dos analitos está na faixa de parte por milhão (ppm), enquanto que a GFAAS permite determinar analitos na ordem de parte por bilhão (ppb), além de possibilitar a análise direta de sólidos.³⁰ Contudo, tanto a FAAS como a GFAAS, são técnicas monoelementares, isto é, permitem a determinação de apenas um elemento por vez. Tendo em vista isso, o desenvolvimento de metodologias analíticas que empreguem técnicas multielementares, tais como ICP-OES e ICP-MS, se demonstra vantajoso, pois permite a redução do tempo de análise, apesar destas técnicas possuírem um custo elevado.^{31,32}

A ICP-OES é uma técnica com ampla faixa linear e robusta, porém, não possui sensibilidade adequada para a determinação de As, Cd e Pb em amostras de insetos comestíveis, uma vez que a concentração desses elementos nesse tipo de amostra está na faixa de ppt, enquanto que o limite de quantificação da técnica (LOQ) está na ordem de ppb.^{27,33}

Nesse sentido, a ICP-MS vem sendo empregada para análise de As, Cd e Pb em amostras de alimentos, já que esta técnica permite analisar elementos traço com LOQs na faixa de ppt.⁵ Cabe destacar que apesar da elevada sensibilidade, esta técnica é menos robusta que a ICP-OES, sendo mais suscetível a interferências causadas pela concentração de C e acidez da solução analítica.^{34, 35} De acordo com Müller *et al.* (2015), concentrações de HNO₃ acima de 20% em solução, podem causar supressão de sinal para diversos isótopos, incluindo ⁷⁵As, ¹¹¹ Cd, ¹¹⁴ Cd, ²⁰⁷ Pb e ²⁰⁸ Pb.⁶ Além disso, segundo estudos de Grindlay *et.al.* (2013), concentrações de

carbono acima de 250 mg L⁻¹, ocasionam fenômenos de transferência de carga de espécies de C⁺, resultando em um aumento de sinal para isótopos como o ⁷⁵As.³⁶ Ademais, segundo estudos de Henn (2017), concentrações de Cl maiores que 200 mg L⁻¹, podem causar interferência na determinação de ⁷⁵As, pela formação do íon poliatômico ⁴⁰Ar³⁵Cl⁺, que possui a mesma razão massa carga deste isótopo.³⁷

Adicionalmente, operando no modo convencional, o equipamento de ICP-MS requer que a amostra esteja na forma líquida para que possa ser introduzida no equipamento, suportando um baixo teor de sólidos.^{36,38} Dessa forma, levando em consideração as interferências que podem ser ocasionadas pela matriz e a necessidade de se introduzir amostras no estado líquido, faz-se necessário uma etapa prévia de preparo de amostra, que será discutida a seguir.¹⁸

2.3. MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA

A etapa de preparo de amostra objetiva transformar uma amostra sólida em uma solução líquida, a fim de facilitar a introdução nas técnicas instrumentais de análise, além de reduzir interferências na medida, tais como as causadas pelo C em solução nas técnicas com plasma.^{6,7} Pode-se considerar que a etapa de preparo de amostra é a mais crítica de toda a sequência analítica, pois é nessa etapa que podem ocorrer maiores erros, como por exemplo contaminações e perda de analitos por volatilização.⁷ Este último vem sendo resolvido utilizando-se sistemas fechados de preparo de amostra, que geralmente empregam fornos de micro-ondas.³⁹ Na Tabela 1 está apresentado um resumo dos métodos de preparo de amostra mais empregados para amostras de insetos comestíveis.

Por meio da Tabela 1, pode-se notar que a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas (MAWD), é a mais utilizada para este tipo de amostra quando o objetivo é a análise de metais e semi-metals com técnicas por plasma, tal como a ICP-MS. Além disso, nota-se que os métodos empregados utilizam reagentes concentrados, o que vai contra os princípios de redução do uso de reagentes e de geração de resíduos difundidos pela química analítica verde.⁴⁰ Nesse sentido, a seguir, serão abordados métodos de decomposição de amostras por MAWD e por MIC.

Tabela 1. Resumo de métodos de preparo de amostra usados para insetos comestíveis e posterior determinação elementar.

Amostras	Analito(s)	Método de preparo de amostra	Técnica de quantificação	Referência
Gafanhoto de Bombaim (<i>Nomadacris sucinto</i>), escaravelho (<i>Scarabaeidae</i>), grilo doméstico (<i>Acheta domesticus</i>) e bicho-da-seda (<i>Bombyx mori</i>)	Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Cd, Cu, Mo, Pb, Zn, As, Se e Hg.	MAWD: 300 mg de amostra foram digeridas em um forno de micro-ondas com 1 mL de H ₂ O e 2,5 mL de HNO ₃ .	ICP-OES ICP-MS CVG-AAS HG-AAS	28
Mosca doméstica (<i>Musca domestica</i>), mosca garrafa azul (<i>Calliphora vomitoria</i>), mosca varejeira (<i>Chrysomya spp.</i>) e mosca soldado preto (<i>Hermetia illucens</i>).	Cd	MAWD: 500 mg de amostra foram digeridas com 5 mL de uma mistura 4:1 de HNO ₃ e HCl em um forno de micro-ondas com câmara única de reação.	ICP-MS	25
Mariposa da cera (<i>Galleria mellonella</i>), besouro da farinha (<i>Tenebrio molitor</i>), verme de búfalo (<i>Alphitobius diaperinus</i>) e gafanhoto (<i>Locusta Migratória</i>)	As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sn e Zn	Digestão ácida em sistema aberto: 100 mg de amostra foram digeridos com 2 mL de HNO ₃ concentrado e 200 mL de H ₂ O ₂ 30%.	ICP-MS	27
Besouro da farinha (<i>Tenebrio molitor</i>)	Cd, Pb, Ni, As e Hg	MAWD: 500 mg foram digeridos com uma mistura de HNO ₃ concentrado e H ₂ O ₂ 30% em um forno de micro-ondas.	GFAAS TDA AAS	29

2.3.1. Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas

O método de MAWD consiste na oxidação da matéria orgânica da amostra utilizando-se ácido nítrico e/ou a sua combinação com outros ácidos (HCl, H₂SO₄, HF, entre outros), sob aquecimento com radiação micro-ondas em um sistema fechado. Ao final do processo, os analitos em solução ficam na forma de íons inorgânicos, para que possam posteriormente ser determinados.³⁹

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas, que se propagam em frequências de 300 até 300.000 MHz, contudo, devido a interferências nas telecomunicações, só são permitidas em equipamentos de uso científico, frequências de 900 a 2450 MHz. O aquecimento utilizando-se esta energia alternativa ocorre devido à absorção da radiação pela solução de digestão que ocasiona os fenômenos de migração iônica e rotação dipolar, fazendo com que o aquecimento seja mais rápido e homogêneo, se comparado ao aquecimento convectivo.⁴¹

Sistemas mais comuns de fornos de micro-ondas permitem atingir uma temperatura em torno de 280 °C e pressão de até 80 bar no meio reacional. Contudo, essas condições muitas vezes não permitem a decomposição completa de massas elevadas de amostras com elevado teor de lipídios (insetos por exemplo), uma vez que o poder oxidante do HNO₃ está atrelado à temperatura que ele pode atingir.⁴² Assim, sistemas que atingem pressões na ordem de 199 bar e temperaturas na faixa de 300 °C foram desenvolvidos. Estes sistemas proporcionam tais condições pois possuem uma câmara única de reação (SRC, do inglês *single reaction chamber*) que é pressurizada com um gás inerte (argônio ou nitrogênio). Dessa forma, elevadas massas de amostras podem ser decompostas (até 1,5 g), resultando em digeridos com baixo teor de carbono e acidez residual.⁸ Diversos trabalhos demonstram a viabilidade da MAWD-SRC para o preparo de amostras de alimentos, tais como leite em pó, fígado bovino, solução enteral, mel, entre outros.⁴³⁻⁴⁶

Mesmo promissores, os métodos de MAWD geralmente requerem o uso de soluções ácidas concentradas e muitas vezes uma etapa prévia de reação em sistema aberto para evitar picos de pressão e projeções durante a rampa de aquecimento.²⁸ Por meio disso, métodos que minimizem o uso de reagentes e tempo vêm sendo investigados para o preparo de amostras, tal como a MIC.¹⁰

2.3.2. Combustão iniciada por micro-ondas

Os métodos de combustão envolvem a queima da amostra, gerando como produto CO_2 e H_2O , podendo utilizar sistemas abertos ou fechados. Nos sistemas abertos, como no caso da combustão via seca em forno tipo mulfa, é reportada a perda de analitos por volatilização, por esse fato, os métodos de combustão em sistema fechado ganham destaque.¹⁰

Dentre os métodos de combustão em sistema fechado pode-se citar a bomba de combustão e o frasco de Schöniger.^{47,48} Apesar de segura, a bomba de combustão possui limitações quando o objetivo é a determinação de metais, pois pode apresentar contaminação para estes analitos, uma vez que é constituída internamente de partes metálicas.⁷ Já o frasco de Schöniger apresenta problemas para a ignição do sistema, que geralmente é feita de forma manual, requerendo atenção contínua por parte do analista durante a combustão.⁷ Outrossim, algumas fontes de contaminação podem estar presentes, principalmente relacionadas ao material usado para embrulhar ou encapsular a amostra.^{10,7}

Diante disso, Flores *et al.* (2004), desenvolveram a MIC, que alia as vantagens dos métodos de combustão em sistema fechado com as vantagens da MAWD, conforme mostrado na Figura 1. Diferentemente dos métodos de combustão tradicionais, a MIC permite a queima de massas elevadas de amostra, em um forno de micro-ondas que possui um sistema de segurança, garantindo baixos LODs e LOQs, além de evitar a perda de analitos por volatilização e reduzir as contaminações.⁴⁹

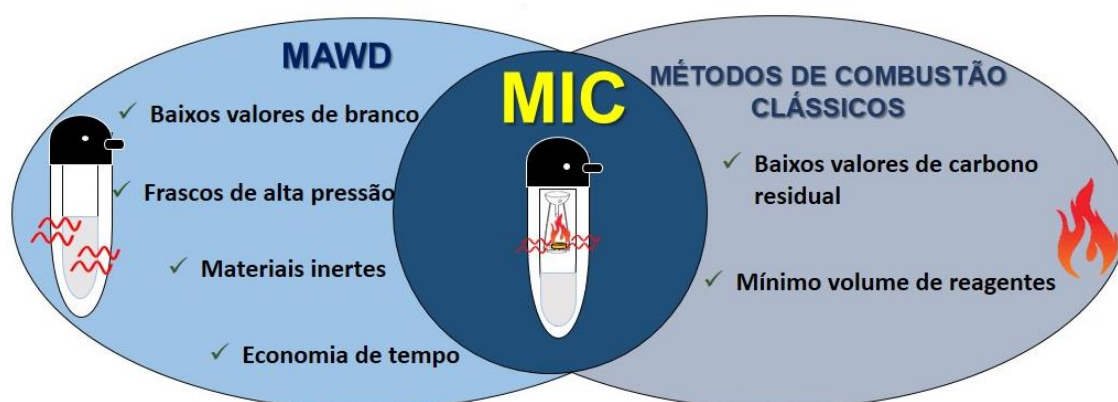


Figura 1. Vantagens da MAWD e dos métodos clássicos de combustão. Adaptado de Flores, *et. al* (2007).⁷

Na MIC, a amostra na forma de comprimido ou invólucro é disposta sobre um papel filtro que contém uma solução iniciadora de combustão (NH_4NO_3 6 mol L^{-1}). O frasco é fechado e pressurizado com aproximadamente 20 bar de O_2 , para favorecer o processo de queima, seguindo posteriormente para o forno de micro-ondas. Quando as micro-ondas entram em contato com o papel contendo o iniciador de combustão, este produz uma reação exotérmica, fazendo com que o papel e a amostra queimem devido a atmosfera rica em O_2 .^{10,49} Após a queima, pode ser aplicada uma etapa de refluxo com irradiação das micro-ondas por um período de, geralmente, 5 minutos. Os analitos são absorvidos em um solução adequada (geralmente ácida para metais e alcalina para halogênios) chamada de solução absorvedora.⁵⁰ Na Figura 2, encontra-se a representação do sistema utilizado para a MIC.

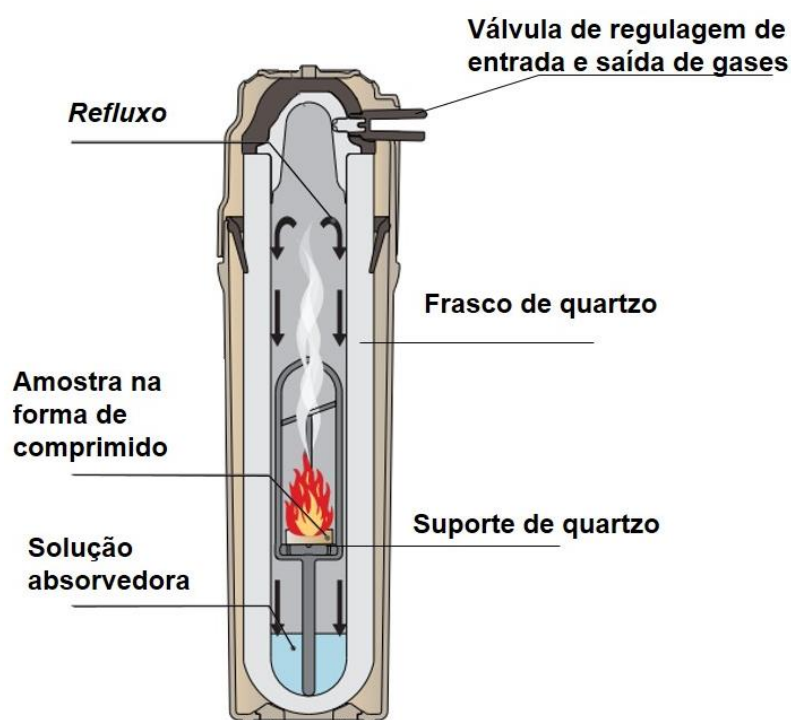


Figura 2. Representação do sistema utilizado na MIC. Adaptado de Anton Paar (2019).⁵¹

Por resultar em baixíssimos teores de carbono em solução e fazer uso de soluções diluídas, a MIC vem sendo empregada para diversas amostras, incluindo alimentícias, os quais pode-se citar: leite em pó, peixe, nozes, farinha, cereais, granola, entre outros.^{12,15,17,18,50,52} Contudo, nenhum trabalho foi encontrado para a decomposição de amostras de insetos comestíveis e posterior determinação de As, Cd e Pb.

3. MATERIAS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os equipamentos utilizados, reagentes, os procedimentos de descontaminação, métodos de referência e caracterização das amostras. Além disso, serão reportados os procedimentos utilizados para a otimização da MIC para a decomposição das amostras de insetos comestíveis para posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS.

3.1. INSTRUMENTAÇÃO

A decomposição das amostras de insetos por MAWD-SCR foi feita utilizando um forno de micro-ondas (UltraWAVE® Single Reaction Chamber, Milestone, Itália), com frascos de quartzo com volume interno de 15 mL (Figura 3). O frasco reacional de PTFE presente no equipamento, foi preenchido com 130 mL de H₂O e 5 mL de HNO₃ P.A. A temperatura e a pressão máximas estabelecidas foram de 270 °C e 160 bar, respectivamente.

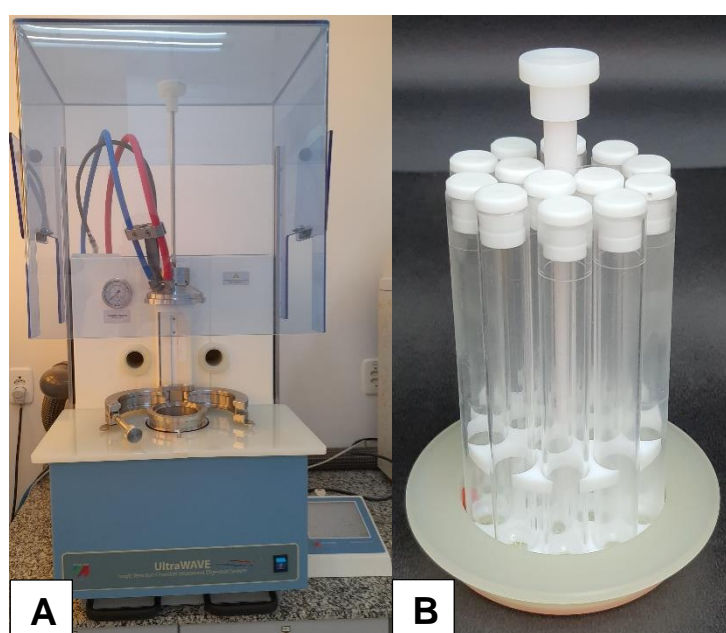


Figura 3. Sistema de decomposição por MAWD-SRC: A) Forno de micro-ondas; B) Frascos de quartzo.

O procedimento de MIC foi feito utilizando-se um forno de micro-ondas (Multiwave Pro®, Anton Paar, Áustria), com rotor para capacidade de 8 frascos de quartzo (volume interno de 80 mL) (Figura 4). Estabeleceu-se como pressão e temperatura máximas, 80 bar e 280 °C. Suportes de quartzos foram utilizados para a combustão (Figura 4-B).

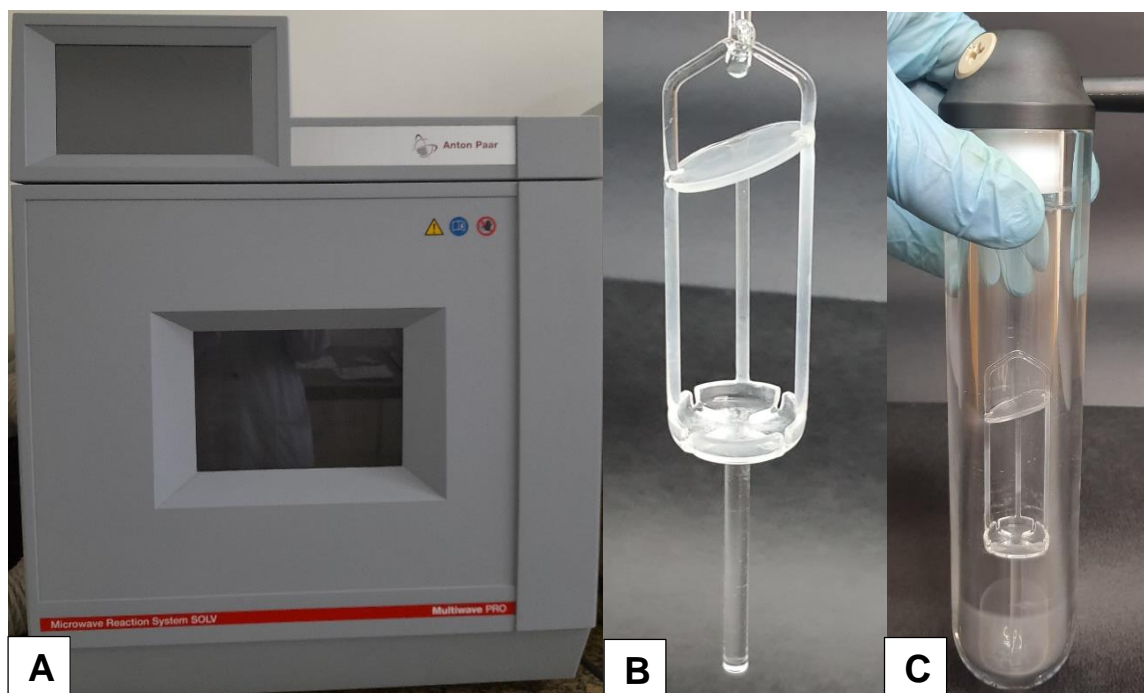


Figura 4. Sistema de MIC. A) Forno de micro-ondas Multiwave Pro®; B) Suporte de quartzo para o processo de combustão C) Frascos de quartzo com suporte.

Para a determinação de As, Cd e Pb nos digeridos utilizou-se um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (NexION 300X®, Perkin Elmer, Canadá), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard tipo A, Golden, Estados Unidos), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro interno.

A determinação de carbono em solução e de Ca, Na, K, Mg, Mn, S, P, Zn e Fe nos digeridos, foi feita utilizando-se um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (Optima 4300 DV, Perkin Elmer, Estados Unidos), equipado com nebulizador concêntrico (Meinhard tipo A, Golden, Estados Unidos) com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno. Na Tabela 2 estão descritos os parâmetros operacionais dos equipamentos de ICP-MS e de ICP-OES.

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

Parâmetro	ICP-OES	ICP-MS
Potência do gerador de radiofrequência, W	1400	1300
Vazão do gás principal, L min ⁻¹	15	15
Vazão do gás auxiliar, L min ⁻¹	0,2	1,2
Vazão do gás de nebulização, L min ⁻¹	0,7	1
Cone de amostragem e <i>skimmer</i>	-	Pt
<i>Hiperskimmer</i>	-	Al
Configuração de vista	Axial	-
Comprimento de onda espectral, nm	C (193.030), Ca (396.847), Na (589.373), K (766.491), Mg (280.270), Mn (259.592), S (182.634), P (177.495), Zn (206.191) e Fe (238.204)	-
Isótopos monitorados, <i>m/z</i>	-	⁷⁵ As, ¹¹⁴ Cd, ²⁰⁸ Pb

Para a determinação da acidez residual nos digeridos utilizou-se um titulador automático (Titrand 836, Metrohm, Suíça) equipado com módulo de agitação magnética (803, Ti Stand, Metrohm, Suíça), uma bureta de 20 mL (Dosino 800, Metrohm, Suíça) e um eletrodo de pH de vidro combinado (modelo 6.0262.100 LL Plus, Metrohm, Suíça).

3.2. REAGENTES

A água utilizada durante todos os procedimentos foi previamente destilada, deionizada em uma coluna de troca iônica e posteriormente foi purificada em um sistema Milli-Q (Milli-Q®, Millepore, Estados Unidos), atingindo uma resistividade de 18,2 MΩ cm. O ácido nítrico (65%, Merck, Alemanha), foi destilado em um sistema de sub-ebulição (duoPOR® 2.01E, Milestone, Itália). A solução iniciadora de combustão, NH₄NO₃ 6 mol.L⁻¹ foi previamente preparada a partir do seu respectivo sal (NH₄NO₃, Merck, Alemanha). Discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (Black Ribbon Ashless nº 5891, Schleicher e Schüll, Alemanha), foram utilizados para auxiliar no processo de combustão.

A curva de calibração de As, Cd e Pb (0,05 a 10 µg L⁻¹), foi preparada em HNO₃ 5% fazendo-se diluições de uma solução estoque de 10 mg L⁻¹ desses analitos

(SCP33MS, SCP Science, Canadá). Para a determinação de Ca, Na, K, Mg, Mn, Zn e Fe, preparou-se uma curva de calibração de (1 a 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$) em HNO_3 5% fazendo-se diluições de uma solução estoque de 10 mg L^{-1} desses analitos (SCP33MS, SCP Science, Canadá) e 100 mg L^{-1} (Merck, Alemanha). Já para a determinação de S e P, preparou-se uma curva de calibração (250 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para S e 25 a 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para P) em HNO_3 5% fazendo-se a diluição de soluções estoque de S 1000 mg L^{-1} e P 1000 mg L^{-1} .

Para a determinação de C em solução, preparou-se uma curva de calibração de 10 a 500 mg L^{-1} , a partir de uma solução estoque de 1000 mg L^{-1} , obtida a partir da dissolução de ácido cítrico (Vetec, Brasil) em HNO_3 5%. Como padrão interno na determinação de C, utilizou-se 1 mg L^{-1} de ítrio, obtido a partir de uma solução de referência monoelementar (1000 mg L^{-1} em HNO_3 2%, Spex, EUA). As amostras e padrões foram purgados com Ar por 2 minutos antes da medida.

Para a determinação da acidez residual, utilizou-se uma solução de KOH 0,1 mol L^{-1} , preparada a partir da dissolução do KOH (Merck, Alemanha) em água. A padronização do titulante foi feita com biftalato de potássio (Merck, Alemanha), que foi previamente seco a 105^o C por 2 horas.

A pressurização dos frascos no procedimento de MIC foi feita utilizando oxigênio de pureza 99,6 % (White Martins, Brasil). Nas determinações por ICP-MS e por ICP-OES, gás argônio com pureza de 99,998% (White Martins, Brasil) foi utilizado para a geração do plasma e como gás auxiliar.

3.3 AMOSTRAS

Neste trabalho, foram utilizadas 4 amostras de insetos comestíveis, que estão descritas na Tabela 3. Estas amostras foram adquiridas por meio da compra de empresas que produzem insetos para fins de alimentação humana e animal e estão representadas na Figura 5.

Tabela 3. Descrição das amostras de insetos.

Amostra	Inseto	Nome científico	País de origem
A	Grilo	<i>Acheta domesticus</i>	China
B	Gafanhoto	<i>Oxya yezoensis Sp</i>	Tailândia
C	Besouro	<i>Phyllophaga</i>	Tailândia
D	Larva de tenébrio	<i>Tenebrio molitor</i>	Brasil

**Figura 5.** Amostras de insetos utilizadas neste trabalho: A) Grilo; B) Gafanhoto; C) Besouro; D) Larva de *tenebrio molitor*

Para a otimização do método proposto (MIC), utilizou-se arbitrariamente a amostra “A”. Todas as amostras foram cominuídas utilizando um moinho de trituração por impacto (A 11 basic, IKA®, Alemanha), equipado com um copo de trituração e rotor de percussão de aço. A pesagem das amostras foi feita em uma balança analítica (AY 220, Shimadzu do Brasil, Brasil), com resolução de 0,001 g e carga máxima de 220 g. Para o procedimento de MIC, comprimidos das amostras foram confeccionados em uma prensa hidráulica utilizando-se 5 toneladas de força, conforme pode ser observado na Figura 6.

**Figura 6.** Suporte com pallet da amostra “A”

A avaliação da exatidão do método de referência e do método proposto foi feita utilizando-se os materiais de referência certificado (CRM) de proteína de peixe, DORM-5 (*National Research Council of Canada, Canadá*) e DORM-3 (*National Research Council of Canada, Canadá*).

3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os teores de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos foram determinados pelos métodos descritos na AOAC (2016).⁵³ A umidade foi determinada pela secagem em estufa a vácuo a 105 °C, até peso constante. A determinação de cinzas foi feita por incineração da amostra em mufla a 550 °C. O nitrogênio total foi determinado pelo método de micro Kjeldahl, e o teor de proteína bruta, foi calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25. A determinação de carboidratos foi realizada por diferença, sendo subtraído de 100 a soma dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas. A fração lipídica foi determinada através da extração a frio, seguindo as orientações descritas por Bligh & Dyer (1959).⁵⁴ Essas determinações foram feitas no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

Para a análise dos macro e micronutrientes, 300 mg de amostra foram digeridas por digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC) com 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹, em frascos de quartzo de 15 mL, sendo submetidos ao seguinte programa de aquecimento: *i*) 20 minutos até 250 °C *ii*) 20 minutos de permanência em 250° *iii*) resfriamento até 60 °C. Posterior a decomposição, os digeridos foram aferidos a 25 mL com água ultrapura, seguindo para a análise de Ca, Na, K, Mg, Mn, S, P, Zn e Fe por ICP-OES

3.5. PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

As vidrarias e demais materiais de uso comum no laboratório, foram previamente descontaminados por imersão em HNO₃ 10%(v v⁻¹), por pelo menos 24 horas, e lavados com água antes do uso. Os discos de papel filtro utilizados na MIC foram descontaminados com HNO₃ 20%(v v⁻¹) em banho ultrassônico durante 30 minutos, seguida da lavagem com água e secos em capela de fluxo laminar.

Os frascos e suportes de quartzo utilizados no procedimento de MIC foram descontaminados com 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} P.A. em forno de micro-ondas usando o seguinte programa de irradiação: 1000 W por 10 minutos e resfriamento a 0 W por 20 minutos. Posteriormente ao término do programa, o resíduo ácido foi descartado e os materiais foram lavados com água e secos com ar comprimido. Já os frascos utilizados no procedimento de MAWD-SRC, foram descontaminados utilizando 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} P.A, em forno de micro-ondas, com o seguinte programa de irradiação: 15 minutos até 250 °C com 15 minutos de permanência e resfriamento até 50 °C. Após o término do programa, o resíduo ácido foi descartado e os materiais foram lavados com água e secos com ar comprimido.

3.6. MÉTODOS DE REFERÊNCIA

Para avaliação da exatidão do método proposto, dois métodos de referência foram empregados: digestão ácida com aquecimento convencional e a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC), que estão descritos a seguir.

3.6.1. Digestão ácida com aquecimento convencional

A digestão ácida com aquecimento convencional foi feita utilizando-se 50 mg de amostra e 1,5 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} . A decomposição foi feita em frascos de polipropileno de 15 mL, sendo estes submetidos a aquecimento em banho-maria durante duas horas. Após a decomposição, os digeridos foram aferidos a 5 mL com água ultrapura e posteriormente analisados por ICP-MS.

3.6.2. Digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação

O procedimento de MAWD-SCR, foi feito utilizando-se 300 mg de amostra e 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} . Foram usados frascos de quartzo de 15 mL e o seguinte programa de aquecimento foi utilizado: *i*) 20 minutos até 250 °C, *ii*) 20 minutos de permanência em 250 °C, *iii*) resfriamento até 60 °C. Após a decomposição, os

digeridos foram aferidos a 25 mL com água ultrapura, seguindo para a análise por ICP-MS.

3.7. COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS

O procedimento de MIC (método proposto) foi feito por meio da seguinte forma: um disco de papel filtro foi disposto no suporte de quartzo, seguiu-se da adição de 50 μL de uma solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} (iniciador de combustão) sobre o papel; após, posicionou-se a amostra em forma de comprimido sobre o papel; o suporte de quartzo foi inserido no interior do frasco de quartzo, previamente preenchido com 6 mL da solução absorvedora; os frascos foram tampados e presos ao rotor; em seguida, os frascos foram pressurizados durante 30 segundos com O_2 , atingindo uma pressão interna média de 20 bar em cada frasco; posteriormente, o conjunto de frascos foi submetido ao seguinte programa de aquecimento (i) 1400 W por 5 min, e (ii) 0 W por 20 min (etapa de resfriamento). Monitorando-se a pressão e a temperatura interna dos frascos. As amostras decompostas foram aferidas a 25 mL com água ultrapura, seguindo para a etapa de determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Na Figura 7 encontra-se ilustrado o procedimento de MIC.

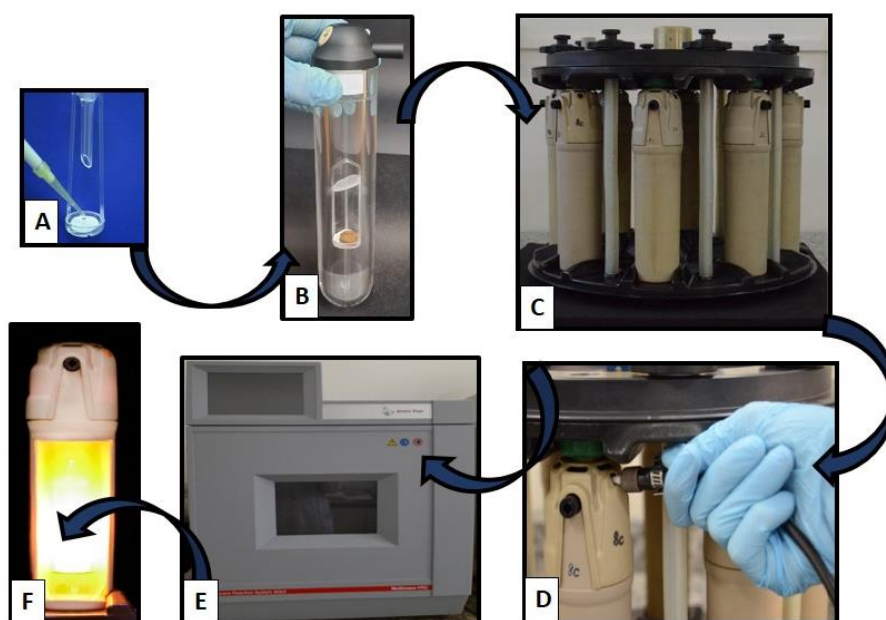


Figura 7. Resumo do procedimento de MIC. A) Adição do iniciador de combustão; B) Frasco com a solução absorvedora e amostra; C) Frascos posicionados no rotor; D) Pressurização com O_2 ; E) Conjunto de frascos no interior do forno de micro-ondas; F) Combustão da amostra. As flechas em azul representam o fluxo das operações.

Para o desenvolvimento do método proposto, avaliou-se a massa máxima de amostra, a concentração da solução absorvedora (HNO_3) e o tempo de refluxo.

3.7.1. Avaliação da massa de amostra

Para a otimização do método de MIC, inicialmente fez-se a avaliação da massa máxima de amostra, levando em consideração a queima completa e a pressão interna do frasco durante a combustão, uma vez que pressões acima de 80 bar, podem comprometer a segurança do sistema. Por conta disso, massas de 100 a 600 mg foram avaliadas.

3.7.2. Avaliação da concentração da solução absorvedora

Com a massa de amostra estabelecida, avaliou-se a concentração da solução absorvedora. Para isso, soluções de HNO_3 (3, 5, 7 e 14,4 mol L^{-1}) foram utilizadas, empregando-se 5 minutos de refluxo a 1400 W. O uso de soluções diluídas foi priorizada nesta etapa, visando a diminuição do uso de reagentes.

3.7.3. Avaliação do tempo de refluxo

Com o objetivo de diminuir a concentração da solução absorvedora, tempos de refluxo de 5, 10 e 15 minutos a 1400 W foram avaliados, utilizando-se como solução absorvedora HNO_3 5 mol L^{-1} .

3.8. CÁLCULO DOS LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

Os LODs, em ng g^{-1} , dos métodos empregados neste estudo foram calculados considerando a leitura de 10 medidas da solução do branco, fazendo-se a multiplicação por 3 do desvio padrão destas leituras, somada a média obtida por esta medida. Já para os LOQs, em ng g^{-1} , fez-se a multiplicação por 10 do desvio padrão das 10 leituras do branco, somada a média das leituras.⁵⁵ Para ambos os cálculos, considerou-se o volume de aferição, massa de amostra e a diluição necessário para a etapa de determinação por ICP-MS.

3.9. TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados gerados por este trabalho foram tratados utilizando-se o software de planilha eletrônica Microsoft Excel, versão 2013. (Microsoft, Estados Unidos). Já os testes estatísticos foram feitos utilizando-se o software GraphPad InStat versão 3.0, 1997 (GraphPad InStat Software, Estados Unidos).

3.10. RESUMO DOS PROCEDIMENTOS

Neste trabalho, a MIC foi avaliada como método de preparo de amostra de insetos comestíveis para posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Como variáveis, estudou-se a massa de amostra, concentração da solução absorvedora e tempo de refluxo. Na Figura 8, encontra-se um fluxograma dos procedimentos avaliados neste trabalho.

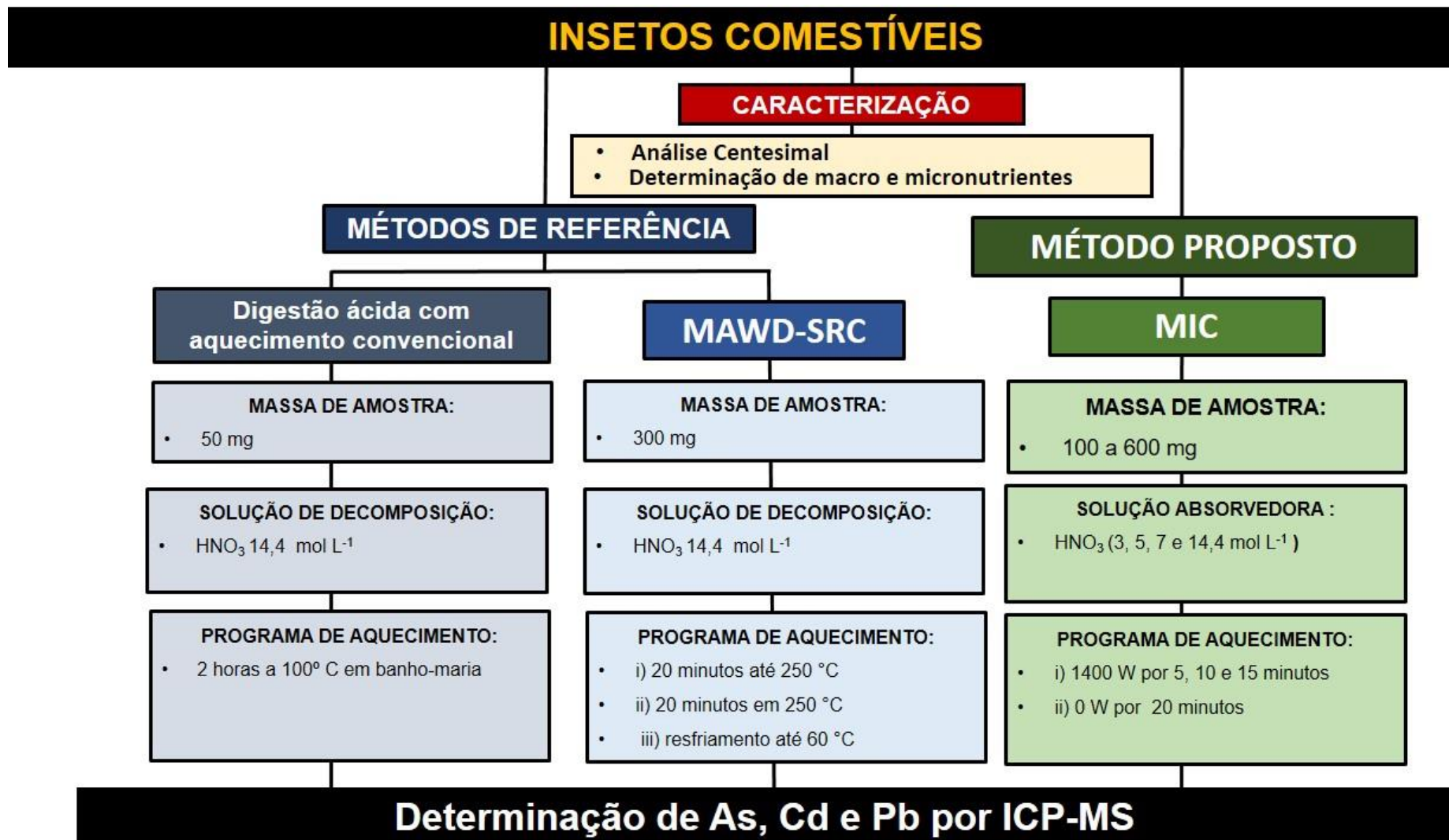


Figura 8. Fluxograma dos procedimentos experimentais feitos neste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na caracterização das amostras, na avaliação dos métodos de referência, bem como a avaliação dos parâmetros utilizados na decomposição por MIC visando a determinação de As, Cd e Pb em insetos por ICP-MS. As melhores condições foram selecionadas com base na concordância com a MAWD-SRC.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de insetos utilizadas neste trabalho foram caracterizadas em relação ao teor de proteínas, lipídios, umidade, cinzas e carboidratos, conforme descrito no item 3.4 (*Materiais e Métodos*). Na Tabela 4, estão expressos os resultados para esta caracterização em g/100g (%).

Tabela 4. Composição centesimal das amostras de insetos.

Amostra	Teor, %				
	Proteína	Lipídios	Umidade	Cinzas	Carboidratos
A	50,8 ± 0,1	23,9 ± 0,4	7,75 ± 0,13	4,59 ± 0,03	12,9 ± 0,3
B	68,1 ± 0,7	9,97 ± 0,64	6,54 ± 0,38	3,15 ± 0,02	12,2 ± 0,6
C	60,9 ± 0,5	6,72 ± 0,16	11,2 ± 0,7	4,46 ± 0,07	16,7 ± 1,2
D	28,1 ± 0,9	37,4 ± 0,6	5,87 ± 0,08	13,2 ± 0,3	15,4 ± 0,7

Na Tabela 4, observa-se que a amostra com maior teor de proteína é a amostra “B” (gafanhoto) com 68,1 ± 0,7%, enquanto que a amostra “D” (larva de *tenébrio molitor*) apresenta a maior quantidade de lipídios (37,4 ± 0,6%) e de cinzas (13,2 ± 0,3%). Estes resultados são condizentes com estudos feitos por Rumpold e Sclüter (2013), que estudaram a composição nutricional de insetos comestíveis de diferentes origens geográficas.²⁴

Na Tabela 5, estão apresentadas as concentrações dos macro e micronutrientes (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, S e Zn) em mg kg⁻¹, após decomposição por MAWD-SRC e determinação por ICP-OES, conforme descrito no item 3.4 (*Materiais e Métodos*). Observa-se que a amostra “C” (besouro), possui maior concentração de Na (3422 ± 120 mg kg⁻¹), K (8920 ± 346 mg kg⁻¹) e Zn (184 ± 4 mg kg⁻¹) em relação as amostras estudadas. As concentrações destes macro e micronutrientes estão de encontro com estudos reportados por Köhler, *et al.* (2019) e por Hlongwane *et al.*(2020).^{56,57}

Já a amostra “D” (larva de *tenebrio molitor*), possui maior concentração de Ca (39365 ± 852 mg kg⁻¹) e Mg (2061 ± 55 mg kg⁻¹), que podem estar correlacionados ao seu estágio de desenvolvimento (larva), ao passo que as demais amostras já estão em fase adulta.^{24,25}

Tabela 5. Concentração de macro e micronutrientes nas amostras de insetos obtidas por ICP-OES após MAWD-SRC (média \pm SD, n=3).

Amostra	Concentração, mg kg ⁻¹								
	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	S	Zn
A	1996 \pm 91	659 \pm 4	6362 \pm 88	860 \pm 15	115 \pm 2	2420 \pm 30	6552 \pm 103	5075 \pm 87	172 \pm 5
B	1049 \pm 232	95,5 \pm 13,0	6625 \pm 129	845 \pm 30	12,6 \pm 0,6	521 \pm 5	5996 \pm 38	4333 \pm 151	144 \pm 13
C	549 \pm 25	477 \pm 29	8920 \pm 346	1744 \pm 76	14,1 \pm 1,1	3422 \pm 120	5248 \pm 202	4981 \pm 278	184 \pm 5
D	39365 \pm 852	366 \pm 14	8185 \pm 168	2061 \pm 55	82,0 \pm 4,1	2250 \pm 86	5574 \pm 128	2860 \pm 151	47,7 \pm 2,2

4.2. MÉTODOS DE REFERÊNCIA PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb POR ICP-MS

Para a obtenção dos valores de referência de As, Cd e Pb fez-se a decomposição por MAWD-SRC e por digestão ácida com aquecimento convencional da amostra “A”, conforme descrito nos itens 3.6.1 e 3.6.2 (*Materiais e Métodos*). Os resultados obtidos após a determinação por ICP-MS, estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores de referência para As, Cd e Pb obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MAWD-SRC e digestão ácida com aquecimento convencional (média \pm SD, n=3).

Analito	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$	
	MAWD-SRC	Digestão ácida
As	0,402 \pm 0,015	0,406 \pm 0,026
Cd	0,065 \pm 0,001	< 0,082*
Pb	0,806 \pm 0,014	0,777 \pm 0,038

*LOQ obtido por ICP-MS

É possível observar na Tabela 6 que não houve diferença significativa (teste *t-student*, 95% de confiança) entre os valores de As obtidos após a MAWD-SRC e após a digestão ácida com aquecimento convencional na amostra “A”. Já os valores de Cd e Pb, ficaram abaixo do LOQ na digestão ácida com aquecimento convencional. A fim de se avaliar a exatidão destes métodos de preparo de amostras, fez-se a decomposição dos CRMs DORM-5 e DORM-3 utilizando os dois métodos e seguiu-se a determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 7, bem como os valores certificados.

Tabela 7. Valores certificados de As, Cd e Pb para os CRMs DORM-5 e DORM-3 e obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MAWD-SRC e digestão ácida com aquecimento convencional (média \pm SD, n=3).

Analito	DORM-5			DORM-3		
	MAWD-SRC	Digestão ácida	Valor certificado	MAWD-SRC	Digestão ácida	Valor certificado
As	13,3 \pm 0,07	16,3 \pm 0,7	13,3 \pm 0,70	6,70 \pm 0,11	7,21 \pm 0,60	6,88 \pm 0,30
Cd	0,157 \pm 0,001	0,161 \pm 0,004	0,148 \pm 0,007	0,317 \pm 0,008	0,307 \pm 0,025	0,290 \pm 0,020
Pb	0,067 \pm 0,003	< 0,280 *	0,058 \pm 0,006	0,442 \pm 0,006	< 0,280 *	0,395 \pm 0,050

*LOQ obtido por ICP-MS.

Para ambos os métodos de preparo de amostras, não houve diferença significativa (teste *t-student*, 95% de confiança) entre os valores certificados de As e Cd dos CRMs DORM-5 e DORM-3 e os obtidos após a determinação por ICP-MS. Após a digestão ácida, os valores para Pb ficaram abaixo do LOQ para ambos os CRMs, enquanto que na MAWD-SRC, não houve diferença estatística significativa (teste *t-student*, 95% de confiança) entre o valor certificado de Pb e o obtido após a determinação por ICP-MS.

Como para ambos os CRMs não houve diferença significativa entre os valores de certificados e os obtidos experimentalmente, tanto a MAWD-SRC como a digestão ácida com aquecimento convencional se demonstraram adequadas para a decomposição das amostras de insetos e posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Contudo, a MAWD-SRC foi escolhida como método de referência para a digestão das demais amostras de inseto, pois permite a decomposição de um maior número de amostras em menor tempo (16 amostras em 60 min). Além disso, a MAWD-SRC permite a obtenção de soluções com menor teor de carbono em solução, diminui o risco de contaminações e resulta em menores LOQs.

4.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA MIC PARA A DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb POR ICP-MS

4.3.1. Avaliação da massa de amostra

A massa de amostra máxima que poderia ser empregada no método de MIC foi avaliada conforme o item 3.7.1 (*Materiais e Métodos*). Para tal, massas de 100 a

600 mg da amostra “A” foram submetidos ao procedimento de MIC. A avaliação da massa máxima de amostra passível de ser decomposta foi feita de forma visual, observando a aparência do resíduo presente no suporte ao final da combustão. Além disso, também observou-se a pressão atingida no interior do frasco durante a queima, a qual não poderia ser superior a 80 bar (pressão máxima recomendada pelo fabricante).

Foi possível a combustão de até 500 mg de amostra, atingindo uma pressão de aproximadamente 40 bar. Essa pressão é metade do valor de pressão máxima recomendada pelo fabricante, sendo a combustão feita de forma segura. Este resultado é condizente com estudos anteriores para a combustão de amostras com matriz similar, como frutos do mar, onde também foi possível a combustão completa de até 500 mg de amostra.¹⁵

Porém, quando 600 mg foram submetidos ao procedimento de MIC, foi possível observar que houve queima incompleta, restando fuligem no frasco e no suporte de quartzo, conforme pode ser visualizado na Figura 9. Por conta disso, a condição com 500 mg de amostra foi selecionada para avaliações posteriores.



Figura 9. Suporte de quartzo com fuligem devido a combustão incompleta na condição com 600 mg de amostra.

4.3.2. Avaliação da solução absorvedora

Com a máxima massa de amostra definida como sendo 500 mg, seguiu-se com a avaliação da solução absorvedora. Para a absorção de As, Cd e Pb, foram testadas diferentes concentrações de HNO_3 (3, 5, 7 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$), conforme descrito no item 3.7.2 (*Materiais e Métodos*). A solução absorvedora possui o papel de absorver os analitos após a combustão da amostra. Quando o objetivo é a determinação de

metais, geralmente, soluções diluídas de HNO_3 são empregadas, o que contribui para a redução do uso de reagentes e a geração de resíduos.⁵⁸

Os resultados obtidos para a avaliação da solução absorvedora foram comparados aos resultados obtidos pelo método de referência (MAWD-SRC) e calculados em termos de concordância (Figura 10). Como pode ser observado na Figura 9, concordâncias superiores a 90%, foram obtidas para As, Cd e Pb empregando-se soluções absorvedoras de HNO_3 14,4 e 7 mol L^{-1} . Concordâncias de 91% para As, 102% para Cd e 109% para Pb, foram obtidas quando utilizou-se como solução absorvedora HNO_3 14,4 mol L^{-1} . Já quando a solução absorvedora de HNO_3 7 mol L^{-1} foi empregada, concordâncias de 91% para As, 96% para Cd e 98% para Pb, foram observadas entre os valores obtidos após a MIC e a MAWD-SRC.

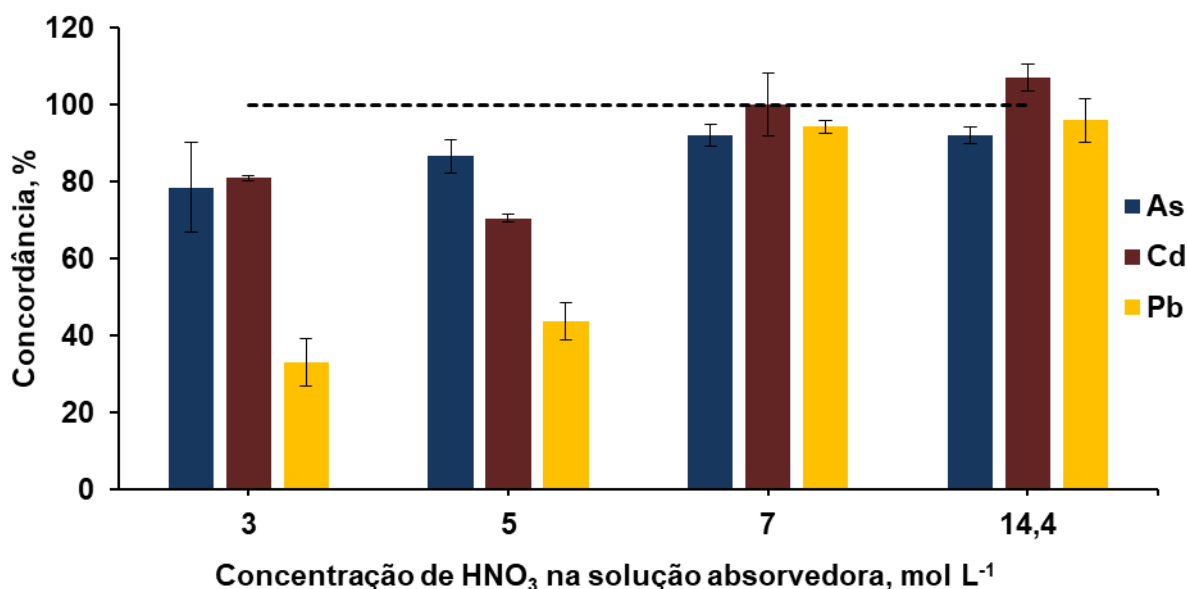


Figura 10. Resultados de concordância para As (■), Cd (■) e Pb (■) usando diferentes concentrações de HNO_3 como solução absorvedora. A linha tracejada representa 100% de concordância.

Porém, concordâncias abaixo de 85% foram observadas quando utilizou-se soluções absorvedoras com HNO_3 5 e 3 mol L^{-1} . Além disso, para Pb a concordância foi inferior a 45% quando estas soluções foram empregadas. Dessa forma, priorizando-se o uso de soluções diluídas e a obtenção de valores exatos, a solução absorvedora de HNO_3 7 mol L^{-1} foi escolhida como solução absorvedora na combustão de amostras de insetos comestíveis e posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS. Cabe salientar que não houve diferença significativa entre os valores obtidos por

MIC nesta condição (500 mg de amostra, 6 mL de HNO_3 7 mol L^{-1}) e por MAWD-SRC para As, Cd e Pb (teste t-student, 95% de confiança). Ademais, este resultado está de acordo com estudos de Marques Junior (2014), onde Cd e Pb foram determinados por ICP-MS após MIC, em amostras de chocolate utilizando-se uma solução absorvedora de HNO_3 7 mol L^{-1} .¹⁹

4.3.3. Avaliação do tempo de refluxo

Com o objetivo de reduzir o uso de reagentes e a geração de resíduos no método proposto (MIC), avaliou-se o efeito do aumento do tempo de refluxo (de 5 min para 10 ou 15 min) na concordância dos analitos usando a solução absorvedora de HNO_3 5 mol L^{-1} . Na MIC, o refluxo consiste em continuar irradiando os frascos após a etapa de combustão (a qual ocorre nos primeiros segundos de irradiação) a fim de aquecer a solução absorvedora, promovendo assim a lixiviação dos analitos que possam estar aderidos ao suporte de quartzo e a parede interna do frasco.⁵⁹ Os resultados desta avaliação estão apresentados na Figura 11. Contudo, como pode ser observado, a concordância para todos os analitos ficou abaixo de 90% em todos os tempos de refluxo avaliados usando a solução de HNO_3 5 mol L^{-1} .

Por conta disso, a condição utilizando-se 500 mg de amostra, solução absorvedora com HNO_3 7 mol L^{-1} e 5 min de refluxo foi escolhida para posterior determinação de As, Cd e Pb nas amostras de insetos comestíveis.

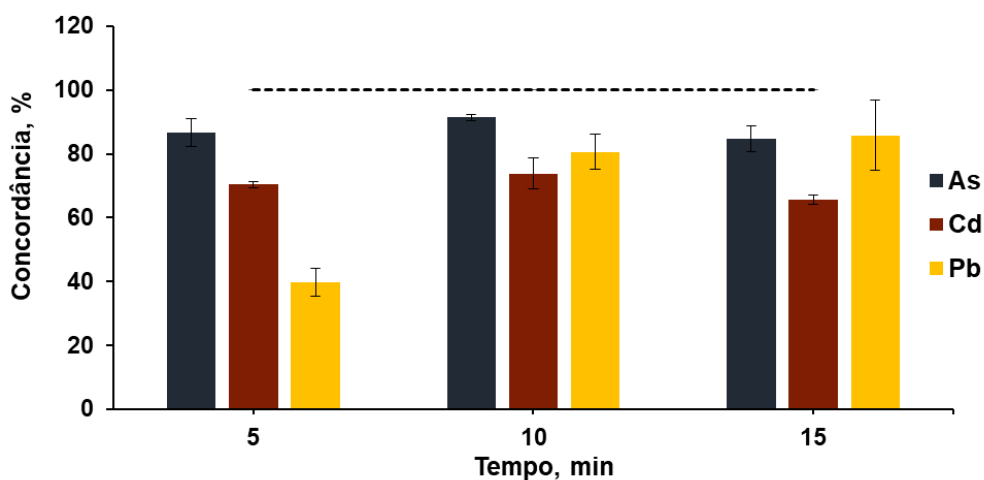


Figura 11. Resultados de concordância para As (■), Cd (■) e Pb (■) em diferentes tempos de refluxo, utilizando HNO_3 5 mol L^{-1} como solução absorvedora. A linha tracejada representa 100% de concordância

4.4. AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DA MIC

Com o método de MIC otimizado (500 mg de amostra, solução absorvedora com HNO_3 7 mol L^{-1} e 5 min de refluxo), avaliou-se a exatidão empregando-se os CRMs DORM-3 e DORM-5. Para isso, os CRMs foram submetidos ao procedimento de MIC, e os analitos (As, Cd e Pb), foram determinados por ICP-MS. Na Tabela 8, estão expressos os valores certificados para As, Cd e Pb dos CRMs DORM-5 e DORM-3 e os resultados obtidos após a decomposição por MIC (método proposto).

Tabela 8. Valores certificados de As, Cd e Pb para os CRMs DORM-5 e DORM-3 e obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MIC (média \pm SD, n=3).

Analito	DORM-5		DORM-3	
	MIC	Valor certificado	MIC	Valor certificado
As	14,3 \pm 0,3	13,3 \pm 0,7	6,80 \pm 0,34	6,88 \pm 0,30
Cd	0,143 \pm 0,008	0,148 \pm 0,007	0,280 \pm 0,006	0,290 \pm 0,020
Pb	0,062 \pm 0,005	0,058 \pm 0,006	0,337 \pm 0,037	0,395 \pm 0,050

Não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos com o método proposto e os valores certificados (teste t-student, 95% de confiança) para As, Cd e Pb no CRM DORM-3 e no CRM DORM-5.. Portanto, o método proposto se demonstrou adequado para o preparo de amostras de insetos comestíveis e posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS.

4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE INSETOS COMESTÍVEIS

Com o método de MIC otimizado e a exatidão avaliada, fez-se a aplicação do método para diferentes amostras de insetos comestíveis comerciais, que estão descritos na Tabela 3 (*Materiais e Métodos*). As amostras foram decompostas por MIC

utilizando-se 500 mg de amostra, HNO_3 7 mol L^{-1} como solução absorvedora e 5 min de refluxo.

A concordância entre os valores obtidos por MIC e por MAWD-SRC (método de referência) estão expostos no gráfico representado na Figura 12. Observou-se concordâncias acima de 90% para As, Cd e Pb para as amostras “A”, “B” e “C”. Ademais, não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos por MIC e pelo método de referência (teste *t-student*, 95% de confiança).

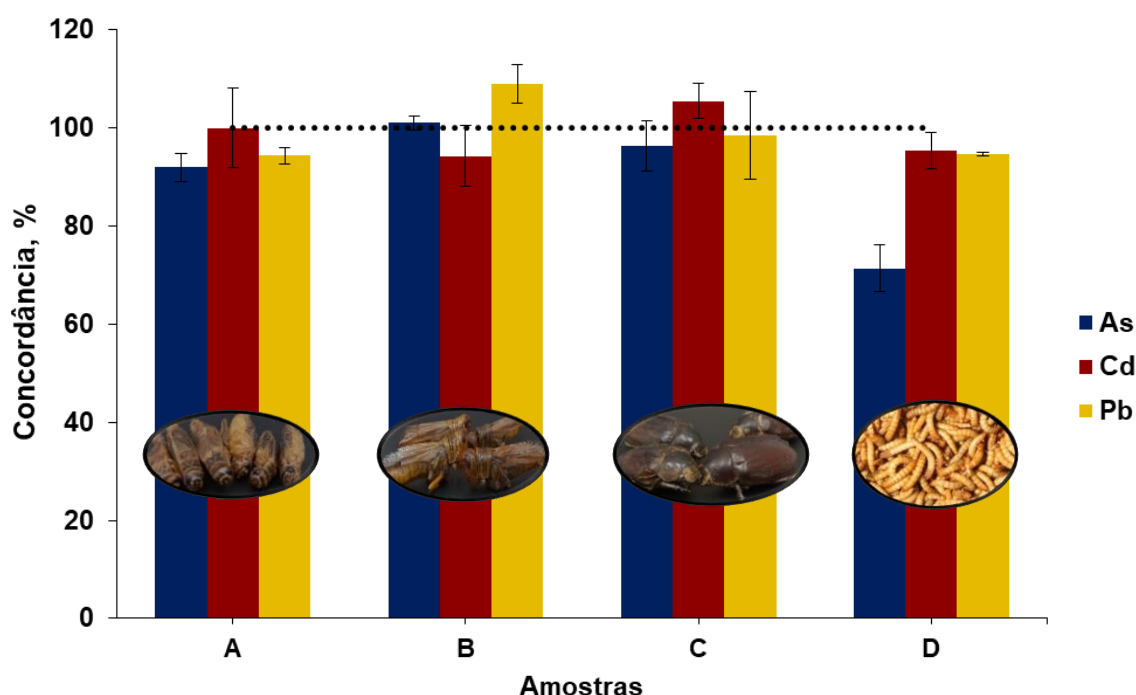


Figura 12. Resultados de concordância para As (■), Cd (■) e Pb (■) nas amostras estudadas. A linha tracejada representa 100% de concordância.

Para a amostra “D” (larva de *tenébrio molitor*), concordâncias acima de 90% foram obtidas para Cd e Pb e não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos após MIC e MAWD-SRC (teste *t-student*, 95% de confiança). Contudo, uma concordância de apenas 71% foi obtida para As nesta amostra (foi observada diferença estatística significativa entre o método proposto e o de referência, teste *t-student*, 95% de confiança). Após a combustão da amostra “D” observou-se a presença de um resíduo de cinzas no suporte de quartzo (Figura 13), o qual pode ter comprometido a recuperação de As. Conforme pode ser observado na Tabela 4 (composição centesimal das amostras de insetos), a amostra “D” apresentou um teor

de cinzas elevado (cerca de 13%), quando comparada as demais amostras (menor que 4,5%), o que pode explicar o problema de concordância de As nesta amostra. Ademais, segundo estudos de Corazza (2015), teores de cinza maiores que 14% influenciaram negativamente no processo de combustão de amostras de carvão mineral, comprometendo a concordância dos analitos como As, Cd e Pb, mesmo se estes não estiverem ligados a fração inorgânica.⁶⁰ Sendo assim, para a aplicação de MIC para amostras de inseto com teores elevados de cinzas (maior que 13%), mais avaliações são necessárias, como o uso de auxiliares de combustão (celulose ou cloreto de amônio) e/ou o aumento da concentração da solução absorvedora.



Figura 13. Resíduo após o procedimento de MIC da amostra “D”.

Na Tabela 9 estão mostrados os resultados obtidos para todas as amostras de inseto após a combustão iniciada por micro-ondas e posterior determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS

Tabela 9. Valores de As, Cd e Pb para as amostras de insetos comestíveis obtidos por ICP-MS, em $\mu\text{g g}^{-1}$, após a decomposição por MIC (média \pm SD, n=3).

Amostra	Concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$		
	As	Cd	Pb
A	0,370 \pm 0,012	0,066 \pm 0,005	0,761 \pm 0,013
B	0,048 \pm 0,001	0,027 \pm 0,003	0,042 \pm 0,002
C	2,58 \pm 0,220	0,062 \pm 0,006	0,165 \pm 0,015
D	0,226 \pm 0,015 *	0,181 \pm 0,014	1,40 \pm 0,040

*Diferença significativa (teste t-student, 95% de confiança).

É possível observar na Tabela 9 que a maior concentração de As ($2,58 \pm 0,22 \mu\text{g g}^{-1}$) foi obtida na amostra “C” (besouro), enquanto que as maiores concentrações de Cd ($0,181 \pm 0,014 \mu\text{g g}^{-1}$) e Pb ($1,40 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$) foram observadas na amostra “D” (larva de *tenébrio molitor*). De acordo com a legislação vigente no Brasil, os insetos comestíveis ainda não tiveram inclusão nas resoluções que estipulam a concentração máxima de contaminantes inorgânicos em alimentos, podendo-se somente ter um comparativo com os crustáceos, que também pertencem ao filo dos artrópodes. Assim, os limites máximos permitidos de contaminantes inorgânicos em alimentos (incluindo crustáceos) de acordo com a Resolução-RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estão apresentados na Tabela 10.⁶¹ A partir destes valores máximos permitidos, é possível observar que a amostra “C” (besouro), ultrapassa o limite máximo permitido para As (de $1 \mu\text{g g}^{-1}$). Além disso, as amostras “A” (grilo) e “D” (larva de *tenebrio molitor*) ultrapassam os limites máximos de Pb ($0,50 \mu\text{g g}^{-1}$).

Tabela 10. Limites máximos permitidos para As, Cd e Pb em crustáceos segundo a RDC Nº 42, de 29 de agosto de 2013, ANVISA.

Analito	Valor máximo, $\mu\text{g g}^{-1}$
As	1,00
Cd	0,50
Pb	0,50

A contaminação por As, Cd e Pb em insetos pode ser proveniente do processo de criação.²⁹ Segundo a EFSA, a presença de contaminantes inorgânicos pode estar atrelada a água, substrato, alimentação, além do estágio de vida do inseto.⁴

4.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA EMPREGADOS NESTE ESTUDO

Neste estudo a digestão ácida com aquecimento convencional e a MAWD-SRC foram empregadas como métodos de referência, enquanto que a MIC foi avaliada para o preparo de amostras de insetos comestíveis. Na Tabela 11 encontram-se uma comparação entre os três métodos de preparo de amostra.

Tabela 11. Comparação entre os métodos de preparo de amostra empregados neste trabalho.

Parâmetro	Digestão ácida	MAWD-SRC	MIC
C em solução, mg L ⁻¹	4872 ± 83	142 ± 9	< 13,6
Acidez, %	38	73	-
Tempo do procedimento, min	120	60	30
Concentração de HNO ₃ , mol L ⁻¹	14,4	14,4	7
Massa de amostra, mg	50	300	500
Número de replicatas por ciclo de decomposição	8 frascos em um béquer de 250 mL	16	8
Aferição, mL	5	25	25

A partir do comparativo apresentado na Tabela 11, observa-se que a MIC permite a obtenção de digeridos com menor concentração de C em solução, menor tempo de procedimento, com maior massa de amostra e menor concentração de HNO₃, se demonstrando promissora para o preparo de amostra de insetos comestíveis. Além disso, na Tabela 12 estão apresentados os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) para os três métodos de preparo de amostra.

Tabela 12. LODs e LOQs para os três métodos de preparo de amostra empregados neste trabalho em $\mu\text{g g}^{-1}$.

Analito	Valores em $\mu\text{g g}^{-1}$					
	Digestão ácida		MAWD-SRC		MIC	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
As	0,125	0,311	0,0205	0,0469	0,002	0,007
Cd	0,0378	0,0823	0,00363	0,00860	0,001	0,003
Pb	0,173	0,281	0,0221	0,0545	0,020	0,040

Conforme pode ser observado na Tabela 12, a MIC proporcionou a obtenção de menores LODs e LOQs para As, Cd e Pb, dentre os métodos de preparo de amostra empregados. Isso porque a MIC emprega uma massa elevada de amostra (500 mg), associada a não necessidade de diluição do digerido na etapa de determinação, devido aos baixos valores de C em solução e valor adequado de acidez (uso de HNO_3 7 mol L^{-1} no preparo da amostra).

Já a digestão ácida com aquecimento convencional, apresentou os maiores LODs e LOQs em comparação aos demais métodos, o que se deve ao fato deste método ocorrer em sistema aberto (estando suscetível a contaminação), além de utilizar uma menor massa de amostra e necessitar de diluição na etapa de determinação (valores elevados de C em solução no digerido).

Por fim, levando em consideração os limites máximos para As, Cd e Pb em crustáceos estipulados pela RDC N^o 42, de 29 de agosto de 2013 da ANVISA, os valores de LOQ obtidos pelo método de MIC para estes analitos estão menores que a concentração máxima permitida, o que demonstra que o método proposto é adequado para este fim.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que o método proposto para a decomposição de insetos comestíveis por MIC é adequado para posterior determinação de As, Cd e Pb em amostras com teores de cinza abaixo de 13%. Este método se demonstrou eficaz na decomposição das amostra (teores de C em solução menores que $13,6 \text{ mg L}^{-1}$), utilizando-se uma massa de amostra de 500 mg, 7 mol L^{-1} de HNO_3 como solução absorvedora e 5 minutos de refluxo.

Obteve-se concordâncias acima de 90% para Cd e Pb para todas as amostras. Entretanto, obteve-se 71% de concordância para As na amostra com o teor de cinzas de 13%. Por conta disso, o método de MIC deve ser futuramente melhorado para amostras de insetos com esta característica.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas (teste *t-student*, 95% de confiança), para As, Cd e Pb, entre a MIC e a MAWD-SRC para as amostras com teores de cinzas na faixa de 3 a 4,5 %. Por fim, o método proposto apresentou vantagens como o uso de soluções diluídas e o menor tempo de preparo de amostras, apresentando LODs e LOQs adequados para a determinação de As, Cd e Pb em amostras de insetos comestíveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raheem D, Raposo A, Oluwole OB, Nieuwland M, Saraiva A, Carrascosa C. Entomophagy: Nutritional, ecological, safety and legislation aspects. *Food Research International*. 2019 dez 1;126.
2. Nowak V, Persijn D, Rittenschober D, Charrondiere UR. Review of food composition data for edible insects. *Food Chemistry*. 2016 fev 15;193:39–46.
3. Miglietta PP, de Leo F, Ruberti M, Massari S. Mealworms for Food: A Water Footprint Perspective. *Water* 2015, Vol 7, Pages 6190-6203 [Internet]. 2015 nov 6 [citado 2022 ago 9];7(11):6190–203. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4441/7/11/6190/htm>
4. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA Journal*. 2015 out 1;13(10).
5. Hartwig CA, Pereira RM, Rondan FS, Cruz SM, Duarte FA, Flores EMM, et al. The synergic effect of microwave and ultraviolet radiation for chocolate digestion and further determination of As, Cd, Ni and Pb by ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [Internet]. 2016 fev 3 [citado 2022 ago 9];31(2):523–30. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ja/c5ja00388a>
6. Muller ALH, Oliveira JSS, Mello PA, Muller EI, Flores EMM. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. *Talanta* [Internet]. 2015 maio 1 [citado 2022 ago 9];136:161–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25702998/>
7. Krug FJ, Rocha FRP. Métodos de preparo de amostras para análise elementar. 2º ed. EditSBQ, organizador. São Paulo; 2019.
8. Nobrega JA, Pirola C, Fialho LL, Rota G, de Campos Jordão CEKMA, Pollo F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? *Talanta*. 2012 ago 30;98:272–6.
9. Pinheiro FC, Babos DV, Barros AI, Pereira-Filho ER, Nóbrega JA. Microwave-assisted digestion using dilute nitric acid solution and investigation of calibration strategies for determination of As, Cd, Hg and Pb in dietary supplements using ICP-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019 set 10;174:471–8.
10. Flores EMM, Barin JS, Mesko MF, Knapp G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [Internet]. 2007 set 1 [citado 2022 maio 3];62(9):1051–64. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0584854707001371>
11. Corazza G, Henn AS, Mesko MF, Duarte FA, Flores EMM, Mello PA. Microwave-Induced Combustion of Coal for Further Sulfur Determination by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry or Ion Chromatography. *J Braz*

- Chem Soc [Internet]. 2016 set 1 [citado 2022 maio 3];27(9):1569–76. Disponível em: <http://www.scielo.br/j/bchs/a/6jMkyGv39vMx4Jhdq4QF6rz/?lang=en>
12. Souza JP, Cerveira C, Miceli TM, Moraes DP, Mesko MF, Pereira JSF. Evaluation of sample preparation methods for cereal digestion for subsequent As, Cd, Hg and Pb determination by AAS-based techniques. Food Chem [Internet]. 2020 ago 15 [citado 2022 maio 6];321. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32259733/>
 13. Pereira JSF, Pereira LSF, Schmidt L, Moreira CM, Barin JS, Flores EMM. Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion. Microchemical Journal. 2013 jul;109:29–35.
 14. Rondan FS, Coelho Junior GS, Pereira RM, Henn AS, Muller EI, Mesko MF. A versatile green analytical method for determining chlorine and sulfur in cereals and legumes. Food Chem [Internet]. 2019 jul 1 [citado 2022 maio 6];285:334–9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30797354/>
 15. Duarte FA, Pereira JSF, Barin JS, Mesko MF, Dressler VL, Flores EMM, et al. Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation. Journal of Analytical Atomic Spectrometry [Internet]. 2009 jan 14 [citado 2022 maio 3];24(2):224–7. Disponível em: <https://pubs-rsc.org.ez47.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2009/ja/b810952d>
 16. Costa VC, Picoloto RS, Hartwig CA, Mello PA, Flores EMM, Mesko MF. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. Anal Bioanal Chem [Internet]. 2015 ago 27 [citado 2022 maio 6];407(26). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26310846/>
 17. Silva JS, Diehl LO, Frohlich AC, Costa VC, Mesko MF, Duarte FA, et al. Determination of bromine and iodine in edible flours by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. Microchemical Journal [Internet]. 2017 jul 1 [citado 2022 maio 3];133:246–50. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X16306233>
 18. Muller ALH, Muller CC, Lyra F, Mello PA, Mesko MF, Muller EI, et al. Determination of Toxic Elements in Nuts by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Microwave-Induced Combustion. Food Analytical Methods [Internet]. 2013 fev 1 [citado 2022 maio 3];6(1):258–64. Disponível em: <https://link-springer-com.ez47.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12161-012-9381-y>
 19. Marques Junior JM. Avaliação de métodos de decomposição de chocolate e determinação de metais por ICP-OES e ICP-MS [Dissertação de Mestrado]. [Santa Maria]: Universidade Federal de Santa Maria; 2014.
 20. Feng Y, Chen XM, Zhao M, He Z, Sun L, Wang CY, et al. Edible insects in China: Utilization and prospects. Insect Science. 2018 abr 1;25(2):184–98.
 21. Raheem D, Carrascosa C, Oluwole OB, Nieuwland M, Saraiva A, Millán R, et al. Traditional consumption of and rearing edible insects in Africa, Asia and Europe.

- Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2019 ago 6 [citado 2022 maio 7];59(14):2169–88. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29446643/>
22. Jantzen da Silva Lucas A, Menegon de Oliveira L, da Rocha M, Prentice C. Edible insects: An alternative of nutritional, functional and bioactive compounds. Food Chemistry. 2020 maio 1;311:126022.
 23. Yang Q, Liu S, Sun J, Yu L, Zhang C, Bi J, et al. Nutritional Composition and Protein Quality of the Edible Beetle *Holotrichia parallela*. Journal of Insect Science [Internet]. 2014 [citado 2022 maio 14];14(139). Disponível em: </pmc/articles/PMC4684676/>
 24. Rumpold BA, Schlüter OK. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. Mol Nutr Food Res [Internet]. 2013 maio [citado 2022 ago 1];57(5):802–23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23471778/>
 25. Charlton AJ, Dickinson M, Wakefield ME, Fitches E, Kenis M, Han R, et al. Exploring the chemical safety of fly larvae as a source of protein for animal feed. <http://dx.doi.org/103920/JIFF20140020> [Internet]. 2015 fev 11 [citado 2022 ago 9];1(1):7–16. Disponível em: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/JIFF2014.0020>
 26. Imathiu S. Benefits and food safety concerns associated with consumption of edible insects. NFS Journal. 2020 mar 1;18:1–11.
 27. Poma G, Cuykx M, Amato E, Calaprice C, Focant JF, Covaci A. Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. Food and Chemical Toxicology. 2017 fev 1;100:70–9.
 28. Köhler R, Kariuki L, Lambert C, Biesalski HK. Protein, amino acid and mineral composition of some edible insects from Thailand. Journal of Asia-Pacific Entomology. 2019 mar 1;22(1):372–8.
 29. Truzzi C, Illuminati S, Girolametti F, Antonucci M, Scarponi G, Ruschioni S, et al. Influence of Feeding Substrates on the Presence of Toxic Metals (Cd, Pb, Ni, As, Hg) in Larvae of *Tenebrio molitor*: Risk Assessment for Human Consumption. International Journal of Environmental Research and Public Health 2019, Vol 16, Page 4815 [Internet]. 2019 nov 30 [citado 2022 ago 10];16(23):4815. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/16/23/4815/htm>
 30. Ferreira SLC, Bezerra MA, Santos AS, dos Santos WNL, Novaes CG, de Oliveira OMC, et al. Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2018 mar 1;100:1–6.
 31. Yeung V, Miller DD, Rutzke MA. Atomic Absorption Spectroscopy, Atomic Emission Spectroscopy, and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. 2017 [citado 2022 ago 10];129–50. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-45776-5_9
 32. Beauchemin D. Chapter 1 Current status of ICP-MS. Comprehensive Analytical Chemistry. 2000 jan 1;34:1–212.

33. Khan SR, Sharma B, Chawla PA, Bhatia R. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. *Food Analytical Methods* [Internet]. 2022 mar 1 [citado 2022 ago 10];15(3):666–88. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12161-021-02148-4>
34. Allain P, Jaunault L, Mauras Y, Mermet JM, Delaporte T. Signal Enhancement of Elements Due to the Presence of Carbon-Containing Compounds in Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [Internet]. 1991 jul 1 [citado 2022 ago 10];63(14):1497–8. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac00014a028>
35. Todolí JL, Mermet JM. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 1999 jun 14;54(6):895–929.
36. Grindlay G, Mora J, de Loos-Vollebregt M, Vanhaecke F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. 2013 ago 1;86:42–9.
37. Henn AS. Determinação de elementos traço em carvão por amostragem de sólidos e valorização eletrotérmica acoplada a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado [Dissertação de mestrado]. [Santa Maria]: Universidade Federal de Santa Maria; 2017.
38. Al-Hakkani MF. Guideline of inductively coupled plasma mass spectrometry “ICP–MS”: fundamentals, practices, determination of the limits, quality control, and method validation parameters. *SN Applied Sciences* [Internet]. 2019 jul 1 [citado 2022 ago 10];1(7):1–15. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42452-019-0825-5>
39. Smith FE, Arsenault EA. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta*. 1996;43(8):1207–68.
40. López-Lorente ÁI, Pena-Pereira F, Pedersen-Bjergaard S, Zuin VG, Ozkan SA, Psillakis E. The ten principles of green sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2022 mar 1;148:116530.
41. Flores EMM M. Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination. *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. 2014;1–400.
42. Muller CC, Muller ALH, Pirola C, Duarte FA, Flores EMM, Muller EI. Feasibility of nut digestion using single reaction chamber for further trace element determination by ICP-OES. *Microchemical Journal*. 2014 set 1;116:255–60.
43. Muller EI, Souza JP, Muller CC, Muller ALH, Mello PA, Bizzi CA. Microwave-assisted wet digestion with H₂O₂ at high temperature and pressure using single reaction chamber for elemental determination in milk powder by ICP-OES and ICP-MS. *Talanta*. 2016 ago 15;156–157:232–8.

44. Muller EI, Souza JP, Anschau KF, Enders MSP, Muller ALH, Mortari SR, et al. Determination of Br, Cl and I in honey using ICP-based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H₂O₂ in a single reaction chamber. *Analytical Methods* [Internet]. 2017 jan 26 [citado 2022 ago 10];9(4):649–54. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/ay/c6ay02865a>
45. Mesko MF, Costa VC, Picoloto RS, Bizzi CA, Mello PA. Halogen determination in food and biological materials using plasma-based techniques: challenges and trends of sample preparation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [Internet]. 2016 jun 1 [citado 2022 ago 10];31(6):1243–61. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ja/c5ja00488h>
46. Anschau KF, Enders MSP, Senger CM, Duarte FA, Dressler VL, Muller EI. A novel strategy for medical foods digestion and subsequent elemental determination using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Microchemical Journal*. 2019 jun 1;147:1055–60.
47. Puttemans F, van den Winkel P, Massart DL. The determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry after liquid-liquid extraction. *Analytica Chimica Acta*. 1983;149(C):123–8.
48. Carter RJ, Rajendram VS. The use of an oxygen bomb as an alternative method for digestion of fish tissue for total mercury analysis. *Science of the Total Environment*, The. 1992 set 7;125(C):33–8.
49. Flores EMM, Barin JS, Paniz JNG, Medeiros JA, Knapp G. Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination. *Analytical Chemistry* [Internet]. 2004 jul 1 [citado 2022 ago 10];76(13):3525–9. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac0497712>
50. Maciel J v., Knorr CL, Flores EMM, Müller EI, Mesko MF, Primel EG, et al. Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. *Food Chem* [Internet]. 2014 [citado 2022 maio 6];145:927–31. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24128565/>
51. Anton Paar. Microwave Reaction System for Sample Preparation-Multiwave Pro [Internet]. [citado 2022 ago 10]. Disponível em: <https://www.anton-paar.com/?eID=documentsDownload&document=24458&L=1>
52. Druzian GT, Nascimento MS, Cerqueira UFM, Novaes CG, Bezerra MA, Duarte FA, et al. Determination of Cl, Br and I in granola: Development of an accurate analytical method using ICP-MS. *Food Chemistry*. 2021 maio 15;344:128677.
53. Official Methods of Analysis™, 21st Edition (2019) - AOAC INTERNATIONAL [Internet]. [citado 2022 ago 10]. Disponível em: <https://www.aoac.org/official-methods-of-analysis-21st-edition-2019/>
54. BLIGH EG, DYER WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* [Internet]. 1959 [citado 2022 ago 10];37(8):911–7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13671378/>

55. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC Recommendations 1995). *Analytica Chimica Acta*. 1999 maio 31;391(2):105–26.
56. Köhler R, Kariuki L, Lambert C, Biesalski HK. Protein, amino acid and mineral composition of some edible insects from Thailand. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2019 mar 1;22(1):372–8.
57. Hlongwane ZT, Slotow R, Munyai TC. Nutritional Composition of Edible Insects Consumed in Africa: A Systematic Review. *Nutrients* 2020, Vol 12, Page 2786 [Internet]. 2020 set 11 [citado 2022 ago 10];12(9):2786. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/12/9/2786/htm>
58. Mesko MF, Moraes DP, Barin JS, Dressler VL, Knapp G, Flores EMM. Digestion of biological materials using the microwave-assisted sample combustion technique. *Microchemical Journal*. 2006 abr 1;82(2):183–8.
59. Flores EMM, Mesko MF, Moraes DP, Pereira JSF, Mello PA, Barin JS, et al. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique. *Analytical Chemistry* [Internet]. 2008 mar 15 [citado 2022 ago 10];80(6):1865–70. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ac8000836>
60. Corazza G. Decomposição de carvão com elevado teor de cinzas para determinação simultânea de As, Cd, Hg, Pb e S por ICP-OES [Dissertação de Mestrado]. [Santa Maria]: Universidade Federal de Santa Maria; 2015.
61. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC Nº 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013. Diário Oficial da União Brasil: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html; 2013 p. 33–5.