

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

João Lucas Kipper Rocha

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS
PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM
INSETOS COMESTÍVEIS POR USN-ICP-MS**

Santa Maria, RS
2023

João Lucas Kipper Rocha

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS
COMESTÍVEIS POR USN-ICP-MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Santa Maria, RS
2023

Rocha, João Lucas Kipper
Avaliação de métodos de preparo de amostras para a
determinação de elementos terras-raras em insetos
comestíveis por USN-ICP-MS / João Lucas Kipper Rocha.-
2023.

113 p.; 30 cm

Orientador: Érico Marlon de Moraes Flores
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2023

1. Determinação de elementos terras raras 2. Preparo
de amostras 3. Análise de insetos comestíveis 4. USN-ICP
MS I. , Érico Marlon de Moraes Flores II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo
autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JOÃO LUCAS KIPPER ROCHA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

João Lucas Kipper Rocha

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A
DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS
COMESTÍVEIS POR USN-ICP-MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Santa Maria, RS
2023

Declaração

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim, e as informações retiradas da literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação (ou partes dela) não foi apresentada anteriormente para obtenção de qualquer outro grau.

João Lucas Kipper Rocha

AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores** pela orientação neste trabalho, pelo incentivo, amizade e pelo exemplo de dedicação profissional.

À Dr^a. **Alessandra S. Henn** por todas as valiosas sugestões e suporte prestado durante a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. **Edson Irineu Müller** por participar da banca de qualificação e pelas contribuições nesse trabalho. À prof^a. Dr^a. **Jussiane S. Silva** por todo suporte prestado durante a realização deste trabalho e pela participação na banca examinadora dessa dissertação. Ao professor Dr. **Fábio Andrei Duarte** pela participação na banca examinadora dessa dissertação e pelas valiosas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos colegas e professores do **LAQIA/CEPETRO** pelo convívio e colaboração. Em especial ao colega **Gustavo Gohlke** pela participação direta no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas **Thiago C. Pereira**, **Vinicius Picoloto** e **Ana Paula F. Padilha** por toda ajuda prestada durante a realização deste trabalho.

Aos meus familiares por todo apoio e incentivo durante o mestrado.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS COMESTÍVEIS POR USN-ICP-MS

AUTOR: João Lucas Kipper Rocha

ORIENTADOR: Prof. Dr. Érico M. M. Flores

Neste trabalho foram avaliados três métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de elementos terras-raras (REE) em insetos comestíveis empregando a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Para contornar possíveis interferências na etapa de determinação dos REE, um nebulizador ultrassônico foi acoplado ao equipamento de ICP-MS. Os métodos avaliados, todos empregando soluções de ácidos diluídos com exceção da combustão iniciada por micro-ondas (MIC), foram: *i*) decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD), *ii*) decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MAWD-UV) e *iii*) MIC. Na MAWD, 500 mg de amostra foram decompostos com um tempo de aquecimento de 60 min e solução de decomposição com HNO_3 5 mol L⁻¹ + 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹. Na MAWD-UV, 500 mg de amostras foram decompostos com um tempo de aquecimento de 60 min empregando uma solução de decomposição com HNO_3 3 mol L⁻¹ + 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹. Na MIC, até 500 mg de amostra foram decompostos em 35 min, usando água régia como solução absorvedora. Foram utilizadas três amostras de insetos comestíveis, provenientes da China, Brasil e Tailândia. Para a obtenção de valores de referência, as amostras de grilos foram decompostas empregando os seguintes métodos: *i*) MAWD com HNO_3 14,4 mol L⁻¹ e *ii*) decomposição por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS). Porém, devido aos altos limites de quantificação (LOQs) obtidos para a CWD-OS, a MAWD com HNO_3 14,4 mol L⁻¹ foi escolhida como método de referência, possibilitando a comparação de um maior número de analitos para todas as amostras. Foi utilizado um material de referência certificado de tecido de mexilhão (CRM BCR-668) para avaliação da exatidão dos métodos propostos. Os resultados obtidos para o CRM, utilizando os três métodos propostos, não apresentaram diferença significativa com o valor certificado ($p > 0,05$). Os resultados obtidos após a determinação dos REE não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os três métodos propostos e o método de referência. Durante a avaliação dos métodos foi observado que somente com a presença de HCl na solução de decomposição/absorvedora foi possível a retenção quantitativa dos REE nos digeridos, possivelmente pela presença de espécies pouco solúveis destes elementos, o que dificulta a solubilização completa quando somente HNO_3 diluído é utilizado. A MAWD e a MAWD-UV permitiram o uso de soluções diluídas e menores LOQs, enquanto com MIC foi possível a decomposição com menor tempo de preparo e menores teores de carbono em solução (< 18 mg L⁻¹). Os limites de quantificação (LOQs) obtidos para os métodos avaliados foram relativamente baixos: entre 0,12 ng g⁻¹ (Eu) e 22 ng g⁻¹ (La) para a MAWD, entre 0,15 ng g⁻¹ (Eu) e 37 ng g⁻¹ (Ce) para MAWD-UV e entre 1,6 ng g⁻¹ (Eu) e 69 ng g⁻¹ (Ce) para a MIC. Por fim, os três métodos mostraram-se adequados para a decomposição de até 500 mg de amostras de grilos, possibilitando a determinação de REE por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com nebulizador ultrassônico (USN-ICP-MS).

Palavras-chave: Determinação de elementos terras-raras. Preparo de amostras. Análise de insetos comestíveis. USN-ICP-MS.

ABSTRACT

EVALUATION OF SAMPLE PREPARATION METHODS FOR THE DETERMINATION OF RARE EARTH ELEMENTS IN EDIBLE INSECTS BY USN-ICP-MS

AUTHOR: João Lucas Kipper Rocha
ADVISOR: Prof. Dr. Érico M. M. Flores

In this work, three sample preparation methods were evaluated for the subsequent determination of rare earth elements (REE) in insects using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). To avoid possible interferences in the REE determination step, an ultrasonic nebulizer (USN) was coupled to the ICP-MS equipment. The methods evaluated were: *i*) microwave-assisted wet digestion (MAWD) with diluted acids, *ii*) microwave-assisted ultraviolet digestion (MAWD-UV) and *iii*) microwave-induced combustion (MIC). In MAWD, up to 500 mg of sample were decomposed with a heating time of 60 min and using 5 mol L⁻¹ of HNO₃ + 1 mL of 12 mol L⁻¹ of HCl. For MAWD-UV, up to 500 mg of sample mass were decomposed with a heating time of 60 min using a solution of 3 mol L⁻¹ of HNO₃ + 1 mL of 12 mol L⁻¹ of HCl. For MIC method, up to 500 mg of sample were digested with a heating program of 35 min and using aqua regia as absorbing solution. Three samples of edible crickets from China, Brazil and Thailand were used. To obtain reference values, the cricket samples were digested using the following methods: *i*) MAWD with 14.4 mol L⁻¹ HNO₃ and *ii*) conventional wet digestion in open system (CWD-OS). However, due to the relatively high limits of quantification (LOQs) obtained for CWD-OS, MAWD with 14.4 mol L⁻¹ HNO₃ was chosen as the reference method, allowing the comparison of a higher number of analytes for all samples. To evaluate the accuracy of the proposed methods, a certified reference material of mussel tissue (CRM BCR-668) was used. The results obtained for CRM, using the three proposed methods, showed no significant difference with the certified value ($p > 0.05$). The results obtained after the determination of the REE did not show significant difference ($p > 0.05$) between the three proposed methods and the reference method. During the evaluation of the methods, it was observed that only using HCl in the decomposition/absorbing solution it was possible to quantitatively retain the REE in solution, possibly due to the presence of insoluble species of these elements, which makes complete solubilization difficult when diluted HNO₃ is used. MAWD and MAWD-UV allowed the use of diluted solutions and lower LOQs, while with MIC it was possible to decompose with shorter preparation time and lower carbon contents in solution (< 18.3 mg L⁻¹). The limits of quantification (LOQs) obtained for the evaluated methods were relatively low: between 0.12 ng g⁻¹ (Eu) and 21.8 ng g⁻¹ (La) for MAWD, between 0.15 ng g⁻¹ (Eu) and 37.3 ng g⁻¹ (Ce) for MAWD-UV and between 1.58 ng g⁻¹ (Eu) and 69.4 ng g⁻¹ (Ce) for MIC. Finally, all three methods were suitable for the decomposition of up to 500 mg of cricket samples, enabling the determination of REE by USN-ICP-MS.

Keywords: Rare earth elements determination. Sample preparation. Analysis of edible insects. USN-ICP-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Forno de micro-ondas Multiwave Pro [®] (A) e frascos acoplados ao rotor (B).	42
Figura 2 - Lâmpada de descarga sem eletrodo (A) e lâmpada inserida dentro do frasco de quartzo (B).....	42
Figura 4 - Amostra A após decomposição por MAWD.....	49
Figura 5 - Procedimento de CWD-OS para a decomposição de insetos: A) Aspecto da amostra após adição de 6 mL de HNO ₃ e 1 mL de H ₂ O ₂ ; B) Etapa de decomposição das amostras e C) Solução final após CWD-CS.....	50
Figura 6 - Procedimento realizado na MIC para a decomposição de insetos. A) Adição de NH ₄ NO ₃ ; B) Inserção do <i>pellet</i> no suporte de quartzo; C) Inserção do suporte no frasco de quartzo; D) pressurização dos frascos com 40 bar de O ₂ e E) Aspecto da solução resultante após a MIC	53
Figura 7 - Resumo dos métodos de preparo de amostras e parâmetros experimentais.....	55
Figura 8 - Aspecto dos digeridos obtidos após MAWD em frascos de quartzo usando: A) 3 mol L ⁻¹ , B) 5 mol L ⁻¹ , C) 7 mol L ⁻¹ e D) 14,4 mol L ⁻¹	63
Figura 9 - Concentração de C (barras) e acidez residual (linha) nos digeridos obtidos após MAWD. Condições: 500 mg de amostra e 6 mL de HNO ₃ em diferentes concentrações	63
Figura 10 - Concordância entre o método proposto e o método de referência (MAWD com HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹) para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução de decomposição.....	65
Figura 11 - Concordância entre o método proposto e o método de referência (MAWD com HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹) usando 5 mol L ⁻¹ de HNO ₃ com e sem o emprego de 1 mL de HCl 12 mol L ⁻¹ para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução de decomposição	68
Figura 12 - Aspecto dos digeridos obtidos após MAWD-UV usando HNO ₃ : A) 2 mol L ⁻¹ e B) 3 mol L ⁻¹	73
Figura 13 – Aspecto dos digeridos com 3 mol L ⁻¹ do método: A) MAWD e B) MAWD-UV	74

Figura 14 – Aspecto dos digeridos após MAWD-UV com a utilização de combinações de H ₂ O ₂ e HNO ₃ como soluções de decomposição nas seguintes condições: A) HNO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ + 2 mL de H ₂ O ₂ , B) HNO ₃ 1 mol L ⁻¹ + 2 mL de H ₂ O ₂ , C) HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ + 2 mL de H ₂ O ₂ e D) HNO ₃ 2 mol L ⁻¹ + 1 mL de H ₂ O ₂	75
Figura 15 - Espectro de energia dispersiva do resíduo remanescente da decomposição incompleta da amostra “A”.	76
Figura 16 - Concentração de C (barras) e acidez final (linha) nos digeridos obtidos após MAWD-UV. Condições: 500 mg de amostra e 15 mL de HNO ₃ em diferentes concentrações, com e sem 2 mL de H ₂ O ₂	77
Figura 17 - Concordância entre o método proposto (MAWD-UV) e o método de referência (MAWD com HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹) usando diferentes soluções de decomposição (1 mol L ⁻¹ de HNO ₃ + 2 mL de H ₂ O ₂ , 2 mol L ⁻¹ de HNO ₃ + 2 mL de H ₂ O ₂ e 3 mol L ⁻¹ de HNO ₃) para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 15 mL de solução de decomposição.	78
Figura 18 - Concordância entre o método proposto (MAWD-UV) e o método de referência (MAWD com HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹) usando 3 mol L ⁻¹ de HNO ₃ com e sem o emprego de 1 mL de HCl 12 mol L ⁻¹ para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 15 mL de solução de decomposição	80
Figura 19 – Suporte de quartzo após queima incompleta na MIC utilizando 600 mg de amostra.....	85
Figura 20 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹) usando diferentes concentrações de HNO ₃ como solução absorvedora para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora.....	86
Figura 21 – Resultados da análise do resíduo da MIC por MEV-EDS	87
Figura 22 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹) usando diferentes proporções de HCl + HNO ₃ como solução absorvedora para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd,	

- Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora..... 88
- Figura 23 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) usando diferentes concentrações de HCl + HNO_3 3+1 como solução absorvedora para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora..... 90
- Figura 24 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) usando diferentes diferentes massas de NH_4Cl para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora (HCl + HNO_3 3 + 1, 50%)..... 92
- Figura 25 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) usando diferentes diferentes massas de NH_4Cl + 100 mg de celulose microcristalina para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora (HCl + HNO_3 3 + 1, 50%)..... 94
- Figura 26 - Aerossol obtido a partir da nebulização do digerido obtido por (A) método de referência (MAWD) e (B) método proposto (MAWD-UV). 102
- Figura 27 - Comparação entre os métodos avaliados no presente estudo (MAWD-UV, MAWD com ácidos diluídos e MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1} para posterior determinação de REE por USN-ICP-MS de acordo com 12 princípios de WAC, realizada usando o algoritmo RGB 12. 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Técnicas analíticas para a determinação de REE em insetos.....	25
Tabela 2 - Parâmetros operacionais do USN-ICP-MS.....	43
Tabela 3 - Parâmetros operacionais do ICP-OES.....	44
Tabela 4 - Informações das amostras de insetos.....	46
Tabela 5 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de insetos por MAWD (método de referência)	48
Tabela 6 – Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de insetos por MAWD (método proposto).....	51
Tabela 7 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de insetos por MAWD- UV.....	51
Tabela 8 - Composição centesimal das amostras de insetos (média \pm SD). Resultados expressos em % (g/100g)	57
Tabela 9 - Composição de macronutrientes nas amostras de insetos (média \pm SD, n=3)	58
Tabela 10 - Valores de referência para REE obtidos por USN-ICP-MS após a decomposição das amostras por MAWD e CWD-OS (média \pm SD, n=3)	60
Tabela 11 - Concentração dos REE no CRM BCR-668 obtidos por USN-ICP-MS após MAWD (método proposto) e valores certificados, em ng g ⁻¹ (média \pm SD, n=3)	70
Tabela 12 - Determinação de REE em insetos após MAWD (método proposto). Resultados em ng g ⁻¹ (média \pm SD, n=3).....	71
Tabela 13 - Concentração dos REE no CRM BCR-668 obtidos por USN-ICP-MS após MAWD-UV (método proposto) e valores certificados, em ng g ⁻¹ (média \pm SD, n=3).....	82
Tabela 14 - Determinação de REE em insetos após MAWD-UV (método proposto). Resultados expressos em ng g ⁻¹ (média \pm SD, n=3).....	83
Tabela 15 - Concentração dos REE no CRM BCR-668 obtidos por USN-ICP-MS após MIC (método proposto) e valores certificados, em ng g ⁻¹ (média \pm SD, n=3).....	95
Tabela 16 - Determinação de REE em insetos após MIC (método proposto). Resultados em ng g ⁻¹ (média \pm SD, n=3).....	97
Tabela 17 - Limites de quantificação obtidos pelo método de referência e pelos métodos propostos. Valores expressos em ng g ⁻¹	98

Tabela 18 - Comparação entre o método de referência e os métodos investigados para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS	100
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CRM, material de referência certificado, do inglês, *certified reference material*
- CWD-OS, Decomposição por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto, do inglês, *conventional wet digestion in open system*
- DESA, *Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat*
- EDS, espectroscopia por energia dispersiva, do inglês, *energy dispersive spectroscopy*
- EU-OSHA, Agência Europeia para a Segurança e Saúde no Trabalho, do inglês, *European Agency for Safety and Health at Work*
- HREE, elementos terras-raras pesados, do inglês, *heavy rare earth elements*
- ICP-MS, espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma mass spectrometry*
- ICP-OES, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*
- LOD, limite de detecção, do inglês, *limit of detection*
- LOQ, limite de quantificação, do inglês, *limit of quantification*
- LREE, elementos terras-raras leves, do inglês, *light rare earth elements*
- m/z, razão massa/carga
- MAWD, decomposição por via úmida assistida por micro-ondas, do inglês, *microwave-assisted wet digestion*
- MAWD-UV, decomposição por via úmida assistida por micro-ondas e ultravioleta, do inglês, *microwave-assisted wet and UV digestion*
- MEV, microscopia eletrônica de varredura
- MIC, combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, *microwave-induced combustion*
- NAA, análise por ativação neutrônica, do inglês, *neutron activation analysis*
- OCDE, Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
- PTFE, politetrafluoretileno
- RCC, teor de carbono residual, do inglês, *residual carbon content*
- REE, elementos terras-raras, do inglês, *rare earth elements*
- RSD, desvio padrão relativo, do inglês, *relative standard deviation*
- SD, desvio padrão, do inglês, *standard deviation*
- USN, nebulização ultrassônica, do inglês, *ultrasonic nebulization*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	INSETOS COMO FONTE DE ALIMENTAÇÃO HUMANA	20
2.2	INSETOS COMO BIOMONITORES DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS	21
2.3	ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS	23
2.4	DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS	24
2.5	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE	30
2.5.1	Decomposição por via úmida	30
2.5.1.1	Decomposição por via úmida em sistemas abertos	31
2.5.1.2	Decomposição por via úmida em sistemas fechados	32
2.5.2	Métodos de combustão	33
2.5.2.1	Combustão por via seca	34
2.5.2.2	Bomba de combustão	34
2.5.2.3	Frasco de combustão de Schöniger	35
2.5.2.4	Combustão iniciada por micro-ondas	35
2.6	TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE REE	37
2.6.1	Análise por ativação neutrônica	37
2.6.2	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	INSTRUMENTAÇÃO	41
3.2	REAGENTES E SOLUÇÕES	45
3.3	AMOSTRAS	46
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	47
3.5	DESCONTAMINAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS	47
3.6	OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PARA REE EM INSETOS APÓS MAWD E CWD-OS	48
3.7	MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE INSETOS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE POR USN-ICP-MS	50
3.7.1	Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas	50

3.7.2	Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas e ultravioleta	51
3.7.3	Combustão iniciada por micro-ondas	52
3.8	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO E DA ACIDEZ RESIDUAL	53
3.9	RESUMO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	57
4.2	DETERMINAÇÃO DE REE EM INSETOS APÓS MAWD E CWD-OS (OBTENÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA)	60
4.3	AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DE REE EM INSETOS POR USN-ICP-MS	61
4.3.1	Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas	61
4.3.1.1	Avaliação da concentração de HNO ₃	62
4.3.1.2	Avaliação do uso de HCl	66
4.3.1.3	Avaliação da exatidão da MAWD com solução ácida diluída	69
4.3.1.4	Aplicação da MAWD com ácidos diluídos na decomposição de amostras de insetos	71
4.3.2	Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta	72
4.3.2.1	Avaliação da concentração de HNO ₃	72
4.3.2.2	Avaliação da exatidão do método de MAWD-UV	81
4.3.2.3	Aplicação da MAWD-UV na decomposição de amostras de insetos	83
4.3.3	Combustão iniciada por micro-ondas	84
4.3.3.1	Avaliação da massa de amostra	84
4.3.3.2	Avaliação da concentração de HNO ₃ na solução absorvedora	85
4.3.3.3	Avaliação da utilização de HCl na solução absorvedora	88
4.3.3.4	Avaliação da concentração da solução de HCl + HNO ₃ 3+1	89
4.3.3.5	Avaliação do uso de NH ₄ Cl	91
4.3.3.6	Avaliação da exatidão da MIC	95
4.3.3.7	Aplicação da MIC na decomposição de amostras de insetos	96
4.4	LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO	97
4.5	COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS	99
5	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	105

1. INTRODUÇÃO

O crescimento da população mundial representa um grande desafio relacionado à produção de alimentos, com o aumento progressivo da demanda por alimentos de origem animal e vegetal, resultando em maiores emissões de gases causadores do efeito estufa, além da demanda crescente de recursos hídricos e terrestres ^{1,2}. Com isso, os insetos comestíveis surgem como uma alternativa nutricional promissora para a dieta de humanos e animais. Em geral, além de ser uma fonte de alimento que se equipara às fontes convencionais de proteína, os insetos também são ricos em aminoácidos essenciais, lipídios, minerais e vitaminas. O consumo de insetos também pode reduzir o impacto ambiental no planeta, uma vez que necessitam de menos recursos hídricos e terrestres, menor espaço, e sua produção tem a capacidade de gerar menores emissões de gases de efeito estufa ³⁻⁶.

Assim, torna-se necessário assegurar que os insetos possam ser consumidos com segurança, sendo de extrema importância o controle de qualidade, incluindo a determinação de contaminantes emergentes, como elementos terras-raras (REE): Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, Y e Yb ⁷. Nos últimos anos, a crescente utilização dos REE em diversas áreas tem aumentado sua liberação no meio ambiente por meio da mineração e de resíduos industriais e eletrônicos, contribuindo, assim, para um aumento destes elementos nos ecossistemas, levando à bioacumulação em seres vivos ^{8,9}. Nesse sentido, os insetos, em geral, também podem ser utilizados como biomonitores de REE nos mais diversos ecossistemas ^{10,11}.

Diante dessas necessidades, torna-se importante o desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis para a determinação de REE em insetos, que pode ser um grande desafio devido às baixas concentrações em que estes elementos se encontram neste tipo de amostra. A determinação dos REE exige técnicas multielementares e de elevada sensibilidade, sendo mais comumente empregadas as técnicas de análise por ativação neutrônica (NAA) ^{12,13}, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) ¹⁴ e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ^{15,16}. A NAA, apesar de ser uma boa alternativa, apresenta limitações como custo relativamente elevado, limites de quantificação (LOQs) maiores quando comparados com os obtidos por ICP-MS, longo tempo de análise e necessidade de um reator nuclear ¹⁷. Dentre as técnicas baseadas em plasma, a ICP-MS, por permitir a obtenção de menores LOQs, é comumente mais empregada que a ICP-OES para a determinação de REE ¹⁸. Todavia, os REE são susceptíveis às interferências de íons poliatômicos durante a determinação por ICP-MS, que podem ser minimizadas pela utilização de um nebulizador com sistema de solvatação (ex., Aridus, Apex e ultrassônicos). Outros

problemas relacionados ao uso da técnica de ICP-MS para a determinação de REE são os efeitos da concentração do ácido utilizado na etapa prévia de preparo de amostras e do carbono presente em solução quando a decomposição da amostra é incompleta ¹⁹⁻²². Assim, devem ser desenvolvidos métodos de preparo de amostras com elevada eficiência de decomposição, que permitam a utilização de ácidos diluídos e, também, atendam as principais premissas buscadas no desenvolvimento de métodos analíticos, como elevada frequência analítica e decomposição de massas elevadas de amostrada ²³. Além disso, as amostras de insetos podem ser consideradas de difícil decomposição, pois apresentam uma matriz com altos teores de fibras na forma de quitina (entre 2 e 16%, dependendo da espécie). A quitina é um composto resistente e insolúvel na maioria dos solventes e possui uma estrutura compacta e cristalina, com fortes ligações de hidrogênio, exigindo métodos que apresentem alta eficiência de decomposição para uma completa digestão desse tipo de amostra ^{24,25}.

Existem poucos métodos descritos na literatura para a decomposição de insetos e a posterior determinação de REE. Entre estes métodos, podem ser citados a decomposição por via úmida assistida por micro-ondas (MAWD) ^{10,26,27} e a decomposição por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto (CWD-OS) ²⁸⁻³⁰. Apesar de serem muito utilizados para a decomposição de diversas matrizes, estes métodos geralmente requerem o uso de ácidos concentrados o que, por sua vez, podem resultar em interferências na etapa de determinação por ICP-MS. Além disso, a utilização de ácidos concentrados é contra os princípios preconizados pela química verde, que busca a utilização de reagentes diluídos. Outro problema associado a estes métodos são os relativamente elevados teores de carbono residual em solução que, também, podem resultar em interferências ^{20,22}. Com o objetivo de contornar estas desvantagens, uma alternativa originalmente proposta por Florian e Knapp foi o uso de radiação ultravioleta combinada com o método de MAWD ³¹. No entanto, até o momento, este método ainda não foi avaliado para o preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE.

Outra possibilidade de preparo de amostra para a determinação de REE por ICP-MS é a utilização de métodos de combustão, como a decomposição por via seca em forno tipo mufla e métodos de combustão em sistemas fechados (bomba de combustão e frasco de Schöniger). Estes métodos apresentam alta eficiência de decomposição e são considerados relativamente simples. No entanto, desvantagens como o risco de perdas por volatilização e formação de espécies refratárias (decomposição por via seca), baixa frequência analítica e impossibilidade de etapa de refluxo (bomba de combustão e frasco de Schöniger), entre outras, tornam estes métodos limitados ^{23,32}. Com o objetivo de unir as vantagens da MAWD com os métodos de

combustão em sistemas fechados, uma alternativa proposta foi o método de combustão iniciada por micro-ondas (MIC) ³³. Este método apresenta as vantagens de frequência analítica elevada e alta eficiência de decomposição de matrizes orgânicas, além de permitir uma etapa de refluxo após a combustão da amostra ^{33,34}. Até este momento, a MIC não foi utilizada para o preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE.

Considerando a importância da determinação de REE em insetos e as informações relativamente escassas na literatura relacionadas ao preparo de amostras de insetos para a determinação de REE por ICP-MS, este trabalho tem como objetivo avaliar três métodos de preparo de amostras (MAWD, decomposição por via úmida assistida por micro-ondas e UV (MAWD-UV) e MIC) para a posterior determinação de REE (com exceção Sc e Pm) em grilos provenientes de três países (China, Brasil e Tailândia) por USN-ICP-MS. O desenvolvimento desses métodos foi realizado com o objetivo de seguir algumas premissas buscadas no desenvolvimento de métodos analíticos de decomposição de amostras, como elevada frequência analítica, utilização de massas relativamente elevadas de amostra e alta eficiência de decomposição com o uso reduzido de reagentes, de acordo com as recomendações da química verde. Para avaliar o quão “verde” era cada método utilizado, foi realizada uma comparação de acordo com a abordagem proposta por Nowak et al ³⁵. Adicionalmente, a abordagem “RGB” proposta por Nowak et al ³⁵, foi utilizada para avaliar o quão “branco” eram os métodos propostos com relação ao método de referência.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma breve revisão da literatura, onde serão abordados os aspectos gerais sobre a utilização de insetos como bioindicadores e na alimentação humana, bem como a importância da determinação de elementos terras-raras em insetos. Posteriormente, serão descritos os principais métodos de preparo de amostras utilizados na decomposição de amostras orgânicas para a posterior determinação de REE. Ao final, serão apresentadas as principais técnicas analíticas utilizadas para a determinação desses elementos.

2.1 INSETOS COMO FONTE DE ALIMENTAÇÃO HUMANA

Segundo o *Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat* (DESA) ³⁶, a população humana está projetada para atingir 9 bilhões em 2050, o que resultará em um significativo aumento na demanda por alimentos de qualidade. Este excessivo aumento representa um desafio para o planeta devido ao aumento progressivo de emissões de gases de efeito estufa, juntamente com o uso demorado de recursos hídricos e terrestres ⁵. A pecuária é um dos setores que mais contribui para mudanças climáticas, com significativas contribuições na emissão de gases causadores do efeito estufa. Além disso, a expansão da pecuária pode deslocar áreas florestais, causando a perda de recursos naturais e levando a mudanças ambientais ³⁷. Já a produção agrícola é a responsável pelo consumo de 70% da água do planeta, além de também ser uma importante fonte de emissão de gases de efeito estufa ^{5,38}.

Com isso, insetos comestíveis podem se tornar uma importante estratégia para alcançar a segurança alimentar mundial, podendo se tornar uma alternativa nutricional de dieta diária para humanos e animais. Além disso, a criação de insetos para a alimentação humana está emergindo como uma forma ecologicamente correta de produção de alimentos, pois exigem menos terra, água e ração, além de gerarem menor emissão de gases causadores do efeito estufa ^{3, 39,40}.

Os insetos comestíveis apresentam, em geral, um perfil nutricional que pode ser comparado ao da proteína animal, sendo constituídos, majoritariamente, de proteínas, com teores médios de 15 a 81% do peso seco ^{39,41,42}. O segundo maior componente presente nos insetos é a gordura (geralmente de 10 a 50% do peso seco), podendo variar consideravelmente de acordo com uma combinação de fatores como espécie, sexo, habitat, dieta e estágio de desenvolvimento ⁴². Na fase larval, os insetos tendem a ter maior teor de gordura, devido à maior necessidade de energia durante a etapa de desenvolvimento ^{3,43}. Os perfis de ácidos graxos dos insetos também são dependentes da espécie e dieta. Porém, geralmente possuem mais ácidos graxos insaturados em comparação com ácidos graxos saturados ⁴⁴. Já o teor médio de carboidratos em insetos varia de 6,81 a 15,98%, divididos principalmente em duas formas: quitina, principal componente do exoesqueleto, e glicogênio, fonte de energia armazenada nas células e tecidos musculares ³⁹.

Algumas espécies de insetos também são conhecidas por seus ricos perfis de minerais essenciais, incluindo Fe, Zn, Ca, K, Na, P, Mn, Mg e Cu e vitaminas, como B2, B5 e B7 ^{39,45}. Os grilos, por exemplo, são ricos em Ca, Zn, Mn e P ⁴².

A variação do perfil mineral entre insetos de uma mesma espécie também é considerável. Os fatores externos como dieta e localização geográfica são os principais responsáveis pelos diferentes perfis minerais, particularmente em insetos selvagens. Em insetos cultivados, o perfil mineral é alterado principalmente por diferenças na composição da ração. A contaminação do solo também pode ser um importante fator influenciador, principalmente para insetos terrestres como grilos, formigas e besouros ⁴⁰.

Atualmente, o consumo de insetos é prática tradicional em algumas culturas asiáticas, africanas e da América Central e América do Sul. Mais de 2000 espécies de insetos são consumidas no mundo, incluindo besouros, lagartas, vespas, abelhas, formigas, grilos, gafanhotos, cupins, libélulas, podendo ser consumidos em sua fase larval, de pupa ou adulta ⁴⁶. No entanto, normas e regulamentos que reconhecem o uso dos insetos como fontes de alimentação são raros e muito trabalho ainda precisa ser feito para a elaboração de estruturas normativas para leis alimentares que incluam insetos ³.

Considerando o grande potencial dos insetos comestíveis como fonte de alimentação em um futuro próximo, assim como a falta de legislações vigentes que incluam os insetos como fonte de alimentação, é de extrema importância o controle de qualidade desses alimentos, garantindo a segurança do consumidor. Dentre os potenciais perigos à saúde do consumidor estão os contaminantes inorgânicos, como metais pesados, halogênios e REE, que podem causar efeitos tóxicos e adversos à saúde humana ³.

2.2 INSETOS COMO BIOMONITORES DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS

Os REE são utilizados amplamente em processos industriais desde a década de 1980 ⁴⁷. Devido às suas propriedades químicas e físicas únicas, como condutividade, condutância térmica, altas densidades e pontos de fusão, nos últimos anos a exploração desses elementos é cada vez mais crescente e economicamente importante, consequência de seu uso em produtos tecnológicos como telefones celulares, computadores, carros híbridos e células fotovoltaicas, assim como sua utilização em fertilizantes e na biomedicina. A crescente utilização aumenta a liberação dos REE no meio ambiente por meio da mineração e de resíduos industriais e eletrônicos, contribuindo assim para um aumento desses elementos nos ecossistemas. ^{8,9}. Os REE são denominados de elementos raros por não se concentrarem em depósitos de minérios puros, porém, são comumente encontrados na crosta terrestre. As concentrações crescentes de REE são amplamente distribuídas no ambiente próximo às zonas industriais, levando a uma

acumulação significativa nessas regiões. Estudos relataram, por exemplo, altos níveis de cério até 6 km de uma planta de processamento de REE na China ^{11,48,49}.

O aumento da contaminação de REE no meio ambiente também pode ocorrer devido à liberação de nanopartículas formadas por óxidos de REE, que são amplamente utilizadas em diversos setores industriais. Nos últimos anos, a crescente liberação de REE no meio ambiente têm levantado preocupações, gerando um aumento de pesquisas e trabalhos relacionados à bioacumulação e à (eco)toxicidade desses contaminantes ^{7,11,50-56}. Os REE apresentam alta adsorção ao solo, promovendo baixa mobilidade e enriquecimento, favorecendo a bioacumulação na cadeia alimentar e efeitos tóxicos para organismos terrestres. Altas concentrações de REE podem levar a mudanças na fertilidade do solo. O aumento da concentração de La no solo, por exemplo, pode ocasionar a lixiviação dos cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} , aumento do pH e diminuição do fósforo e nitrogênio disponíveis ^{49,57}. O acúmulo de REE também tem um efeito tóxico sobre a macrofauna do solo, podendo, quando em grande quantidade, reduzir sua diversidade ⁴⁹. Já o contato dos seres humanos com REE, seja por ingestão, contato dérmico ou inalação, pode apresentar um potencial risco à saúde. Embora ainda não sejam bem conhecidos os efeitos dos desses elementos aos seres humanos, estudos apontam que altos níveis de exposição podem levar ao declínio da função hepática, induzir efeitos neurológicos, causar doenças pulmonares, leucemia e câncer ⁵⁷.

Estudos recentes alertaram sobre a presença de concentrações elevadas de REE em ecossistemas aquáticos ^{11,27,58,59} e terrestres ^{10,49}. Atividades antropogênicas já estão impactando os ciclos geoquímicos e gerando uma emergente necessidade do biomonitoramento desses elementos, que antes eram relativamente mais estáveis na crosta terrestre ⁸.

O acúmulo de REE nos organismos pode ser correlacionado com a concentração desses elementos no meio ambiente, contribuindo para uma avaliação mais completa do estado ambiental em diferentes ecossistemas ¹¹. Os insetos estão presentes nos mais diversos ecossistemas, em contato próximo com o solo, água ou sedimentos, podendo servir como indicadores para muitos contaminantes. Os insetos podem ingerir alimentos contaminados em diferentes níveis e são presas ideais para anfíbios, pequenos mamíferos, répteis e aves. Também, são extremamente sensíveis às variações elementares e contaminações no ambiente em que habitam, características ideais para serem utilizados como biomarcadores e traçadores ambientais ^{10,27}. Fatores como a sensibilidade da espécie, período de exposição e características ambientais podem influenciar na bioacumulação de REE em insetos ¹⁰.

Considerando a crescente e diversificada utilização e os possíveis riscos ao meio ambiente, estudos sugerem que os REE podem ser considerados contaminantes de preocupação

emergente ⁷. Tendo em vista também os riscos à saúde pública, a Agência Européia para a Segurança e Saúde no Trabalho (*European Agency for Safety and Health at Work - EU-OSHA*) incluiu os REE como “Riscos Novos e Emergentes para a Segurança e Saúde Ocupacional” ⁶⁰. Portanto, a determinação de traços de REE em amostras biológicas e ambientais é de grande importância para avaliação de seus possíveis efeitos na ecologia, meio ambiente e saúde humana, requerendo metodologias analíticas confiáveis para a determinação desses elementos. Considerando o grande potencial dos insetos como bioindicadores, além da crescente utilização de insetos comestíveis na alimentação humana, a determinação de REE nesse tipo de amostra é de extrema importância para uma maior compreensão e controle dos emergentes riscos à saúde e ao ecossistema.

2.3 ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS

Os REE estão presentes no organismo dos insetos como contaminantes, tendo origem da exposição ambiental e, principalmente, da alimentação de plantas contaminadas, uma vez que os REE são amplamente utilizados como aditivos de fertilizantes e podem ser bioacumulados nas plantas através do contato com o solo e a água contaminados ⁶¹. Estudos indicam que os REE podem ser absorvidos pelas plantas devido aos raios iônicos semelhantes que compartilham com o cálcio, substituindo o Ca^{2+} em diversas atividades fisiológicas envolvendo enzimas e proteínas, como crescimento das raízes, fotossíntese e floração. O raio iônico do Ca^{2+} é de 0,09 nm, enquanto o raio iônico dos REE varia de 0,085 para o Lu^{3+} a 0,106 nm para o La^{3+} ⁶².

Pouco se sabe sobre as espécies de REE presentes nos organismos dos insetos. No entanto, algumas evidências explicam que os REE também podem ter comportamento análogo ao Ca^{2+} em outros sistemas biológicos, devido à semelhança dos raios iônicos ^{63,64}. Por possuírem maior valência, os REE são capazes de formarem complexos mais fortes e com um número de coordenação maior com biomoléculas, apresentando maiores afinidades que o Ca^{2+} para determinados sítios de ligação ^{65,66}. Porém, o tamanho do REE é mais importante do que sua carga na substituição do cálcio ⁶⁷. Por conta dessa relação, os REE podem substituir seletivamente o Ca^{2+} em várias proteínas que possuem dependência de Ca^{2+} , ou cuja atividade é estimulada pelo Ca^{2+} ^{66,68}. Lortholarie et al. exploraram a distribuição de REE em enguias e encontraram alto acúmulo nas brânquias, principal via de entrada de Ca^{2+} nos peixes ⁶⁷. Cui et al. demonstraram que os REE possuem toxicidade aguda para embriões de peixe-zebra e atribuíram parte da toxicidade às mudanças nas funções fisiológicas dos embriões associadas

ao deslocamento e substituição de Ca^{2+} ⁶⁵. Pesquisadores também demonstraram que cloreto de cério heptaidratado, ao ser administrado através da alimentação por plantas contaminadas, pode induzir paralisia muscular em gafanhotos, associada ao bloqueio dos canais de Ca^{2+} nos músculos pelo cério ⁴⁸.

Os REE também podem estar presentes no organismo dos insetos na forma de nanopartículas. Nanopartículas de óxido de cério (CeO_2), por exemplo, são utilizadas como fertilizante foliar e podem ser transferidas para o organismo de insetos através da ingestão de plantas contaminadas ⁶⁹. Pesquisadores estudaram a transferência dessas nanopartículas de plantas para o pulgão *Myzus persicae* e encontraram a presença de cério no abdome e sua ausência nas pernas do inseto, sugerindo que o CeO_2 foi absorvido pelo inseto através da alimentação ⁶⁹.

A análise dos REE presentes no organismo dos insetos também dependerá das espécies presentes na origem da contaminação, que pode diferir significativamente entre solo, água, sedimentos e plantas, seja por contato direto ou por ingestão.

2.4 DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS TERRAS-RARAS EM INSETOS

Como já mencionado, a determinação de REE em insetos é importante para a compreensão dos fatores de bioacumulação desses elementos em diversos ecossistemas como, também, para o monitoramento em insetos comestíveis ^{7,11,50-56}. No entanto, poucos são os trabalhos que abordam a quantificação de REE em insetos, o que pode estar atrelado principalmente às dificuldades na determinação devido às baixas concentrações desses elementos em amostras biológicas, na maioria das vezes em nível traço ou de ultratraço ⁷⁰.

Na Tabela 1 estão apresentados os trabalhos publicados na literatura sobre a determinação de REE em insetos, abordando informações como tipos de insetos utilizados, analitos, preparo da amostra (quando necessário), massa de amostra (quando informada), limite de detecção (LOD) ou limite de quantificação (LOQ) (quando informados) e técnica de determinação.

Tabela 1 - Técnicas analíticas para a determinação de REE em insetos.

Amostra	Analitos	Comentários	Técnica	Referência
Formiga de fogo (<i>Solenopsis invicta</i>)	Sm, Yb, Eu, Nd, La	REE utilizados como marcadores, misturados com fontes de proteínas, carboidratos e lipídios para rastrear a coleta de alimentos pelas colônias de formigas de fogo; 4 amostras de larvas, ovos e pupas (100 a 200 mg) e 4 amostras de formigas (100 a 200 mg) de cada colônia foram coletadas e analisadas antes e após (12 h) o consumo dos alimentos com REE. Um total de 672 amostras de formigas de 84 colônias foram coletadas; LODs e LOQs não informados.	NAA	71
Besouro mexicano (<i>Epilachna varivestis</i>); Percevejo (<i>Podisus maculiventris</i>)	Ce	Monitoramento do acúmulo de Ce em consumidores primários e secundários de plantas cultivadas em solo contaminado por nanopartículas de CeO ₂ ; As amostras foram coletadas após 22, 29 e 36 dias e foram previamente secas em estufa a 70 °C por 96 h e decompostas por MAWD (HNO ₃ + H ₂ O ₂ 30% (1 + 4)); Massa de amostra não informada; LOD de 0,1 ng L ⁻¹ . O CRM NIST-SRM 1547 foi utilizado para medir a exatidão do método (98% de concordância com o valor certificado).	ICP-MS	26

Bicudo (<i>Anthonomus grandis</i>); Lagarta; Mariposa (<i>Spodoptera exígua</i>)	Sm	Avaliação de Sm como marcador de plantas de algodão e de dois insetos que se alimentam de diferentes partes da planta; Sm(NO ₃) ₃ foi misturado na água de irrigação do algodão; As amostras foram irradiadas por 14 h com um fluxo nominal de nêutrons de 1 × 10 ¹³ cm ⁻² s ⁻¹ e submetidas à espectrometria de raios gama de 2 a 6 dias depois. Massa de amostra não informada; LOD de 36 pg. O CRM SRM1571 (folhas de pomar) foi utilizado para medir a exatidão do método (97,8% de concordância com o valor certificado).	NAA	72
,Besouro (<i>Harpalus</i> (<i>Pseudoophonus</i>) <i>rufipes</i>)	La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Sc e Y.	Avaliação da bioacumulação de REE em solos tratados com herbicidas, pesticidas e fertilizantes através da análise de besouros (bioindicadores); As amostras foram previamente secas em forno tipo mufla a 105 °C por 24 h e então decompostas por MAWD. Foram adicionados 8 mL de HNO ₃ + 2 mL H ₂ O ₂ em tubos de PTFE contendo as amostras, que foram submetidos à radiação micro-ondas (rampa de 15 min até 200 °C e permanência de 15 min em 200 °C). Após a decomposição, os digeridos foram aferidos a 50 mL; Massa de amostra: aproximadamente 20 mg. LODs e LOQs não informados.	ICP-MS	10
Libélula (<i>Onychogomphus</i>); Sedgefly (<i>hydropsyche sp.</i>)	La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Sc, Y, Au, Pt, Th, U, Ir e Pd	Análise de amostras de biota coletadas em cinco locais do rio Elbe (República Tcheca); Massa de amostra: 200 mg; Amostras decompostas por MAWD. Solução de decomposição: 5 mL de HNO ₃ + 1 mL H ₂ O ₂ . Programa de irradiação: 160 °C (potência de 70%) por 5 min, 210 °C (potência de 80%) por 5 min e 240 °C (potência de 90%) por 5 min. Após a decomposição, os digeridos foram aferidos à 25 mL. Para a determinação dos REE, os digeridos foram previamente diluídos 10 vezes e Re (0,5 mg L ⁻¹) foi adicionado como padrão interno;); LODs de 1,75 µg kg ⁻¹ (Lu) a 14,3 µg kg ⁻¹ (Sm).	o-TOF-ICP- MS	73

Invertebrados macrobentônicos (ex.: besouros (<i>elmidae</i>) e libélulas (<i>Anisoptera</i>).	Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Sc, Tb, Tm, Yb e Y	Determinação do uso potencial de invertebrados macrobentônicos como traçadores ecológicos de REE em ecossistemas aquáticos. As amostras foram secas por 72 h a 70 °C decompostas por MAWD em frascos de PTFE com 7 mL de HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹ + 1,5 mL de H ₂ O ₂ 30%. Rampa de aquecimento de 8 min até 130 °C, permanência em 130 °C por 2 min. Após, rampa de 8 min até 200 °C e permanência em 200 °C por 5 min e resfriamento por 30 min. As amostras digeridas foram transferidas quantitativamente para tubos de polipropileno de 50 mL; massa de amostra: 500 mg. LOQ: 0,001 mg kg ⁻¹ .	ICP-MS	27
Gafanhoto migratório (<i>Melanoplus sanguinipes</i>)	Ce	Monitoramento dos efeitos do consumo de uma dieta contaminada com cério no inseto. As amostras foram secas a 70 °C até peso constantes e após foram digeridas com 10 mL de HNO ₃ ultrapuro e 100 µL de H ₂ O ₂ e, em seguida, aquecidas por um mínimo de quatro horas a 100 °C com aquecimento convencional. Massa de amostra: 0,5 mg. A determinação foi realizada por ICP-MS com célula de reação dinâmica (DRC), com a utilização de padrão interno. LOD e LOQ não informados.	ICP-MS	48
Abelhas da Nova Zelândia	La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Dy, Ho, Eu, Tm, Yb, Lu	Avaliação de um método miniaturizado de preparo de amostras de abelhas, utilizadas para o biomonitoramento de atividades antropogênicas. As amostras foram secas em liofilizador até peso constante e moídas em um moinho de bolas. Amostras pesadas diretamente em tubos de polipropileno de 15 mL (20 a 200 mg) e decompostas em bloco de aquecimento (80 °C por 1 h) com 0,2 mL de HNO ₃ seguido 30 min de resfriamento e adição de 0,1 mL de H ₂ O ₂ seguido de novo aquecimento (80 °C por 1 h). Após a digestão, as amostras foram avolumadas para 6 mL. Na etapa de determinação ⁴⁵ Sc, ¹⁰³ Rh, ¹²⁵ Te e ¹⁹³ Ir foram usados como padrões internos e uma curva de calibração de cinco pontos (0,1 a 500 µg kg ⁻¹) foi utilizada. LODs de 0,523 ng g ⁻¹ (La) a 1,65 ng g ⁻¹ (Sm).	ICP-MS	29

Grilos (<i>Acheta domesticus</i>) e Aranhas lobos (família <i>Lycosidae</i>)	Ce	Avaliação do acúmulo e transferência trófica de CeO_2 através de uma cadeia alimentar terrestre. Amostras decompostas em bloco digestor com HNO_3 14,4 mol L ⁻¹ e 2 mL de H_2O_2 30%. Massa de amostra não informada; LOQ: 4,65 ng g ⁻¹ .	ICP-MS	30
Formigas (<i>Myrmica rubra</i> L., <i>M. scabrinodis</i> Nyl. e <i>Lasius</i> <i>niger</i> L.)	Eu	Avaliação da eficiência de Eu como marcador em formigas. Massa de amostra, LOD e LOQ não foram informados.	NAA	74
Formigas de fogo (<i>Solenopsis</i> <i>invicta</i> Buren)	Sm	Avaliação do efeito da densidade de presas associadas a plantas daninhas sobre as áreas de forrageamento de colônias de formigas de fogo; Massa de amostra, LOD e LOQ não foram informados.	NAA	75
Abelhas em fase larval e adultas	Gd	Rastreamento do fluxo e consumo de açúcar de em microcolônias artificiais de abelhas. Amostra adicionada a um frasco de politetrafluoretileno (PTFE) juntamente com 2 mL de HNO_3 14,4 mol L ⁻¹ . A mistura foi aquecida a 150°C até completa secagem. Após resfriamento, 0,2 mL de HNO_3 14,4 mol L ⁻¹ foram adicionados à solução e secos novamente a 60°C. O processo foi repetido, quando necessário, até que a solução de HNO_3 estivesse límpida. Massa de amostra, LOD e LOQ não foram informados.	ICP-OES	76
Grilos (<i>Acheta domesticus</i>), besouros escuros (<i>Tenebrionoidea</i>) louva-a-deus (<i>Mantodea</i>)	La	Avaliação da bioacumulação e da transferência trófica de nanopartículas de La_2O_3 do solo para uma cadeia alimentar terrestre; Amostras secas em estufa a 100 °C por no mínimo 2 h e decompostas em bloco digestor por 30 min com HNO_3 14,4 mol L ⁻¹ , após adição de 1 mL de H_2O_2 30%, as amostras foram novamente aquecidas por 25 min. LOQ de 0,004 mg kg ⁻¹ ; Massa de amostra não informada.	ICP-MS	28

Invertebrados macrobentônicos (ex.: mosquitos (<i>Chaoborus</i>) e libélulas (<i>Anisoptera</i>)	Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu	Avaliação do destino natural de REE através da análise da teia alimentar em 14 lagos temperados canadenses. Amostras previamente secas e decompostas em tubos de PTFE por MAWD com 3 mL de HNO ₃ 70% por 15 min a 170 °C. Mais dois ciclos de 15 min foram completados após a adição de 0,5 mL de H ₂ O ₂ 30% antes de cada ciclo. LODs de 3,9 ng L ⁻¹ (Lu, Yb, Tm, Er, Ho, Gd e Pr) a 5,25 ng L ⁻¹ (La); Massa de amostra: aproximadamente 100 mg.	ICP-MS	77
Invertebrados bentônicos (ex.: Libélula (<i>Anisoptera</i>)	Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu	Avaliação dos níveis de REE na biota de diferentes níveis tróficos encontrados em ecossistemas de água doce, marinhos e terrestres do Ártico; As amostras foram liofilizadas e decompostas por um longo período a uma temperatura baixa (temperatura ambiente por 24 h, após, placa quente por 2 h a 80 °C) com 3 mL de HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹ e 0,5 a 1,0 mL de H ₂ O ₂ 30%. Massa de amostra: aproximadamente 0,1 g. LODs de 0,0143 (Lu) a 0,2684 ng g ⁻¹ (Nd).	ICP-MS	54

Em comparação com a técnica de ICP-OES, a ICP-MS é mais amplamente utilizada para a determinação de REE em amostras biológicas, pois apresenta a possibilidade de menores LODs ⁷⁸. Vale salientar que ambas as técnicas necessitam que os analitos estejam em solução, requerendo um tratamento prévio das amostras, adequando-as para a introdução no equipamento ^{78,79}.

De maneira geral, a determinação de REE por ICP-OES e ICP-MS precisa de um pré-tratamento de amostra que atenda alguns requisitos. A decomposição completa da amostra é necessária para a obtenção de resultados reprodutíveis e precisos, pois altos teores de carbono em solução podem acarretar em interferências nas técnicas de determinação com plasma indutivamente acoplado ⁸⁰. Outro requisito necessário é o baixo teor de acidez residual, pois a presença de altos teores de acidez nos digeridos também pode modificar as propriedades físicas das soluções, causar efeitos de supressão da intensidade do sinal e interferências espectrais em ICP-MS por íons poliatômicos ^{81,82}.

A seguir, serão descritos, de maneira sucinta, os principais métodos de preparo de amostras para a posterior determinação de REE pelas técnicas de ICP-MS e ICP-OES.

2.5 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE

2.5.1 Decomposição por via úmida

A decomposição por via úmida é muito empregada no preparo de amostras para análise elementar. É um dos métodos de preparo mais utilizados para a posterior determinação de metais (incluindo REE) pelas técnicas de ICP-OES e ICP-MS. Na decomposição por via úmida, um ácido mineral é utilizado para oxidar a matéria orgânica presente nas amostras em aquecimento, e os analitos são absorvidos em uma solução adequada ²³.

O ácido mais comumente utilizado para a decomposição de amostras por via úmida é o HNO₃, que apresenta fortes propriedades oxidantes e é compatível com a maioria das técnicas instrumentais. Além disso, o HNO₃ pode ser obtido comercialmente com elevada pureza ²³. Porém, dependendo do tipo de amostra, outros ácidos também podem ser utilizados (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ e HClO₄), bem como peróxido de hidrogênio, combinados ou não com o HNO₃. Para amostras com alto teor de sílica, o HF também é, normalmente, empregado ^{83,84}. A decomposição por via úmida pode ser realizada em sistemas fechados ou abertos, com aquecimento convencional (convecção) ou por radiação micro-ondas.

2.5.1 Decomposição por via úmida em sistemas abertos

A utilização de sistemas abertos para a decomposição de amostras por via úmida permite o emprego de maiores massas de amostras em relação aos sistemas fechados (acima de 1000 mg), uma vez que o sistema opera a pressão atmosférica, não havendo riscos de explosão. Ainda, possibilita a adição de outros reagentes no decorrer da decomposição. Porém, algumas limitações ocorrem para sistemas abertos, como menor eficiência, maiores tempos de decomposição, riscos de perdas por volatilização e de contaminação^{23,80,85,86}. Ademais, os sistemas abertos apresentam a necessidade do emprego de ácidos concentrados, que além de aumentarem os valores dos brancos e os riscos de contaminação, promovem altos teores de acidez residual que podem causar a supressão da intensidade do sinal e interferências espectrais nas técnicas de ICP-MS e ICP-OES⁸⁷.

Outra característica dos sistemas abertos de decomposição que precisa ser observada está relacionada ao ácido utilizado, uma vez que a temperatura máxima alcançada se limita à temperatura de ebulição do ácido. O HNO₃, por exemplo, forma um azeótropo com água (HNO₃ 65%) que entra em ebulição a 121 °C, temperatura onde a degradação da matéria orgânica de algumas amostras pode não ser completa. Para contornar este problema, a utilização de H₂SO₄ pode ser recomendada, uma vez que seu azeótropo com água (98%) possui elevada temperatura de ebulição (339 °C)^{23,88}.

Embora seja possível a utilização de aquecimento por micro-ondas, a maioria dos trabalhos publicados na literatura que abrangem a decomposição de insetos por via úmida em sistemas abertos para a posterior determinação de REE utiliza aquecimento convencional^{28,29,48,76}. Em geral, esses métodos apresentam limitações, como: longo tempo de decomposição (normalmente acima de 3 horas), dificultando a aplicação em rotina analítica, e a utilização de HNO₃ concentrado que, além de não estar de acordo com os aspectos preconizados pela química verde⁸⁹, aumenta o teor de acidez residual nos digeridos.

Recentemente, Grainger et al.²⁹ propuseram um sistema miniaturizado de decomposição por via úmida com frascos abertos com aquecimento convencional, para a determinação de 39 elementos (incluindo REE) em amostras de mel, pólen e abelhas. A metodologia proposta incluiu duas etapas de aquecimento (80°C, 60 min.) após adições de 0,2 mL de HNO₃ e 0,1 mL de H₂O₂, consecutivamente. Ainda, uma etapa de resfriamento de 30 min entre as duas etapas de aquecimento. Após novo resfriamento, os digeridos foram aferidos para 6 mL com água ultrapura e a determinação foi realizada pela técnica de ICP-MS. O fator de diluição final foi de aproximadamente 30 vezes. O método apresentou LODs de 0,523 ng g⁻¹ (La) a 1,65 ng g⁻¹

(Sm). Os autores destacaram a simplicidade do método, que o torna acessível a laboratórios que não possuem equipamentos de digestão por micro-ondas. Além disso, apenas um frasco foi utilizado durante todo o processo de decomposição e determinação, diminuindo os riscos de contaminação. Ademais, baixos teores de carbono residual foram obtidos. No entanto, para possibilitar a utilização de pequenos volumes de reagentes, pequenas massas de amostras foram utilizadas (de 20 a 200 mg), o que pode resultar em problemas devido à heterogeneidade de algumas amostras. Além disso, o método proposto apresenta longo tempo para a decomposição completa das amostras (cerca de 3 h).

2.5.1.2 Decomposição por via úmida em sistemas fechados

A utilização de frascos fechados na decomposição por via úmida aumenta a eficiência da oxidação e diminui o tempo de decomposição. Além disso, diminui os riscos de contaminação e de perdas por volatilização, reduz o consumo de reagentes, diminuindo os valores dos brancos e os LOQs, além de possibilitar que sejam alcançadas temperaturas maiores que o ponto de ebulição do ácido utilizado, melhorando seu efeito oxidante e promovendo maior eficiência de digestão^{23,85,90}. Ademais, em sistemas fechados, a utilização de H₂O₂ em conjunto com HNO₃ promove a regeneração do HNO₃, diminuindo a pressão interna dos frascos e permitindo que o mesmo, regenerado, possa continuar o processo de oxidação⁸⁶.

A maioria das decomposições por via úmida em sistemas fechados tem sido realizada com aquecimento por radiação micro-ondas (MAWD), embora seja possível a utilização de aquecimento convencional. A radiação micro-ondas promove um aquecimento mais rápido quando comparado ao aquecimento por condução⁹¹. Porém, mesmo empregando maiores temperaturas e pressões, que podem chegar a 280 °C e 80 bar, respectivamente, em muitos casos a decomposição em sistemas fechados pode não ser efetiva. Com isso, o digerido pode apresentar altos teores de carbono em solução, que pode resultar em interferências espectrais e não espectrais. Além disso, esses sistemas normalmente utilizam ácidos minerais concentrados para decompor as amostras, o que pode resultar em aumento do valor do branco causado pela presença de contaminantes e interferências nas técnicas analíticas, sendo necessária uma etapa adicional no preparo de amostras para diluir o excesso de ácido^{80,92}. A literatura abrange diversas aplicações de preparo de amostras de insetos por decomposição via úmida em sistema fechado com aquecimento por micro-ondas para a posterior determinação de REE, descritas na Tabela 1.

Alternativamente, um sistema originalmente proposto por Florian e Knapp³¹ combinou a decomposição assistida por micro-ondas com radiação ultravioleta, promovendo decomposições mais eficientes. Nesse sistema, uma lâmpada UV é inserida dentro do frasco de decomposição, com o bulbo mergulhado na solução de decomposição. A lâmpada é preenchida com 1 mg de Cd a uma baixa pressão (4 mbar de Ar) e a emissão UV é ativada pela interação com a radiação micro-ondas. A radiação ultravioleta, quando utilizada com soluções oxidantes, como H₂O₂ e HNO₃, atua como um catalisador para a formação de espécies extremamente reativas, como OH* e HO₂* que auxiliam na degradação da matéria orgânica^{23,31}.

A MAWD-UV tem sido aplicada para diferentes matrizes, como alimentos⁹³, amostras biológicas⁹⁴, ambientais⁹⁵ e poliméricas⁹⁶. Pereira et al.⁹⁷ avaliaram a utilização da MAWD-UV no preparo de amostras de petróleo bruto para a posterior determinação de REE. Os autores destacam que foi possível a realização de uma decomposição eficiente de 500 mg de amostra através da utilização de HNO₃ 4 mol L⁻¹ + 4 mL de H₂O₂ 30%. Os resultados obtidos foram comparados com dois métodos de referência (NAA e MAWD) e não apresentaram diferença significativa. No entanto, não foram encontradas aplicações da MAWD-UV na literatura visando ao preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE.

2.5.2 Métodos de combustão

Os métodos de combustão baseiam-se na decomposição da matéria orgânica presente nas amostras por uma combinação de processos, envolvendo principalmente pirólise e oxidação. Apresentam normalmente alta eficiência na decomposição da matriz orgânica, permitindo baixos teores C residuais. Além disso, não necessitam da utilização de ácidos concentrados, pois o único reagente necessário para a decomposição de uma amostra por combustão é o oxigênio. Depois de decompostas, as amostras podem ser solubilizadas em soluções diluídas^{23,34}. A combustão de materiais orgânicos pode ser executada em sistemas abertos ou fechados. Cabe ressaltar que a utilização de sistemas fechados minimiza os riscos de contaminação e perdas de analitos por volatilização. Os métodos de combustão mais comumente utilizados e que serão abordados neste tópico são baseados na combustão por via seca (sistema aberto), frasco de Schöniger, bomba de combustão e, mais recentemente, a MIC (sistemas fechados).

2.5.2.1 Combustão por via seca

No método de combustão por via seca, as amostras são adicionadas em cadinhos, normalmente de porcelana, e a decomposição é realizada em forno tipo mufla, utilizando o oxigênio do ar atmosférico. A decomposição ocorre normalmente em temperaturas entre 450 e 500 °C, resultando em um resíduo inorgânico (cinzas) que é geralmente constituído de óxidos e metais, além de sulfatos não voláteis, fosfatos e silicatos. O resíduo inorgânico proveniente da queima da amostra pode ser geralmente solubilizado por um ácido diluído ²³.

O método de combustão por via seca, além de ser simples e relativamente barato, permite a utilização de uma grande massa de amostra (geralmente de 0,5 a 2 g), minimizando problemas devido à heterogeneidade. Além disso, o método apresenta como vantagens a possibilidade de utilização de ácido diluído e em pequeno volume para a solubilização do resíduo da queima e a obtenção de digeridos com teores de carbono residual normalmente baixos, característico dos métodos de combustão ^{23,98}.

Todavia, a combustão por via seca apresenta limitações, como o grande risco de contaminação e a impossibilidade de aplicações para elementos voláteis, uma vez que o sistema é aberto e temperaturas elevadas são atingidas. Elementos como F, Cl, Br, I, Se, P, As, Sb, Ge, Tl e Hg são propensos à perdas por volatilização em fornos tipo mufla. Além disso, dependendo da composição da matriz da amostra, compostos voláteis de outros elementos podem ser formados durante a queima. Em alguns casos, determinadas espécies presentes na amostra, como silicatos, óxidos e fosfatos podem reagir com o esmalte dos cadinhos de porcelana. Esta limitação pode ser contornada pela utilização de cadinhos de quartzo ou platina ^{23,99}.

2.5.2.2 Bomba de combustão

No sistema da bomba de combustão, as amostras são inseridas na forma de *pellets* dentro de uma bomba de aço inoxidável na presença de excesso de oxigênio. Um fio de platina é conectado a dois eletrodos e inserido próximo ao pellet, para a posterior ignição. Além disso, no fundo da bomba é adicionada uma solução adequada (cerca de 10 mL), que irá absorver os analitos e os gases gerados durante a combustão ¹⁰⁰.

Neste método, uma massa relativamente alta de amostra (acima de 500 mg) pode ser utilizada e queimada de maneira eficiente, promovendo digeridos de baixo teor de carbono residual (RCC). Porém, o sistema interno da bomba é constituído de metal, o que implica em riscos de contaminação dos digeridos (embora menores que em sistemas abertos), dificultando a determinação de metais a nível traço. Outras desvantagens da utilização do sistema são a baixa

frequência analítica, sendo que apenas uma amostra pode ser queimada por vez, e a baixa eficiência de lavagem, que por vezes exige uma etapa de agitação manual ^{100,101}. Embora a bomba de combustão tenha sido pouco empregada como método de preparo de amostras para a posterior determinação de REE, em 2005 foi relatada uma aplicação para amostras de petróleo ¹⁰².

2.5.2.3 Frasco de combustão de Schöniger

No método do frasco de oxigênio, também conhecido como frasco de Schöniger ¹⁰³, a amostra é embrulhada com papel filtro com baixo teor de cinzas e posicionada em uma alça de platina com uma espécie de cesta na extremidade. A alça contendo a amostra é então inserida dentro de um Erlenmeyer preenchido com oxigênio à pressão atmosférica e contendo uma solução absorvedora adequada para o elemento em que se deseja determinar. A ignição pode ser realizada manualmente, por corrente elétrica ou lâmpadas infravermelhas focadas. Após a combustão, o recipiente pode então ser agitado para auxiliar na lavagem interna ²³. As vantagens do frasco de Schöniger incluem o baixo risco de perdas e contaminação, além da simplicidade e facilidade de execução do método. Porém, ao contrário da bomba de combustão, não permite a utilização de grandes massas de amostras (em geral, menores que 100 mg para um frasco de 1000 mL), dificultando sua utilização em análises de traços, incluindo REE. Além disso, o método também apresenta baixa frequência analítica, sendo que apenas uma amostra pode ser processada por vez ^{23,100,104}.

Com o objetivo de combinar as vantagens do método de decomposição por via úmida com aquecimento por radiação micro-ondas e dos métodos de combustão em sistemas fechados, foi desenvolvida a MIC ³³, considerada uma boa alternativa na área de preparo de amostras, que será abordada no próximo item.

2.5.2.4 Combustão Iniciada por Micro-ondas

A MIC foi proposta por Barin ¹⁰⁵ e, desde então, tem sido aplicada para a decomposição de diferentes tipos de matrizes biológicas, petroquímicas, alimentares, poliméricas e materiais carbonáceos a para a posterior determinação de halogênios e metais (incluindo REE) ^{106,107}. Primeiramente, o autor propôs um trabalho onde as amostras eram decompostas em um forno de micro-ondas doméstico adaptado, com a utilização de oxigênio líquido. A seguir, um sistema comercial foi utilizado ¹⁰⁵.

No sistema da MIC a amostra (normalmente comprimida ou em invólucro) é colocada em um papel filtro contido em um suporte de quartzo, o qual é inserido no interior do frasco de digestão contendo uma solução absorvedora adequada. Antes da adição da amostra, o papel filtro é umedecido com 50 μL de uma solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} , responsável por iniciar a combustão^{33,34}. Segundo Pereira et al.¹⁰⁷, a ignição ocorre pela oxidação do papel pelo NH_4NO_3 , que está sob incidência de radiação micro-ondas e em atmosfera de oxigênio (frascos pressurizados com 20 bar de O_2), que favorece a reação.

Após a combustão, uma etapa de refluxo pode ser realizada para melhor recuperação dos analitos, onde ocorre a irradiação de micro-ondas contínua por aproximadamente 5 min. Para a determinação de metais (incluindo REE), normalmente os analitos são absorvidos em uma solução de HNO_3 diluído ou em uma mistura de HNO_3 e HCl . No caso de halogênios, os analitos normalmente são absorvidos em uma solução alcalina contendo amônia ou carbonato de amônio^{23,34}.

Dentre as características da MIC, o sistema apresenta diversas vantagens quando comparado aos métodos de preparo de amostra convencionais, tais como a possibilidade de utilização de massas de amostra relativamente elevadas (geralmente 500 mg), frequência analítica elevada e alta eficiência de decomposição de matrizes orgânicas (RCC geralmente abaixo de 1%, dependendo da natureza da amostra) para a posterior determinação de metais (incluindo REE) e ametais^{100,108}. Além disso, a possibilidade de utilização de soluções diluídas, além de diminuir possíveis interferências nas técnicas de determinação e os valores dos brancos analíticos, contribui para os princípios da química verde^{108,109}.

Quanto ao uso da MIC como preparo de amostra para a posterior determinação de REE, poucos trabalhos foram publicados relacionados ao assunto. Pereira et al.¹⁶ utilizaram a MIC para o preparo de amostras de petróleo para a determinação de REE por ICP-MS. Neste trabalho, até 500 mg de amostra foram utilizadas, envoltas em filmes de polietileno. Os valores de RCC nos digeridos foram inferiores a 1%. Foi possível a utilização de uma solução de 3 mol L^{-1} de HNO_3 para a retenção de todos os analitos. As recuperações obtidas para todos os REE após a digestão com MIC ficaram na faixa de 97,8 a 102% e os valores de desvio padrão relativo (RSD) foram inferiores a 5%.

Em sua tese de doutorado, Druzian¹¹⁰ utilizou a MIC para o preparo de amostra de sangue, visando à determinação de REE. Foram utilizadas 400 mg de amostra, pesados diretamente em discos de papel DBS. Uma solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} foi utilizada para iniciar a combustão. Durante a otimização da solução absorvedora, foram testadas diferentes concentrações de HNO_3 , assim como misturas de HNO_3 e HCl em diferentes proporções e

concentrações. Recuperações satisfatórias (> 91,5%) foram obtidas somente quando uma solução absorvedora de água régia (HCl + HNO₃ 3+1) foi utilizada. Segundo o autor, as baixas recuperações obtidas com a utilização de HNO₃ como solução absorvedora podem ser explicadas pela formação de espécies estáveis, como óxidos ternários, adsorvidos na base do suporte e nas paredes do frasco de quartzo, desta forma, a utilização de HCl auxilia na formação de cloretos voláteis durante as etapas de combustão e refluxo, evitando a formação de compostos refratários.

2.6 TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA A DETERMINAÇÃO DE REE

Como já mencionado anteriormente, a crescente liberação dos REE no meio ambiente torna cada vez mais necessário o controle desses elementos em diferentes ecossistemas, que pode ser realizado através da determinação dos REE em insetos⁹. Além disso, a determinação dos REE em amostras de insetos comestíveis é cada vez mais necessária⁵⁷. No entanto, as baixas concentrações dos REE em amostras de insetos (ng g⁻¹), aliada à presença de diversas interferências, tornam a determinação quantitativa desses elementos um desafio analítico¹¹¹.

As técnicas comumente utilizadas para a determinação de REE incluem a NAA, ICP-OES e ICP-MS. As três técnicas serão descritas de maneira sucinta a seguir.

2.6.1 Análise por ativação neutrônica

Na NAA, a amostra é irradiada em um fluxo de nêutrons provenientes de uma fonte emissora, geralmente em um reator nuclear. Os nêutrons interagem com o núcleo atômico, que libera determinadas quantidades de energia na forma de radiação. A radiação liberada é característica de cada núcleo e pode ser relacionada com a concentração de cada elemento¹².

É considerada uma técnica não destrutiva, absoluta e que não requer nenhum preparo de amostra. No entanto, a necessidade de trabalhar com materiais radioativos e o alto custo dos reatores nucleares inviabilizam a utilização da técnica em rotina. Além disso, a NAA requer longo tempo de análise, operadores qualificados e apresenta maiores LODs (0,04 a 4 µg L⁻¹) em comparação com a técnica de ICP-MS (0,001 a 0,25 ng L⁻¹)¹³.

2.6.2 Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

As técnicas de ICP-OES e ICP-MS são muito atrativas para a determinação de REE em diferentes tipos de amostras, pois apresentam ampla faixa linear, capacidade multielementar e baixos LOQs. No entanto, como já mencionado, a presença de diversas interferências espectrais e não espectrais pode dificultar a determinação dos REE utilizando estas técnicas. As interferências são causadas principalmente por efeitos da concentração do ácido utilizado no preparo das amostras, efeitos do carbono residual e formação de espécies poliatômicas (para a técnica de ICP-MS).

Concentrações de ácido elevadas (ex.: > 15% de HNO₃) podem afetar a distribuição dos íons na zona analítica do plasma, além de causar interferências de transporte devido a diferenças na viscosidade, densidade e tensão superficial das amostras quando comparadas com as soluções de referência ^{20,22}.

A presença de carbono nos digeridos, proveniente da decomposição incompleta da matriz, também pode causar interferências não-espectrais, ocasionadas por diferenças nas propriedades físicas entre os digeridos e as soluções padrões de calibração. No ICP-OES, altos teores de carbono residual podem ocasionar interferências espectrais devido ao aumento dos sinais de emissão dos analitos, causados pela transferência de carga ^{21,112}. No ICP-MS, além dos efeitos de transferência de carga ¹⁹ o carbono pode formar íons moleculares com outros elementos que podem apresentar a mesma m/z dos analitos ⁸².

As interferências poliatômicas são, principalmente, originadas pela formação de óxidos e hidróxidos ^{113,114}. Os elementos terras-raras leves (LREE: La-Sm) formam facilmente óxidos no plasma, em menor grau, hidróxidos, que podem afetar na determinação dos elementos terras-raras pesados (HREE: Eu-Lu) devido a sobreposições espectrais. A presença de Ba nas amostras também pode causar interferências poliatômicas na determinação de REE. Por exemplo, o BaO pode dificultar a quantificação de Eu devido às proximidades das razões m/z ^{113,115}.

Considerando todas as interferências citadas anteriormente, a utilização de métodos de preparo de amostras adequados às técnicas de ICP-OES e ICP-MS é de extrema importância. Porém, além disso, algumas alternativas instrumentais também podem auxiliar a contornar algumas dessas interferências. Uma alternativa comumente utilizada para limitar as interferências de óxidos e hidróxidos é a utilização de um dispositivo de dessolvatação de aerossol (Aridus, Apex e nebulização ultrassônica (USN)) para introdução de amostra. Esses dispositivos permitem a introdução de um aerossol seco no plasma, diminuindo a formação de

óxidos. Além disso, uma melhoria significativa no transporte do analito é observada, possibilitando uma maior quantidade de amostra no plasma e, conseqüentemente, diminuindo os limites de quantificação (LOQs) ¹¹⁵.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os instrumentos, amostras e reagentes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho. Também serão apresentados os procedimentos e parâmetros otimizados para cada método analítico utilizado na realização deste trabalho.

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

No presente trabalho, foram otimizados três métodos para o preparo de amostras de insetos visando à posterior determinação de REE (com exceção de Sc e Pm) por USN-ICP-MS. Os métodos utilizados estão descritos abaixo:

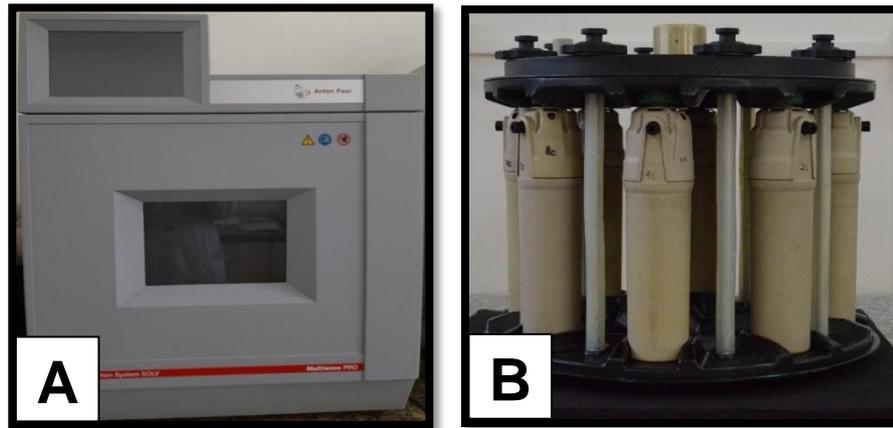
- i) Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas (MAWD) com ácidos diluídos;
- ii) Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta (MAWD-UV) empregando ácidos diluídos;
- iii) Combustão iniciada por micro-ondas (MIC).

Foram utilizadas como métodos de referência a MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1} e a CWD-OS.

A CWD-OS foi realizada com a utilização de um bloco de aquecimento (modelo DK 42[®], Velp Scientífica, Itália) equipado com frascos de vidro (50 mL) com 1,8 e 24,4 cm de diâmetro interno e altura, respectivamente. A MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1} foi realizada em um forno micro-ondas Ethos Easy (Milestone, Italy) equipado com 44 frascos de PTFE-TFM que apresentam volume interno de 100 mL. Este forno de micro-ondas possui condições máximas de temperatura e pressão de 200 °C e 35 bar, respectivamente.

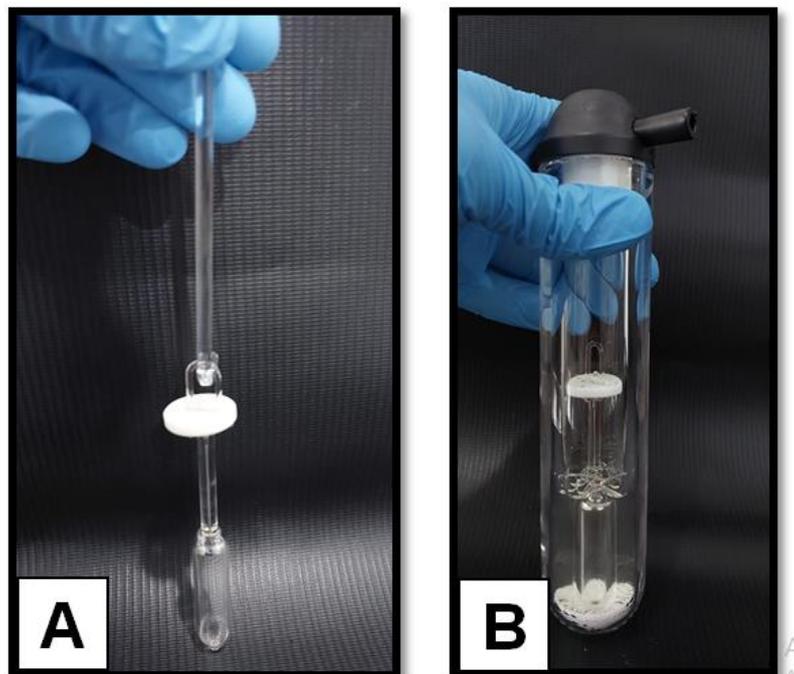
A MAWD com ácidos diluídos, a MAWD-UV e a MIC (métodos propostos) foram realizadas com um forno de micro-ondas Multiwave Pro[®] (Anton Paar, Áustria), com capacidade máxima de 8 frascos que apresentam volume interno de 80 mL e sensores de temperatura e pressão que possibilitam o controle da potência irradiada durante a decomposição. Este forno de micro-ondas possui condições máximas de temperatura, potência e pressão de 280 °C, 1400 W e 80 bar, respectivamente. Porém, para a MAWD-UV, a temperatura máxima selecionada foi de 250 °C, devido aos suportes da lâmpada, que são constituídos de PTFE. Para os três métodos, frascos de quartzo foram utilizados. Para a MIC foi utilizado um suporte de quartzo para introdução das amostras no interior do frasco. Na Figura 1 estão apresentados o forno de micro-ondas utilizado (A), e os frascos posicionados ao rotor (B).

Figura 1 - Forno de micro-ondas Multiwave Pro® (A) e frascos acoplados ao rotor (B).



Para o método de MAWD-UV foram utilizadas lâmpadas de descarga sem eletrodos (Anton Paar), preenchidas com 1 mg de vapor de cádmio sob baixa pressão de argônio (4 mbar). Essas lâmpadas têm a capacidade de emitir radiação em comprimentos de onda predominantemente na região UV. Dispositivos de PTFE foram utilizados para auxiliar no posicionamento da lâmpada no frasco de quartzo. Na Figura 2 está mostrada a lâmpada UV e sua disposição dentro do frasco de quartzo.

Figura 2 - Lâmpada de descarga sem eletrodo (A) e lâmpada inserida dentro do frasco de quartzo (B)



A determinação de REE nas amostras de insetos foi feita utilizando um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo Elan DRC II®, PerkinElmer SCIEX, USA) com separador de massas do tipo quadrupolo. A introdução das soluções no equipamento

foi realizada por meio de um nebulizador ultrassônico (USN, modelo U6000AT+[®], CETAC Technologies, USA), operando em sucessivas etapas de aquecimento (140 °C) e resfriamento (-5 °C) e uma vazão da amostra de 2,5 mL min⁻¹.

As condições operacionais do ICP-MS para a determinação de REE por USN-ICP-MS estão apresentadas na Tabela 2 e foram baseados em trabalhos anteriores ^{15,16}.

Tabela 2 - Parâmetros operacionais do USN-ICP-MS.

Parâmetros	USN-ICP-MS
Potência de radiofrequência, (W)	1300
Vazão principal de argônio, (L min ⁻¹)	15
Vazão auxiliar de argônio, (L min ⁻¹)	1,20
Vazão de argônio do nebulizador, (L min ⁻¹)	1,00
Cones (amostragem e <i>skimmer</i>)	Pt
<i>Dwell time</i> (ms)	50
Varreduras (<i>sweeps</i>)	5
Varreduras por replicata (<i>readings</i>)	3
Replicatas	5
Isótopos monitorados	⁸⁹ Y, ¹³⁹ La, ¹⁴⁰ Ce, ¹⁴¹ Pr, ¹⁴⁶ Nd, ¹⁴⁷ Sm, ¹⁵³ Eu, ¹⁵⁸ Gd, ¹⁵⁹ Tb, ¹⁶³ Dy, ¹⁶⁵ Ho, ¹⁶⁶ Er, ¹⁶⁹ Tm, ¹⁷⁴ Yb e ¹⁷⁵ Lu

O desempenho do equipamento ICP-MS foi monitorado com a utilização de um nebulizador concêntrico (Meinhard Associates, USA) e uma câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Inc., Austrália). Para este fim, foi utilizada uma solução contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de In e Ce e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ba. Foram avaliados os parâmetros de sensibilidade ($^{115}\text{In}^+$), percentual de óxidos ($^{156}\text{Ce}^+ / ^{140}\text{CeO}^+$) e íons de carga dupla ($^{138}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba}^+$).

A determinação de carbono nas soluções obtidas pelos diferentes métodos de preparo avaliados e de Ca, Na, K, Mg, Mn, Fe, Ba e Si dos digeridos foi realizada utilizando-se um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (Ciros CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha) com configuração de vista axial. O equipamento foi equipado com um nebulizador concêntrico (TQ-30-A3, Meinhard, Estados Unidos), com câmara de nebulização do tipo Scott (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2,5 mm de diâmetro interno. Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros instrumentais do ICP-OES.

Tabela 3 - Parâmetros operacionais do ICP-OES.

Parâmetros	ICP-OES
Potência de radiofrequência, (W)	1400
Vazão principal de argônio, (L min^{-1})	15
Vazão auxiliar de argônio, (L min^{-1})	0,2
Vazão de argônio do nebulizador, (L min^{-1})	0,7
Configuração de vista	Axial
Comprimento de onda espectral (nm)	C (193.030), Ca (317.933), Na (589.373), K (766.491), Mg (280.270), Mn (259.592), Fe (238.204), Ba (233.527) e Si (251.611) e Y (371.030)

A determinação da acidez residual nos digeridos foi feita por titulação em meio aquoso utilizando um titulador automático (836, Metrohm, Suíça), equipado com um módulo de agitação magnética (803 TI Stand, Metrohm, Suíça), uma bureta de 20 mL (Dosino 800, Metrohm) e um eletrodo de pH de vidro combinado para meio aquoso (6.0262.100, Metrohm, Suíça).

Um microscópio eletrônico de varredura (modelo Sigma 300 VP, Carl Zeiss, Alemanha) com detector de elétrons secundários foi utilizado para a análise morfológica das amostras. Para

a análise composicional do material resultante da decomposição incompleta das amostras, foi utilizado um detector de energia dispersiva de raios-X (EDS).

A cominuição das amostras foi realizada em 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 digital (AY 220, Shimadzu, Japão), com resolução de 0,0001 g e capacidade de 220 g. Para a secagem dos reagentes sólidos (NH₄Cl e celulose microcristalina) utilizados no preparo das amostras pela MIC, foi utilizada uma estufa com circulação de ar (modelo 400-5ND, Nova Ética, Brasil). A análise estatística dos dados foi realizada usando o software Excel 2013 (Microsoft, EUA, versão 2013). O teste-t de Student foi aplicado com o uso do software GraphPad InStat (GraphPad InStat Software Inc, Versão 3.10, 2009).

3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções utilizadas neste trabalho foram preparadas com água previamente destilada e deionizada por meio de uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de 1,0 $\mu\text{S cm}^{-1}$) e depois purificada em sistema Milli-Q[®] (Millipore Corp. EUA), com resistividade de 18,2 M Ω cm. O HNO₃ (65%, Merck, Alemanha) e o HCl (37%, Merck, Alemanha) utilizados foram destilados em um sistema de sub-ebulição (duoPur[®] 2.01E, Milestone, Itália). Peróxido de hidrogênio (30%, Merck, Brasil) foi utilizado como auxiliar na decomposição por CWD-OS e por MAWD-UV.

Na MIC foram utilizados 50 μL de uma solução de NH₄NO₃ 6 mol L⁻¹ preparada a partir da dissolução do reagente sólido (Merck, Alemanha) em água. Para a pressurização dos frascos, foi utilizado O₂ com pureza de 99,6% (White Martins, Brasil). Discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (Black Ribbon Ashless n^o 5891, Schleicher e Schüll, Alemanha), foram utilizados para auxiliar no processo de ignição. Celulose microcristalina de grau farmacêutico e NH₄Cl (99,998%, sigma Aldrich) também foram utilizados durante a otimização da MIC.

As soluções de calibração para a determinação de REE foram preparadas a partir da diluição de uma solução estoque multielementar (MultiElementSolution 1, CLMS⁻¹, SpexCertiprep Inc.) contendo 10 mg L⁻¹ de Ce, Dy, Er, Eu, Gd, Ho, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Tm, Y e Yb em HNO₃ 5% (v v⁻¹). Os padrões de calibração (de 10 a 5.000 ng L⁻¹) foram preparados através da diluição da solução estoque em HNO₃ 5%. Uma solução contendo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ba e 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de In e Ce foi utilizada para avaliar o desempenho do equipamento de ICP-

MS. Argônio com pureza de 99,998% (White Martins, Brasil) foi utilizado no sistema USN e no equipamento de ICP-MS.

A curva de calibração para a determinação de Ca, Na, K, Mg, Mn, Fe e Ba (1 a 10000 $\mu\text{g L}^{-1}$), foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de 10 mg L^{-1} desses analitos (SCP33MS, SCP Science, Canadá) em HNO_3 5%. Para a determinação de C em solução, a curva de calibração (5 a 5000 mg L^{-1}), foi preparada pela diluição de uma solução estoque de 10000 mg L^{-1} , obtida a partir da dissolução de ácido cítrico (Vetec, Brasil) em água. Antes da determinação, as amostras foram purgadas com 0,1 L min^{-1} de Ar por aproximadamente 2 min. Y foi utilizado como padrão interno, obtido a partir de uma solução estoque (1000 mg L^{-1} , Spex CertiPrep, EUA), adicionado previamente à introdução das soluções no equipamento, de modo que a concentração final foi de 1 mg L^{-1} .

A determinação da acidez residual dos diferentes métodos de preparo foi realizada por titulação em meio aquoso. Para isso utilizou-se como titulante uma solução de KOH 0,1 mol L^{-1} , preparada a partir da dissolução do reagente sólido (Merck, Alemanha) em água. A padronização do titulante foi feita com biftalato de potássio (Merck, Alemanha), que foi previamente seco a 105° C por 2 h.

3.3 AMOSTRAS

Neste trabalho foram utilizadas 3 amostras de grilos comestíveis, originadas de 3 países: Brasil (amostra A), China (amostra B) e Tailândia (amostra C), provenientes de empresas que comercializam insetos para a alimentação humana e animal. As informações de cada amostra estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Informações das amostras de insetos

Amostra	Inseto	País de origem	Nome científico
A	Grilo	China	<i>Acheta domesticus</i>
B	Grilo	Brasil	<i>Acheta domesticus</i>
C	Grilo	Tailândia	<i>Acheta domesticus</i>

Para a otimização dos métodos de preparo, utilizou-se, arbitrariamente, a amostra “A”. A cominuição das amostras foi feita em um moinho de trituração por impacto. Para a MIC, comprimidos das amostras foram confeccionados em uma prensa hidráulica utilizando-se uma força de aproximadamente 49 kN.

A avaliação da exatidão dos métodos propostos foi realizada através da utilização de um CRM de tecido de mexilhão, BCR-668, (Community Bureau of Reference).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a caracterização das amostras, os teores de umidade, cinzas, proteínas e carboidratos foram determinados pelos métodos descritos na AOAC (2019)¹¹⁶. 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 através da multiplicação do teor de nitrogênio total pelo fator de conversão 6,25, descrito na AOAC (2019)^{116,117}. O teor de lipídios foi determinado por extração a frio, através do método proposto por Bligh e Dyer¹¹⁷. A determinação de carboidratos foi realizada pela diferença do somatório dos teores de lipídios, proteínas, umidade e cinzas. As determinações foram feitas no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

Para a determinação de Ca, Na, K, Mg, Mn, Fe, Ba e Si, 500 mg de amostra foram digeridos por MAWD com 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹, em frascos de quartzo, através do seguinte programa de aquecimento: i) rampa de 10 min até 400 W; ii) permanência de 10 min a 400 W; iii) rampa de 10 min até 1000 W; iv) permanência de 10 min a 1000 W v) 20 min até 0 W (resfriamento). Após a decomposição, os digeridos foram aferidos com água ultrapura a 25 mL em frascos volumétricos e a determinação foi realizada por ICP-OES.

3.5 DESCONTAMINAÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS

Os frascos e suportes de quartzo e os frascos de PTFE-TFM foram descontaminados no forno micro-ondas antes de cada etapa da MIC, MAWD ou MAWD-UV com 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ P.A., através do seguinte programa de aquecimento: i) 1000 W, durante 10 min; ii) 0 W, por 20 min. Após o término do programa, o resíduo ácido foi descartado e os frascos foram lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido.

Todas as vidrarias e materiais de laboratório utilizados foram previamente descontaminados com HNO₃ 10% (v v⁻¹) por no mínimo 24 h e posteriormente lavados com água ultrapura e secos com ar comprimido. O papel filtro utilizado na MIC foi descontaminado com HNO₃ 20% (v v⁻¹) em banho de ultrassom durante 30 min, sendo posteriormente lavado com água e seco em capela de fluxo laminar.

3.6 OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PARA REE EM INSETOS APÓS MAWD e CWD-OS

Para avaliar a exatidão dos métodos propostos, foram utilizados dois métodos de referência (MAWD e CWD-OS). Para a obtenção de valores de referência por MAWD, o procedimento utilizado foi adaptado de trabalhos prévios. Aproximadamente 250 mg de amostra previamente moída foram transferidos para o interior dos frascos de PTFE-TFM, e em seguida foram adicionados 6 mL de HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ sobre as amostras. Primeiramente, os frascos foram deixados abertos e em repouso por cerca de 20 min, para a pré-reação do HNO₃ com a amostra. Após, os frascos foram fechados, inseridos no rotor e transferidos para o forno micro-ondas. Na Tabela 5 está apresentado o programa de aquecimento utilizado.

Tabela 5 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de insetos por MAWD (método de referência)
* Etapa de resfriamento

Etapa	Temperatura °C	Rampa, min	Tempo de permanência, min
1	120	10	5
2	180	10	5
3*	0	-	5

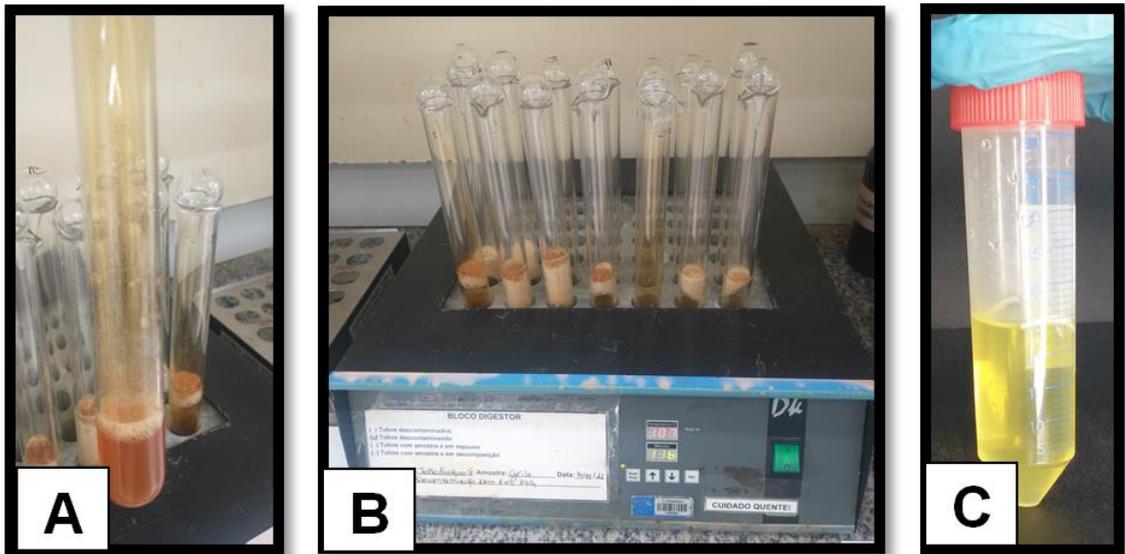
Após a decomposição, as soluções resultantes foram transferidas para frascos volumétricos e aferidas a 25 mL com água ultrapura. Na Figura 4 pode-se observar o aspecto da amostra A após decomposição por MAWD. A determinação de REE foi realizada por USN-ICP-MS.

Figura 3 - Amostra A após decomposição por MAWD



Para a obtenção de valores de referência por CWD-OS, aproximadamente 200 mg de amostra foram pesados e transferidas para o interior dos frascos de vidro. Posteriormente, foi realizada a adição de 6 mL de HNO_3 14,4 mol L^{-1} e 1 mL de H_2O_2 e os frascos de vidro foram levados ao bloco de decomposição. A decomposição foi realizada por 4 h na temperatura de 100 °C. A Figura 5 ilustra algumas etapas envolvidas no método de CWD-OS.

Figura 4 - Procedimento de CWD-OS para a decomposição de insetos: A) Aspecto da amostra após adição de 6 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂; B) Etapa de decomposição das amostras e C) Solução final após CWD-CS.



Após o término da decomposição e resfriamento dos frascos de vidro, as soluções resultantes foram recolhidas em frascos volumétricos e aferidas a 25 mL. A determinação de REE foi feita por USN-ICP-MS.

3.7 MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS DE INSETOS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE POR USN-ICP-MS

Neste trabalho foram avaliados três métodos de preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Os métodos propostos foram: *i*) MAWD utilizando ácidos diluídos, *ii*) MAWD-UV e *iii*) MIC. Cabe destacar que a MAWD com HNO₃ 14,4 mol L⁻¹ foi utilizada como método de referência (item 3.6), porém, adicionalmente, no desenvolvimento do presente trabalho foi avaliada a utilização de ácidos diluídos como solução de decomposição da MAWD. Os procedimentos utilizados para os métodos propostos serão descritos a seguir.

3.7.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas

Na MAWD, 6 mL de solução de decomposição foram transferidos para o interior de frascos de quartzo. Após, 500 mg de amostra foram transferidos para o mesmo frasco. Após, os frascos foram fechados, levados até o rotor e submetidos ao aquecimento por radiação micro-ondas, conforme o programa descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de insetos por MAWD (método proposto)

*Etapa de resfriamento

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo de permanência, min
1	400	10	10
2	600	10	10
3*	0	-	20

Após o resfriamento, as soluções resultantes foram recolhidas em frascos volumétricos e aferidas a 25 mL com água ultrapura. A determinação de REE foi realizada por USN-ICP-MS.

Na MAWD foram otimizados os seguintes parâmetros experimentais: *i*) concentração de HNO₃ (de 3 a 7 mol L⁻¹) e *ii*) utilização de 1 mL de HCl para auxiliar na recuperação dos analitos.

3.7.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta

Na MAWD-UV, 5 mL de solução de decomposição foram transferidos para o tubo de quartzo contendo no interior um dispositivo de PTFE da lâmpada UV. Após, 500 mg de amostra foram transferidos para o frasco de quartzo e mais 10 mL da solução de decomposição foram adicionados. Após, o outro dispositivo de PTFE foi inserido na lâmpada e a mesma foi colocada no interior do frasco de quartzo. Após, os frascos foram fechados, levados até ao rotor e submetidos à irradiação micro-ondas, conforme o programa de aquecimento apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Programa de aquecimento utilizado para a decomposição de insetos por MAWD-UV

*Etapa de resfriamento

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo de permanência, min
1	400	10	10
2	700	10	10
3*	0	-	20

Após o resfriamento, as soluções resultantes foram recolhidas em frascos volumétricos e aferidas a 30 mL com água ultrapura. A determinação de REE foi realizada por USN-ICP-MS.

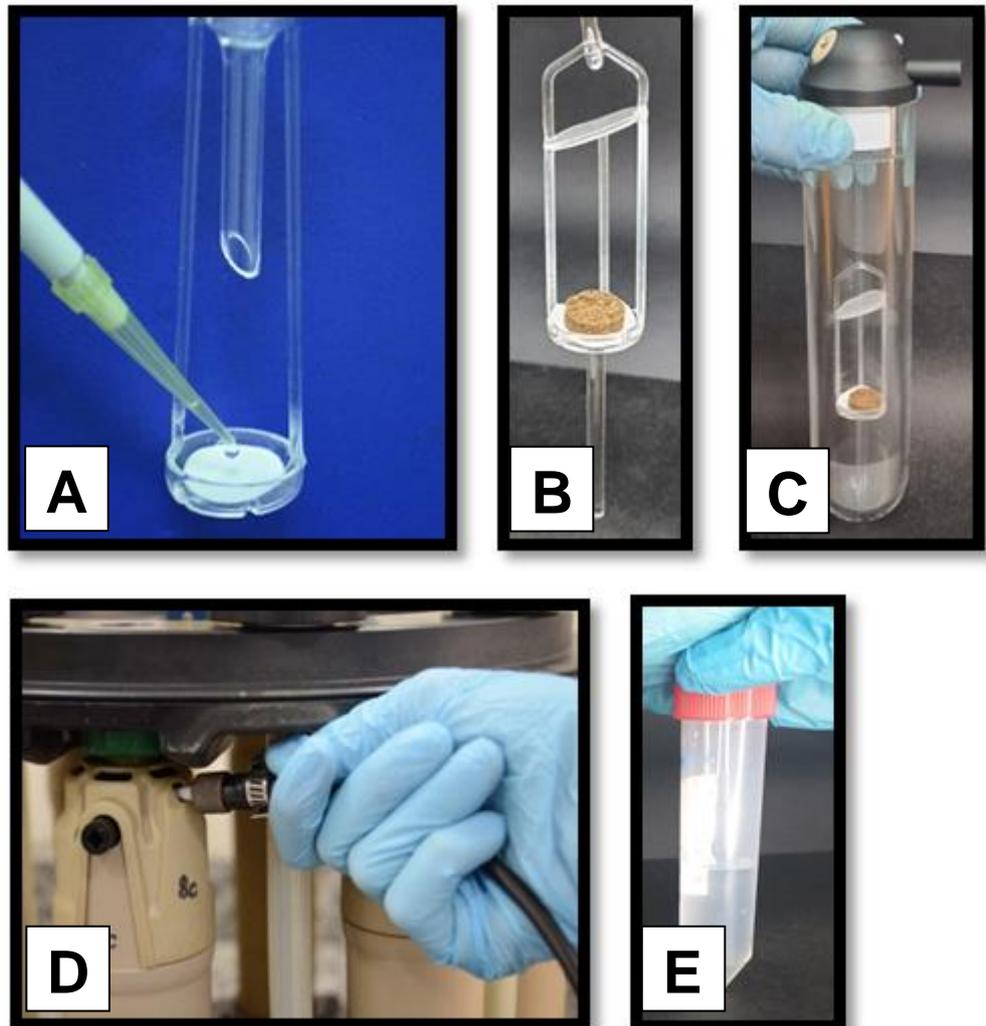
Na MAWD-UV foram otimizados os seguintes parâmetros experimentais: i) concentração de HNO_3 (de 0,5 a 3 mol L^{-1}), ii) utilização de H_2O_2 como auxiliar de decomposição e iii) utilização de 1 mL de HCl para auxiliar na recuperação dos analitos.

3.7.3 Combustão iniciada por micro-ondas

No procedimento da MIC, a amostra moída foi prensada como *pellet*. O *pellet* da amostra foi posicionado sobre o suporte de quartzo, contendo um disco de papel filtro umedecido com 50 μL de uma solução de NH_4NO_3 6 mol L^{-1} . Após esta etapa, os suportes de quartzo contendo a amostra foram inseridos nos frascos de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora. Em seguida, os frascos foram fechados, fixados no rotor e pressurizados com 20 bar de O_2 . O programa de irradiação utilizado foi o seguinte: i) 900 W por 5 min (combustão e refluxo) e ii) 0 W por 20 min (resfriamento).

Após o término do programa de irradiação e resfriamento dos frascos, o conjunto foi retirado do forno micro-ondas e a válvula de alívio dos gases foi aberta. Então, as soluções resultantes foram transferidas para frascos volumétricos e o volume de 25 mL foi completado com água. Um resumo do procedimento é mostrado na Figura 6.

Figura 5 - Procedimento realizado na MIC para a decomposição de insetos. A) Adição de NH_4NO_3 ; B) Inserção do *pellet* no suporte de quartzo; C) Inserção do suporte no frasco de quartzo; D) pressurização dos frascos com 40 bar de O_2 e E) Aspecto da solução resultante após a MIC



Na MIC foram otimizados os seguintes parâmetros experimentais: i) massa de amostra (100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg), ii) concentração de HNO_3 (5, 7, 10 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$), iii) avaliação do uso de mistura de $\text{HCl } 12 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{HNO}_3 14,4 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes proporções (1+3, 2+1 e 3+1 (v/v)) e diferentes concentrações (50, 75 e 100%), iv) avaliação da utilização de NH_4Cl (300, 400 e 500 mg) em conjunto com a amostra e v) avaliação da utilização de microcelulose cristalina como auxiliar de combustão. A determinação de REE foi feita por USN-ICP-MS.

3.8 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CARBONO E DA ACIDEZ RESIDUAL

A concentração de carbono presente nas soluções obtidas nos diferentes métodos de preparo de amostras foi determinada por ICP-OES. Para isso, as amostras foram diluídas com

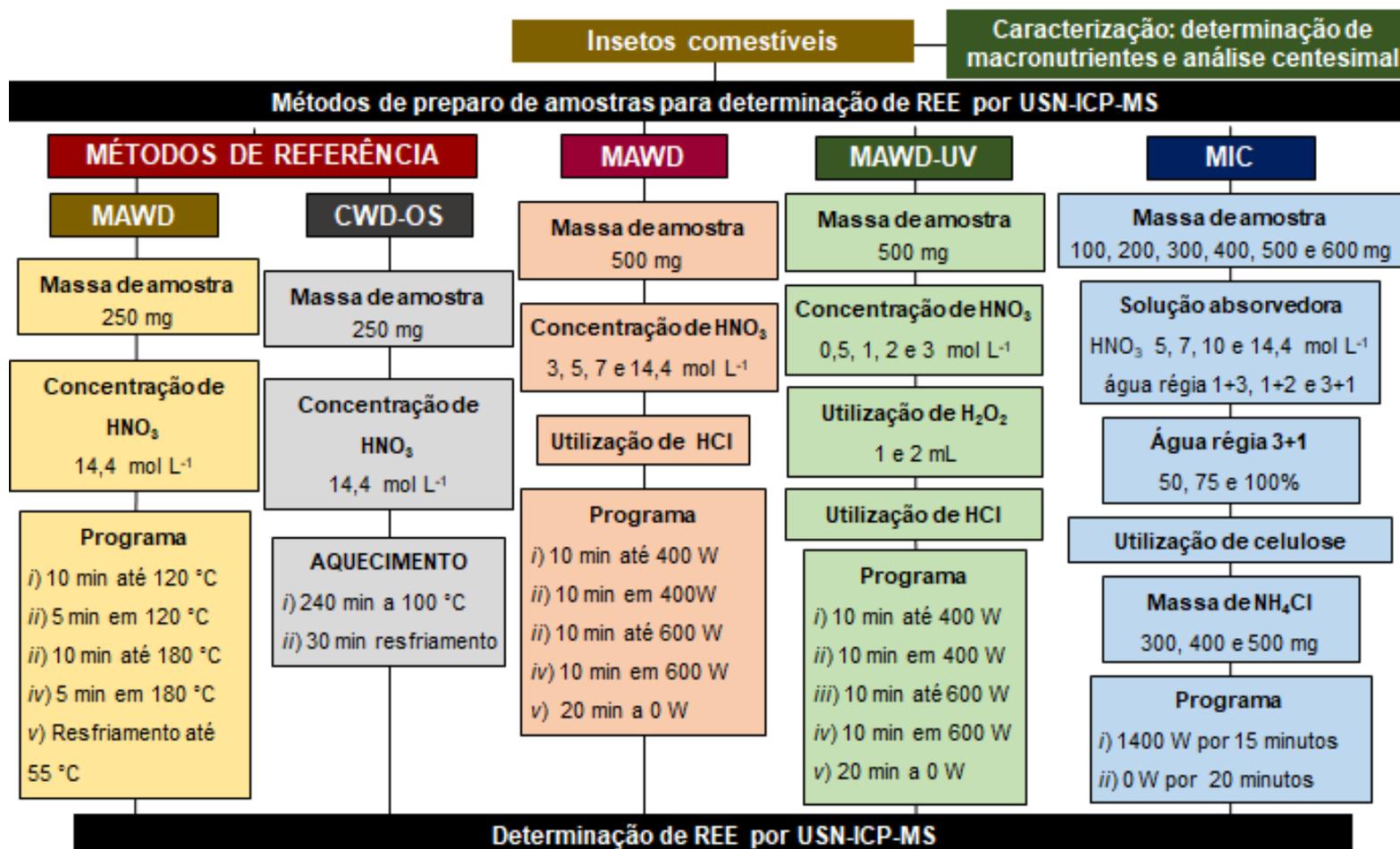
água e Y foi adicionado (nas amostras e nos padrões da curva de calibração) como padrão interno, com uma concentração final de 1 mg L^{-1} . Antes da determinação, as amostras e soluções padrões foram purgadas com $\text{Ar}_{(g)}$, em uma vazão de $0,1 \text{ L min}^{-1}$, por 2 min para eliminar os gases dissolvidos.

A determinação da acidez residual foi realizada através da titulação potenciométrica em meio aquoso. Aproximadamente 150 mg das soluções resultantes dos diferentes preparos de amostras foram diluídos em 20 mL de água ultrapura. Após, a titulação foi realizada com a utilização de uma solução de KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (previamente padronizada com biftalato de potássio) como titulante.

3.9 RESUMO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

No presente trabalho, foram investigados três métodos de preparo de amostras (MAWD com ácidos diluídos, MAWD-UV e MIC) de grilos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Na Figura 7 é apresentado um fluxograma resumindo os métodos de preparo de amostras e os parâmetros experimentais avaliados neste trabalho.

Figura 6 - Resumo dos métodos de preparo de amostras e parâmetros experimentais



MAWD: Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas.

CWD-OS: Decomposição por via úmida com aquecimento convencional em sistema aberto.

MAWD-UV: Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta.

MIC: Combustão iniciada por micro-ondas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante a avaliação dos métodos de preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Posteriormente, as principais características dos métodos otimizados serão discutidas de forma comparativa. As melhores condições foram selecionadas com base na concordância com o método de MAWD.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste trabalho foram caracterizadas quanto à composição centesimal (teor de proteínas, lipídeos, umidade, cinzas e carboidratos) e em relação à concentração de alguns macronutrientes (Ca, Na, K, Mg, Mn e Fe). Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da composição centesimal.

Tabela 8 - Composição centesimal das amostras de insetos (média \pm SD). Resultados expressos em % (g/100g)

Amostra	Proteína	Lipídios	Umidade	Cinzas	Carboidratos
A	50,8 \pm 0,02	23,9 \pm 0,39	7,75 \pm 0,13	4,59 \pm 0,03	12,9 \pm 0,34
B	57,4 \pm 0,43	15,2 \pm 0,40	10,3 \pm 0,13	4,98 \pm 0,07	12,1 \pm 0,78
C	58,2 \pm 0,93	21,3 \pm 0,94	3,92 \pm 0,06	4,16 \pm 0,09	12,4 \pm 0,20

De maneira geral, a composição centesimal dos insetos é similar, o que já era esperado por serem três amostras da mesma espécie. Como se tratam de amostras de insetos cultivados, as pequenas variações composicionais estão associadas principalmente às diferenças na composição da ração e local de cultivo ⁴⁰. Como pode ser observado na Tabela 7, as amostras são constituídas majoritariamente por proteínas (50,8 a 58,2 %), lipídeos (15,2 a 23,9 %) e carboidratos (12,1 a 12,9 %). É importante salientar que grande parte dos carboidratos presentes nos insetos estão na forma de quitina (entre 4,3 e 7,8% para grilos) ¹¹⁸, o que pode dificultar a decomposição completa das amostras durante o preparo, como citado anteriormente. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos em estudos composicionais realizados por Ordoñez-Araque et al.⁵ e por Rumpold e Schluter ¹¹⁹.

Na Tabela 9 estão apresentados os resultados obtidos na determinação de macronutrientes por ICP-OES, em mg kg⁻¹ após decomposição das amostras por MAWD. O procedimento utilizado para o preparo das amostras e para a determinação dos macronutrientes estão descritos no item 3.4 (*Materiais e métodos*).

Tabela 9 - Composição de macronutrientes nas amostras de insetos (média \pm SD, n=3)

Amostra	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ba
A	1920 \pm 46	652 \pm 43	5610 \pm 171	840 \pm 15	114 \pm 3	2260 \pm 73	8,66 \pm 0,45
B	1510 \pm 14	490 \pm 3	7840 \pm 50	1080 \pm 11	44,7 \pm 0,8	2160 \pm 35	4,72 \pm 0,13
C	1160 \pm 97	56,0 \pm 4	7540 \pm 329	908 \pm 34	15,0 \pm 1,5	3350 \pm 196	< 0,11

Resultados expressos em mg kg⁻¹

Observa-se uma considerável variação na concentração de alguns elementos nas amostras, como Fe (56 a 652 mg kg⁻¹), K (5610 a 7840 mg kg⁻¹), Mn (15 a 114 mg kg⁻¹) e Na (2160 a 3350). A amostra “A” apresentou as maiores concentrações de Ca (1920 mg kg⁻¹), Fe (652 mg kg⁻¹), Mn (114 mg kg⁻¹) e Ba (8,66 mg kg⁻¹). A amostra “B” apresentou maiores concentrações de K (7840 mg kg⁻¹) e Mg (1080 mg kg⁻¹). Já a amostra “C” apresentou a maior concentração de Na (3350 mg kg⁻¹). De acordo com Payne et al.⁴⁰, em insetos cultivados o perfil mineral pode sofrer alterações principalmente por diferenças na composição da ração.

Também pode ser observado que, dos macronutrientes determinados, o K é o majoritário nas três amostras, seguido por Na e Ca. Esta mesma relação de concentração pode ser observada nos resultados apresentados por Rumpold e Schluter¹¹⁹ para amostras da mesma espécie (*Acheta domesticus*).

É importante salientar que altas concentrações de elementos facilmente ionizáveis, como Na e K, podem alterar as características do plasma do ICP-MS, podendo causar interferências na etapa de determinação¹²⁰. Conforme relatado por Druzian¹¹⁰, em concentrações superiores a 50 mg L⁻¹ de Na e K podem ser observados efeitos de supressão de intensidade do sinal para os REE. A concentração de K em solução nas amostras A, B e C correspondem a, aproximadamente, 112, 157 e 151 mg L⁻¹, respectivamente (considerando a massa de amostra e o volume de aferição utilizados no método de preparo). Portanto, para evitar possíveis interferências por altas concentrações de K na etapa de determinação por USN-ICP-MS, uma diluição de no mínimo 4 vezes para as amostras “B” e “C” e de 3 vezes para a amostra “A” se faz necessária. Considerando individualmente a concentração de Na, somente a amostra C necessita de uma diluição prévia de 2 vezes (concentração de Na em solução de aproximadamente 67 mg L⁻¹).

Com relação às interferências causadas por Ba na etapa de determinação de REE com a técnica de ICP-MS, alguns trabalhos relatam possíveis interferências poliatômicas pela formação de óxidos e hidróxidos^{113,115}. Segundo Pereira¹⁶, concentrações de Ba acima de 150 μ g L⁻¹ podem causar interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS. Cabe ressaltar

que somente as amostras A e B apresentaram concentrações de Ba acima do LOQ ($0,11 \text{ mg kg}^{-1}$), sendo que a amostra A apresenta a maior concentração (aproximadamente 173 mg L^{-1} em solução), necessitando uma diluição mínima de 2 vezes previamente à determinação de REE por USN-ICP-MS. Para a amostra B, interferências quanto à presença de Ba são praticamente desprezíveis.

4.2 DETERMINAÇÃO DE REE EM INSETOS APÓS MAWD E CWD-OS (OBTENÇÃO DE VALORES DE REFERÊNCIA)

Para a obtenção de valores de referência, dois métodos de preparo de amostras adaptados de trabalhos prévios foram utilizados ^{55,73}. Os procedimentos estão descritos no item 3.6 (Materiais e métodos). Os resultados obtidos para em ambos os métodos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de referência para REE obtidos por USN-ICP-MS após a decomposição das amostras por MAWD e CWD-OS (média \pm SD, n=3)

Elemento	Concentração, ng g ⁻¹					
	Amostra A		Amostra B		Amostra C	
	MAWD	CWD-OS	MAWD	CWD-OS	MAWD	CWD-OS
Y	389 \pm 16	372 \pm 23	251 \pm 10	223 \pm 12	< 82*	< 88*
La	727 \pm 46	785 \pm 200	452 \pm 32	< 585*	< 145*	< 585*
Ce	1350 \pm 55	1370 \pm 140	843 \pm 72	860 \pm 57	< 169*	< 540*
Pr	173 \pm 9	159 \pm 21	97,9 \pm 9,1	106 \pm 5	< 23*	< 93*
Nd	608 \pm 26	582 \pm 72	374 \pm 25	339 \pm 15	< 58*	< 131*
Sm	136 \pm 14	123 \pm 19	< 71*	< 76*	< 71*	< 76*
Eu	31,8 \pm 4,4	< 62*	14,1 \pm 0,8	< 62*	1,54 \pm 0,27	< 62*
Gd	120 \pm 7	< 142*	62,4 \pm 2,5	< 142*	5,19 \pm 1	< 142*
Tb	28,4 \pm 3,9	26,1 \pm 1,1	7,57 \pm 0,30	6,93 \pm 0,4	< 6,1*	< 6,6*
Dy	86,2 \pm 4,7	< 78*	38,8 \pm 1,6	< 78*	4,40 \pm 0,76	< 78*
Ho	23,2 \pm 4,1	24,9 \pm 1,8	8,16 \pm 0,29	< 7,2*	< 4,6*	< 7,2*
Er	48,6 \pm 7,3	47,7 \pm 7,7	22,8 \pm 0,8	20,9 \pm 0,9	< 3,9*	< 6,9*
Tm	22,7 \pm 3,3	19,9 \pm 7,6	< 3,9*	< 4,7*	< 3,9*	< 4,7*
Yb	29,6 \pm 1,2	32,1 \pm 6	16,5 \pm 1,3	18,9 \pm 1,5	< 5,6*	< 15*
Lu	16,9 \pm 2,9	15,1 \pm 0,7	< 8,4*	< 9,5*	< 8,4*	< 9,5*

*LOQ obtido por USN-ICP-MS

Como pode ser observado na Tabela 10, de maneira geral, a amostra A (grilo da China) apresentou as maiores concentrações de REE, a amostra B (grilo do Brasil) apresentou concentrações intermediárias e a amostra C (grilo da Tailândia) apresentou as menores concentrações de REE. Estes resultados podem estar associados à exploração e mineração de REE, onde a China se destaca como o maior produtor mundial destes elementos ¹²¹.

Não houve diferença significativa (teste *t-student*, 95% de confiança) entre os valores obtidos após MAWD e CWD-OS. Porém, devido aos altos teores de carbono nos digeridos ($> 7000 \text{ mg L}^{-1}$), o método CWD-OS apresentou LOQs elevados em comparação com a MAWD, impossibilitando a quantificação de Eu, Gd e Dy na amostra A, La, Sm, Eu, Gd, Dy, Ho, Tm e Lu na amostra B e todos os analitos na amostra C. A presença de concentrações relativamente altas de carbono em solução pode causar interferências espectrais e não-espectrais na etapa de determinação por ICP-MS^{19,82}. Desta forma, foi necessário empregar um fator de diluição mínimo de 30 vezes nas amostras após a CWD-OS, aumentando consideravelmente os LOQs do método. Na MAWD os teores de C em solução foram um pouco menores (de 3419 a 3072 mg L^{-1}). Portanto, um menor fator de diluição (20 vezes) foi necessário, resultando em melhores LOQs. Portanto, por permitir a comparação de um maior número de analitos considerando todas as amostras, a MAWD foi escolhida como método de referência para a comparação dos resultados.

4.3 AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRAS PARA A POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE REE EM INSETOS POR USN-ICP-MS

Para a avaliação dos métodos de preparo de amostra propostos no presente trabalho, foi selecionada, arbitrariamente, a amostra “A”.

Durante a otimização dos métodos propostos (MAWD, MIC e MAWD-UV) procurou-se condições com baixas concentrações de ácido e C residual, parâmetros diretamente ligados às interferências na etapa de determinação por ICP-MS. Ademais, quando possível, buscou-se procedimentos que proporcionassem alta frequência analítica e que fossem de fácil execução. A eficiência de decomposição dos métodos foi avaliada através da determinação do teor de C e acidez nos digeridos.

4.3.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas

No presente trabalho, o método de MAWD foi investigado para a decomposição de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-IPC-MS, tendo como objetivo a utilização de soluções ácidas mais diluídas em comparação com o método de referência ($\text{HNO}_3 14,4 \text{ mol L}^{-1}$).

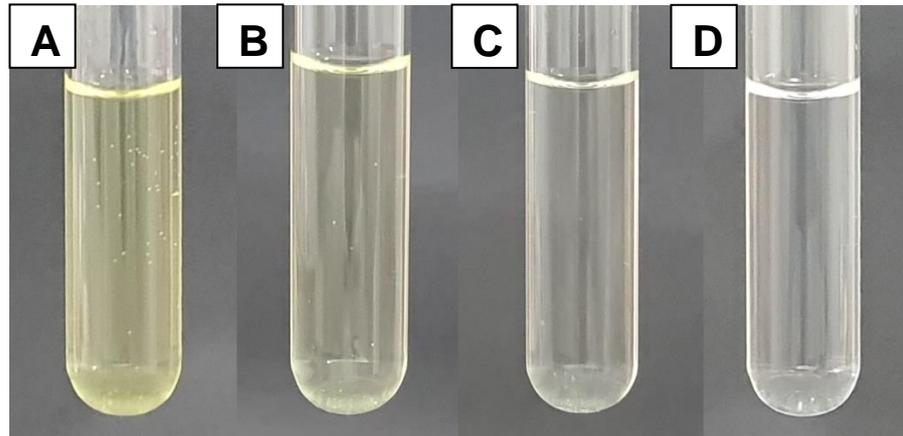
É importante salientar que não foram encontrados na literatura trabalhos utilizando MAWD com soluções ácidas diluídas para a posterior determinação de REE em amostras de insetos.

Para a otimização da concentração de HNO_3 (3 a 7 mol L^{-1}) foram utilizados 500 mg de amostra. Para isso, frascos de quartzo foram usados, pois suportam uma pressão interna maior (80 bar) em relação aos frascos de PTFE –TFM utilizados pelo método de referência (35 bar), permitindo a utilização de uma maior massa de amostra. Os sistemas de digestão que permitem o uso de massas de amostras relativamente altas devem ser considerados quando os analitos estão presentes em baixas concentrações. Além disso, o uso de massas maiores pode reduzir problemas de heterogeneidade de algumas amostras ¹²². O programa de radiação utilizado foi adaptado de um trabalho prévio ¹⁵ está descrito na Tabela 6 (*Materiais e Métodos*). Além da concentração de HNO_3 também foi avaliada a utilização de 1 mL de HCl para auxiliar na recuperação dos REE.

4.3.1.1 Avaliação da concentração de HNO_3

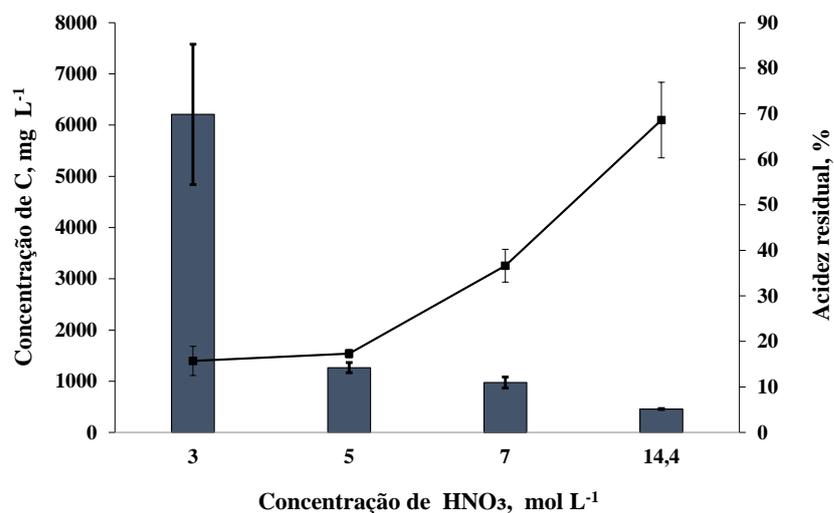
Altos teores de acidez nos digeridos podem causar interferências que acarretam na supressão de sinal durante a etapa de determinação por ICP-MS, necessitando sucessivas diluições dos digeridos e por consequência o aumento dos LOQs ^{20,22}. Além disso, a utilização de soluções ácidas diluídas colabora com os princípios da química “verde”, diminuindo a geração de resíduos e custos do método. Neste sentido, foi avaliada a utilização de HNO_3 diluído (de 3 a 7 mol L^{-1}) como solução de decomposição na MAWD. Adicionalmente, para fins de comparação dos resultados, a concentração de 14,4 mol L^{-1} também foi utilizada. Na Figura 8 é possível observar os aspectos dos digeridos após a avaliação de diferentes concentrações de HNO_3 .

Figura 7 - Aspecto dos digeridos obtidos após MAWD em frascos de quartzo usando: A) 3 mol L⁻¹, B) 5 mol L⁻¹, C) 7 mol L⁻¹ e D) 14,4 mol L⁻¹



Na Figura 8 pode-se verificar que quanto menor a concentração de ácido utilizada, mais amarelada ficou a colocação do digerido. Quando as concentrações de 5 e 7 mol L⁻¹ foram utilizadas, os digeridos apresentaram colorações levemente amareladas. Porém, quando foi utilizada a concentração de 3 mol L⁻¹ o digerido apresentou uma coloração fortemente amarelada e um aspecto mais viscoso. Posteriormente, a concentração de C e acidez residual foram determinadas nos digeridos e os resultados podem ser observados na Figura 9.

Figura 8 - Concentração de C (barras) e acidez residual (linha) nos digeridos obtidos após MAWD. Condições: 500 mg de amostra e 6 mL de HNO₃ em diferentes concentrações



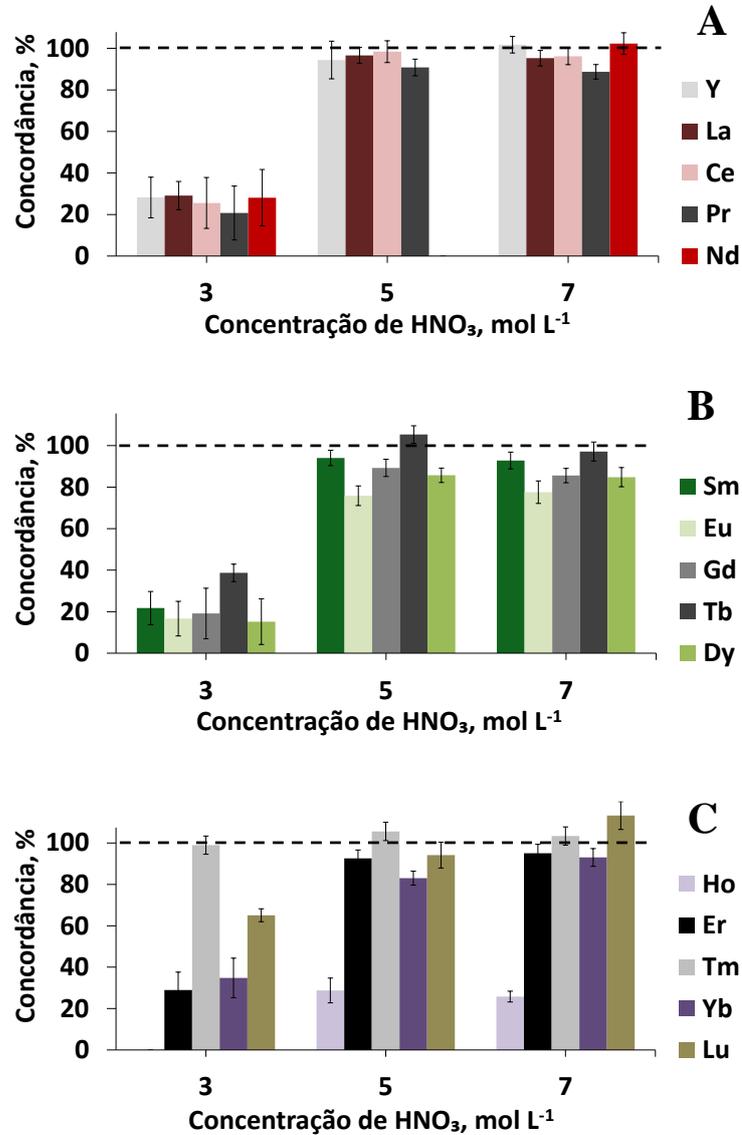
Conforme o esperado, a concentração de carbono nos digeridos diminuiu com o aumento da concentração de HNO₃. Quando usada a concentração de 3 mol L⁻¹ de HNO₃ o carbono nos digeridos aumentou consideravelmente (6208 mg L⁻¹) em comparação com as outras condições (458 a 1265 mg L⁻¹), o que já era esperado pela coloração amarelada apresentada pelo digerido. Ainda, a condição de 3 mol L⁻¹ de HNO₃ apresentou maiores valores

de RSD para C (22%), quando comparado com as demais condições (2 a 11%). Por outro lado, a concentração residual de HNO_3 diminuiu proporcionalmente à diminuição da concentração de HNO_3 inicial, com uma redução de cerca de 77% de $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ para 3 mol L^{-1} . Os valores de acidez residual apresentados nas 4 condições foram de 15, 17, 37 e 69% para 3, 5, 7 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, que correspondem aos respectivos valores de acidez final: 0,1, 0,2, 0,6 e $2,3 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 .

De acordo com resultados obtidos em trabalho anterior¹¹⁰, digeridos com concentrações acima de 1000 mg L^{-1} de C apresentam interferências na determinação de REE por USN-ICP-MS, enquanto que para HNO_3 , foi comprovado que concentrações de até $1,4 \text{ mol L}^{-1}$ não apresentam supressão no sinal dos REE na etapa de determinação por USN-ICP-MS¹²³. Neste aspecto, o uso do nebulizador ultrassônico se torna importante, visto que grande parte do ácido é removido durante o processo de dessolvatação, diminuindo os efeitos de supressão de sinal causados HNO_3 , quando em comparação com o nebulizador concêntrico⁸⁷.

Nesse sentido, somente a condição com 7 mol L^{-1} de HNO_3 possibilitaria a determinação direta dos REE, sem a necessidade de uma etapa de diluição, pois menores concentrações de HNO_3 (3 e 5 mol L^{-1}) apresentaram digeridos com concentrações de carbono $> 1000 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto que a maior concentração de HNO_3 ($14,4 \text{ mol L}^{-1}$) apresentou acidez final do digerido $> 1,4 \text{ mol L}^{-1}$. No entanto, como citado anteriormente, devido às altas concentrações de K, os digeridos devem ser diluídos de 3 a 4 vezes para evitar efeitos de supressão de sinal causados pela presença deste elemento em concentrações acima de 50 mg L^{-1} . Portanto, nesse caso, pode-se considerar que a concentração de K nas amostras é o fator limitante para determinar a diluição utilizada. Porém, métodos que utilizam ácidos diluídos apresentam a vantagem de serem ambientalmente mais amigáveis, além de proporcionarem menores brancos e por consequência, menores LOQs. Nesse sentido, foram realizadas as determinações de REE na amostra “A” nos digeridos obtidos após a utilização das concentrações de 3, 5 e 7 mol L^{-1} de HNO_3 como solução de decomposição. Os resultados estão expressos em concordância com o método de referência na Figura 10.

Figura 9 - Concordância entre o método proposto e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução de decomposição



Na Figura 10 pode ser observado que quando foi utilizada a concentração de 3 mol L^{-1} a concordância (exceto para Tm, 99%) foi extremamente baixa, entre 15 (Dy) e 65% (Lu) e com altos RSDs para a maioria dos elementos (até 72%, para Dy). Além disso, para Ho o resultado ficou abaixo de LOQ (0,8 ng L^{-1}). Esses resultados podem ser explicados pela baixa eficiência de decomposição apresentada nessa condição (teor de C > 6000 mg L^{-1}), pois a amostra não foi totalmente decomposta e os analitos não foram totalmente liberados em solução. Como citado anteriormente, as amostras de grilos apresentam teores de quitina relativamente altos (entre 4,3 e 7,1%)¹¹⁸, o que pode dificultar a completa decomposição da amostra quando ácidos diluídos são utilizados.

Os resultados obtidos para as concentrações de 5 e 7 mol L⁻¹ foram semelhantes. Altos valores de RSD foram obtidos para Ho (21% para 5 mol L⁻¹ e 33% para 7 mol L⁻¹). Já para os demais analitos, RSDs relativamente baixos foram obtidos (entre 4% (Gd) e 10% (Y) quando a concentração de 5 mol L⁻¹ foi utilizada e entre 4% (Gd) e 7% (Eu) quando a concentração de 7 mol L⁻¹ foi utilizada). Concordâncias entre 90 e 110% com o método de referência foram obtidas para parte dos REE (Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Gd, Tb, Er, Tm e Lu), porém para Eu, Gd, Dy e Ho ambas as condições apresentaram concordâncias abaixo de 90%. Ademais, com 5 mol L⁻¹ se obteve uma concordância de 83% para Yb.

É sabido que os REE formam óxidos com facilidade e podem formar compostos estáveis, como óxidos ternários, com outros metais, impossibilitando a solubilização completa dos REE na solução de decomposição¹¹⁰. As baixas concentrações obtidas para Eu, Gd, Dy e Ho podem ser explicadas pela formação destes compostos refratários na parede dos frascos de quartzo quando HNO₃ diluído é utilizado.

Em um trabalho anterior, Bulska et al.¹²⁴ relacionaram erros negativos na determinação dos REE em CRMs de plantas por ICP-MS à presença de Si na matriz dos CRMs (entre 0,4 e 0,6%). Segundo os autores, pequenas partículas de sílica formadas durante a decomposição das amostras poderiam estar adsorvendo os REE. Em amostras com baixo teor de Si (cerca de 0,06%) o fenômeno não foi observado. Após a utilização de HF para decompor as partículas de sílica e a separação de Si por cromatografia iônica, os resultados dos REE se adequaram aos valores certificados, comprovando a adsorção dos REE pelas micropartículas de sílica. com base naquele trabalho, foi realizada a determinação de Si nas amostras de insetos por ICP-OES. As amostras A e B apresentaram Si em sua composição (561 ± 34 mg kg⁻¹ e 817 ± 41 mg kg⁻¹, respectivamente). Porém, as concentrações de Si, relativamente baixas, possivelmente não são suficientes para promover a adsorção dos REE.

O HCl é conhecido por apresentar maior eficiência que ácidos oxidantes na solubilização de muitos óxidos metálicos, transformando-os em cloretos solúveis²³, como já demonstrado em trabalhos prévios^{110,125}. Dessa forma, com o objetivo de aumentar a solubilidade dos REE, foi testada a utilização de HCl na solução de decomposição.

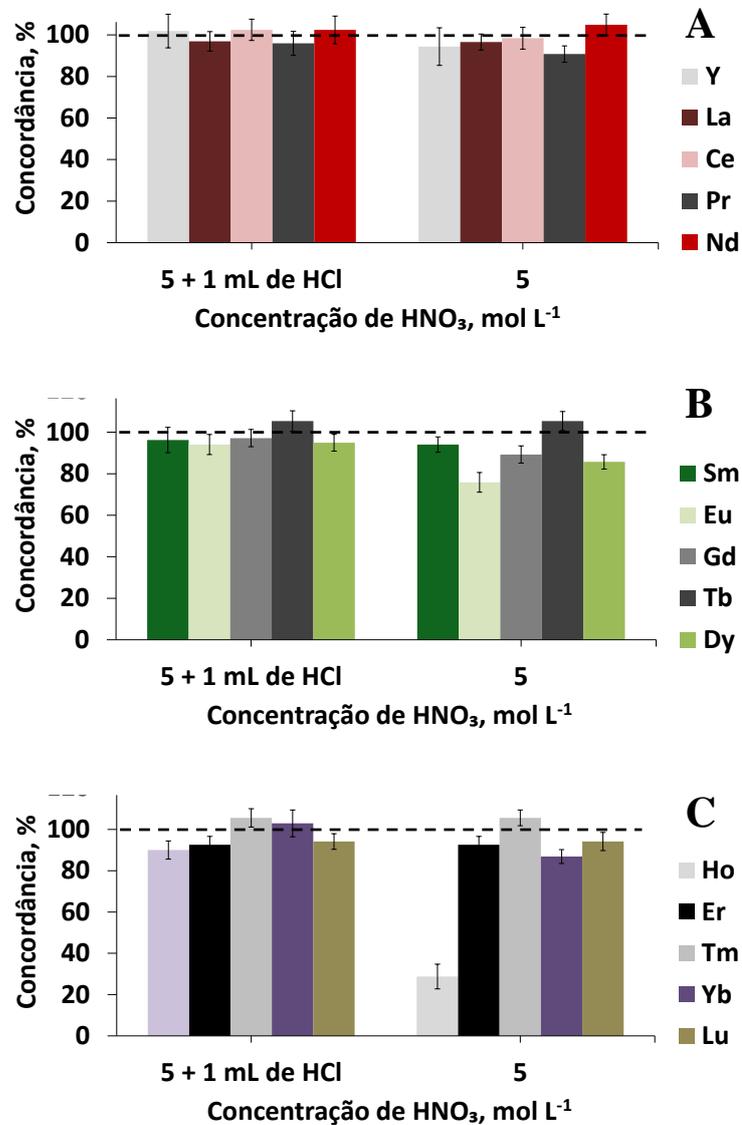
4.3.1.2 Avaliação do uso de HCl

O HCl pode auxiliar a formação de compostos solúveis durante o processo de decomposição das amostras, evitando a formação de compostos refratários e auxiliando na

solubilização completa dos REE na solução de decomposição. Além disso, o íon cloreto atua complexando diversos íons metálicos, auxiliando na retenção desses íons em solução ²³.

Assim, com o objetivo de aumentar a concordância com os valores de referência para Dy, Eu, Gd e Ho, foi adicionado 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹ juntamente à solução de decomposição. Para isso, optou-se por utilizar a condição com a solução de decomposição de HNO₃ 5 mol L⁻¹, no intuito de priorizar a utilização de soluções diluídas, mas considerando também os resultados obtidos na determinação de C nos digeridos. Os resultados estão expressos na Figura 11 na forma de concordância com os resultados obtidos pelo método de referência.

Figura 10 - Concordância entre o método proposto e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) usando 5 mol L^{-1} de HNO_3 com e sem o emprego de 1 mL de HCl 12 mol L^{-1} para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução de decomposição



Como pode ser observado na Figura 11, a utilização de 1 mL de HCl proporcionou um significativo aumento nos valores de concordância para Dy (de 86 para 95%), Eu (de 76 para 94%), Gd (de 89 para 97%), Ho (de 29 para 89%) e Yb (de 87 para 103%). Também pode ser observado um aumento nas concentrações de outros elementos, como Y, La, Ce, Pr, Nd e Sm. Com isso, as concordâncias com o método de referência ficaram entre 90% (Ho) e 106% (Tm). Além disso, os RSDs para Ho melhoraram significativamente (de 21 para 45%). Os demais RSDs permaneceram abaixo de 10%.

Os resultados obtidos demonstram que a presença de HCl na solução de decomposição teve um importante papel facilitando a solubilização dos analitos, evitando a formação de compostos insolúveis, como já demonstrado em trabalhos prévios ^{125,126}. Com isso, 6 mL de HNO₃ 5 mol L⁻¹ + 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹ foi escolhida como a solução de decomposição ideal para o preparo de amostras de insetos por MAWD para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. É importante salientar que apesar de elevar a acidez dos digeridos finais, o HCl não apresenta o mesmo efeito que o HNO₃ na etapa de determinação dos REE. Como já demonstrado em trabalho anterior ¹¹⁰, as mudanças nas propriedades físicas das soluções na presença de até 30% HCl não são suficientes para modificar a formação do aerossol pelo USN. Portanto, a utilização de 1 mL de HCl não implica em um maior fator de diluição dos digeridos antes da etapa de determinação. Dessa forma, a determinação de REE nos digeridos obtidos pela MAWD com HNO₃ diluído (método proposto) pôde ser realizada com a utilização de um fator de diluição de apenas 3 vezes (diluição mínima necessária para contornar interferências na etapa de determinação, causadas pela concentração de K presente nas amostras, como mencionado anteriormente).

4.3.1.3 Avaliação da exatidão da MAWD com solução ácida diluída

Após a otimização da solução de decomposição de MAWD para a posterior determinação de REE em insetos por USN-ICP-MS, avaliou-se a exatidão do método. Para isso, empregou-se o CRM BCR-668, que foi submetido ao preparo de amostra por MAWD e a determinação dos REE realizada por USN-ICP-MS. Na Tabela 11 estão expressos os valores certificados e os resultados obtidos após a decomposição por MAWD utilizando o método proposto para Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Er, Tm e Lu. Para Ho e Yb o material não apresenta valores certificados, somente valores indicativos.

Tabela 11 - Concentração dos REE no CRM BCR-668 obtidos por USN-ICP-MS após MAWD (método proposto) e valores certificados, em ng g⁻¹ (média ± SD, n=3)

Analito	MAWD	Valor certificado
Y	60,5 ± 4,2	59 ± 5
La	79,5 ± 3,9	80 ± 6
Ce	93,2 ± 3,8	89 ± 7
Pr	11,6 ± 0,5	12,3 ± 1,1
Nd	54,7 ± 2,3	54 ± 4
Sm	12,2 ± 0,6	11,2 ± 0,8
Eu	2,91 ± 0,12	2,79 ± 0,16
Gd	12,6 ± 0,6	13 ± 0,6
Tb	1,89 ± 0,15	1,62 ± 0,12
Dy	8,15 ± 0,34	8,9 ± 0,6
Ho	1,91 ± 0,10	1,8 ± 0,6
Er	4,12 ± 0,18	4,5 ± 0,5
Tm	< 0,84*	0,48 ± 0,08
Yb	2,67 ± 0,14	2,8 ± 0,5
Lu	< 0,52*	0,389 ± 0,024

*LOQ obtido por USN-ICP-MS

Não houve diferença significativa entre os valores obtidos pelo método proposto e os valores certificados (teste t-student, 95% de confiança) para Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er e Yb, demonstrando que a MAWD com ácidos diluídos é adequada para o preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Os elementos Tm e Lu apresentaram valores abaixo de LOQ e não puderam ser quantificados pelo método proposto. Vale destacar que apesar da utilização de 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹, LOQs do método proposto ficaram abaixo dos valores do método de referência, o que pode ser explicado pelo menor volume de HNO₃ utilizado e pelo menor fator de diluição utilizado antes da etapa de determinação.

4.3.1.4 Aplicação da MAWD com ácidos diluídos na decomposição de amostras de insetos

Após a otimização da solução de decomposição da MAWD para a decomposição de insetos, foi realizada a determinação de REE nas amostras utilizadas no presente estudo. Na Tabela 12 estão apresentados os resultados obtidos para as amostras “A”, “B” e “C”.

Tabela 12 - Determinação de REE em insetos após MAWD (método proposto). Resultados em ng g⁻¹ (média ± SD, n=3)

Analito	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Y	396 ± 32	251 ± 12	54,5 ± 8,6
La	704 ± 34	482 ± 54	75,7 ± 4,4
Ce	1390 ± 70	904 ± 101	81,1 ± 5,6
Pr	166 ± 10	104 ± 6	7,28 ± 0,28
Nd	623 ± 41	380 ± 30	27,9 ± 1,9
Sm	131 ± 8	64,9 ± 3,5	< 7,6*
Eu	29,9 ± 1,5	14,9 ± 1,3	1,63 ± 0,70
Gd	117 ± 1	66,1 ± 6,8	5,25 ± 0,18
Tb	29,9 ± 1,1	7,02 ± 0,84	< 0,46*
Dy	81,8 ± 2,9	43,6 ± 2,6	4,36 ± 0,09
Ho	20,6 ± 0,6	8,27 ± 0,72	< 0,37*
Er	45,0 ± 0,9	21,4 ± 1,1	< 0,17*
Tm	23,9 ± 0,2	1,38 ± 0,16	1,47 ± 0,55
Yb	30,5 ± 1,9	16,8 ± 0,5	2,9 ± 0,14
Lu	15,1 ± 1,0	2,44 ± 0,31	< 0,52*

*LOQ obtido por USN-ICP-MS

Como pode ser observado na Tabela 12, a utilização de uma solução de decomposição diluída possibilitou a quantificação de Sm, Tm e Lu na amostra “B” (grilo do Brasil) e de Y, La, Ce, Pr, Nd e Yb na amostra “C” (grilo da Tailândia), que ficaram abaixo do LOQ do método de referência. Além do método proposto possibilitar uma menor diluição das amostras antes da etapa de determinação dos analitos por USN-ICP-MS (quando comparado ao método de referência), o menor volume de ácido utilizado proporcionou menores valores de branco e consequentemente também influenciou na obtenção de menores LOQs. Além disso, a possibilidade de utilização de uma maior massa de amostra (500 mg) em comparação com a massa utilizada no método de referência (250 mg) também foi um fator importante para

proporcionar a diminuição dos LOQs do método proposto. Os analitos Sm, Tb, Ho, Er e Lu ainda apresentaram valores abaixo do LOQ para a amostra C.

4.3.2 Decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas e ultravioleta

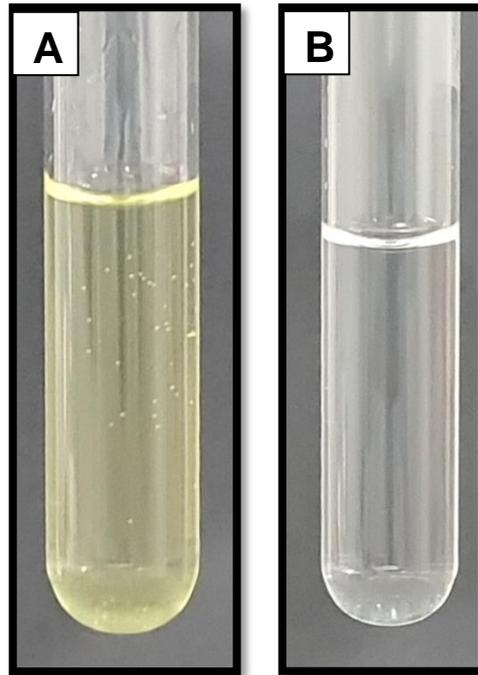
O método de MAWD-UV foi avaliado para o preparo de amostras de grilos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS, com o objetivo de utilização de soluções ácidas mais diluídas em comparação com o método de MAWD proposto (HNO_3 5 mol L⁻¹ + 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹). O procedimento e programa de radiação utilizados na MAWD-UV estão descritos no item 3.7.1 (*Materiais e Métodos*).

No método de MAWD-UV, utilizou-se uma massa de amostra de 500 mg e a avaliação da concentração de HNO_3 (2 e 3 mol L⁻¹) foi realizada. Em uma segunda etapa foram avaliadas as utilizações de H_2O_2 e de HCl como auxiliares na decomposição das amostras.

4.3.2.1 Avaliação da concentração de HNO_3

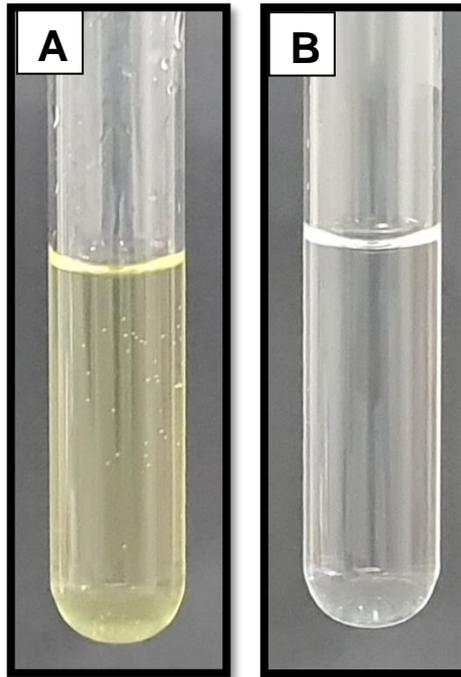
Como mencionado anteriormente, o uso simultâneo da radiação micro-ondas e UV permite a utilização de soluções de decomposição mais diluídas em comparação com o método de MAWD. Nesse viés, as concentrações de HNO_3 de 2 e 3 mol L⁻¹ foram avaliadas como solução de decomposição para o método de MAWD-UV. Na Figura 12 pode ser observado o aspecto dos digeridos.

Figura 11 - Aspecto dos digeridos obtidos após MAWD-UV usando HNO_3 : A) 2 mol L^{-1} e B) 3 mol L^{-1}



Como pode ser observado na Figura 12, quando a concentração de HNO_3 de 2 mol L^{-1} foi utilizada, o digerido apresentou um aspecto amarelado e mais viscoso, demonstrando uma menor eficiência de decomposição. Porém, quando a concentração de HNO_3 foi aumentada para 3 mol L^{-1} o digerido apresentou um aspecto límpido. Na Figura 13 pode ser observada uma comparação entre os digeridos da MAWD e da MAWD-UV com a mesma concentração de HNO_3 (3 mol L^{-1}). É possível observar através da coloração dos digeridos que a MAWD-UV apresentou uma melhor eficiência de decomposição, o que já era esperado. Isso ocorre porque na presença de agentes oxidantes (ex. HNO_3) a radiação UV promove a formação de radicais livres que proporcionam a oxidação sucessiva das moléculas orgânicas até a forma de CO_2 ²³.

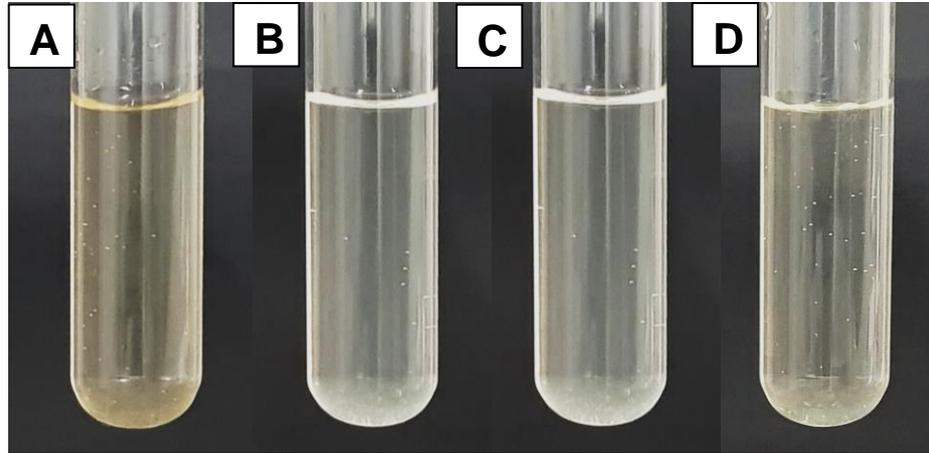
Figura 12 – Aspecto dos digeridos com 3 mol L⁻¹ do método: A) MAWD e B) MAWD-UV



No intuito de diminuir ainda mais a concentração de HNO₃, avaliou-se a utilização de H₂O₂ como auxiliar na decomposição das amostras por MAWD-UV. Além de atuar como uma fonte de O₂, quando exposto à radiação UV o H₂O₂ se decompõe em radicais hidroxila, que são altamente reativos e responsáveis por iniciar uma cadeia de reações que degradam e convertem a matéria orgânica presente na amostra a CO₂. Além disso, o H₂O₂ atua no processo de regeneração do HNO₃, contribuindo na manutenção da concentração e viabilizando a utilização de soluções diluídas de HNO₃ na decomposição de amostras^{23,127}. Diante disso, com a finalidade de reduzir a concentração de HNO₃ sem comprometer a eficiência de decomposição das amostras, foram avaliadas combinações de 1 e 2 mL de H₂O₂ e HNO₃ 0,5, 1 e 2 mol L⁻¹.

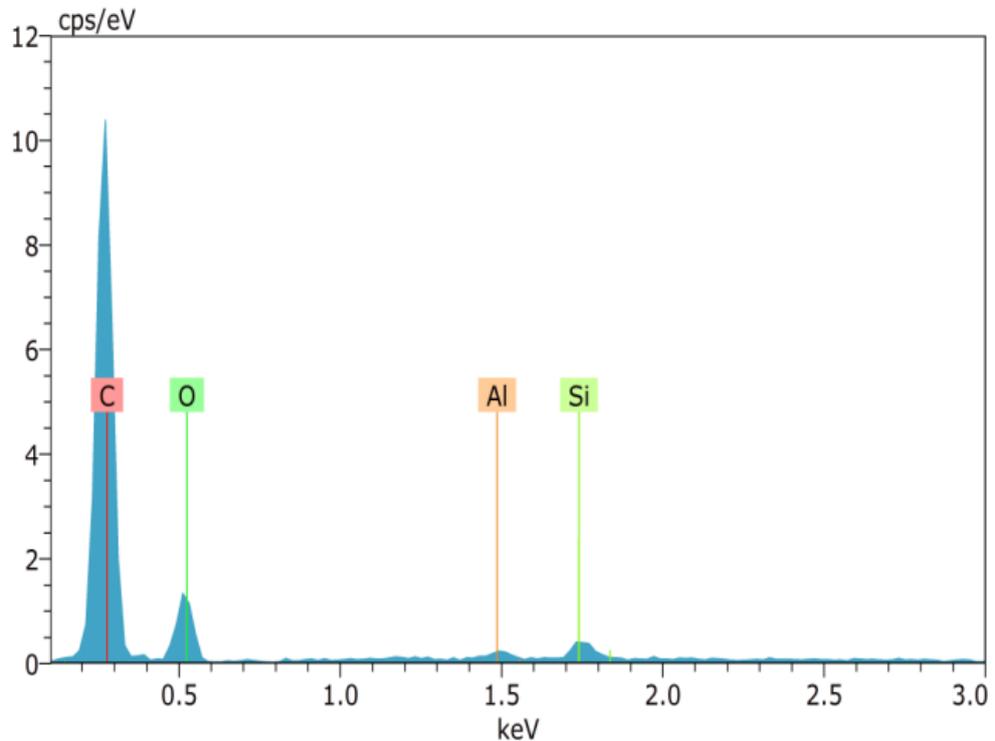
Na Figura 14 podem ser observados os aspectos dos digeridos após MAWD-UV com a utilização de diferentes combinações de H₂O₂ e HNO₃ como solução de decomposição.

Figura 13 – Aspecto dos digeridos após MAWD-UV com a utilização de combinações de H_2O_2 e HNO_3 como soluções de decomposição nas seguintes condições: A) HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ + 2 mL de H_2O_2 , B) HNO_3 1 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2 , C) HNO_3 2 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2 e D) HNO_3 2 mol L^{-1} + 1 mL de H_2O_2



De acordo com a Figura 14, as únicas combinações que promoveram um digerido límpido foram com a associação de HNO_3 2 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2 e HNO_3 1 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2 . A utilização de somente 1 mL de H_2O_2 não foi o suficiente para melhorar a eficiência de decomposição quando 2 mol L^{-1} de HNO_3 foram utilizados, promovendo um digerido amarelado, como mostrado na Figura 14 (D). Também pode ser observado na Figura 14 (A) que quando a concentração de HNO_3 foi reduzida para $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a decomposição da amostra não foi completa, restando material particulado dentro do frasco de decomposição. O resíduo obtido foi então coletado e levado para análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo de espectroscopia de energia dispersiva (EDS). A composição do resíduo pode ser observada na Figura 15.

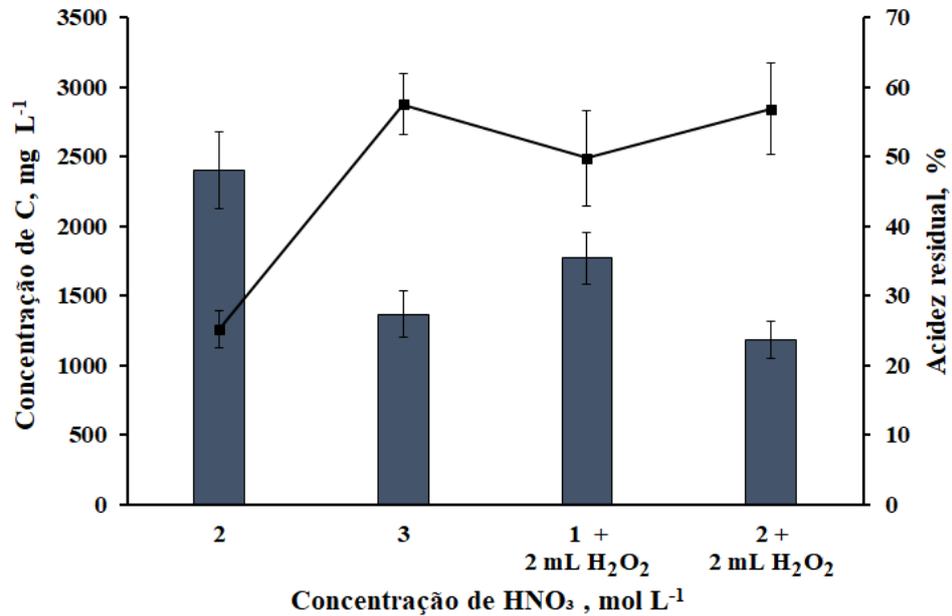
Figura 14 - Espectro de energia dispersiva do resíduo remanescente da decomposição incompleta da amostra "A".



A presença de carbono no resíduo foi verificada no espectro de EDS, comprovando a presença de constituintes orgânicos (por exemplo, quitina) que não foram completamente decompostos. Quando a amostra não está completamente decomposta, resultados imprecisos podem ser obtidos na etapa de determinação, pois os analitos podem não ser totalmente solubilizados²³. Além disso, a presença de partículas sólidas na amostra pode ser um problema na etapa de determinação pela técnica ICP-MS, pois pode causar obstruções no nebulizador e nos capilares do sistema de introdução da amostra. Adicionalmente, também pode ocorrer deposição de carbono nos cones de amostragem e skimmer, aumentando a periodicidade de manutenção do equipamento¹²⁸.

Após as avaliações da concentração de HNO_3 na solução de decomposição e do uso de H_2O_2 foi possível separar 3 condições que obtiveram digeridos com aspectos límpidos e sem a presença de material particulado (15 mL de HNO_3 3 mol L^{-1} , 15 mL de HNO_3 2 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2 e 15 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} + 2 mL de H_2O_2). A eficiência de decomposição das 3 condições foi então avaliada através da determinação de carbono em solução e acidez residual dos digeridos. A concentração de carbono e a acidez residual da condição com a solução de HNO_3 2 mol L^{-1} sem a presença de H_2O_2 também foram avaliadas para fins de comparação. Os resultados estão expressos na Figura 16.

Figura 15 - Concentração de C (barras) e acidez final (linha) nos digeridos obtidos após MAWD-UV. Condições: 500 mg de amostra e 15 mL de HNO_3 em diferentes concentrações, com e sem 2 mL de H_2O_2

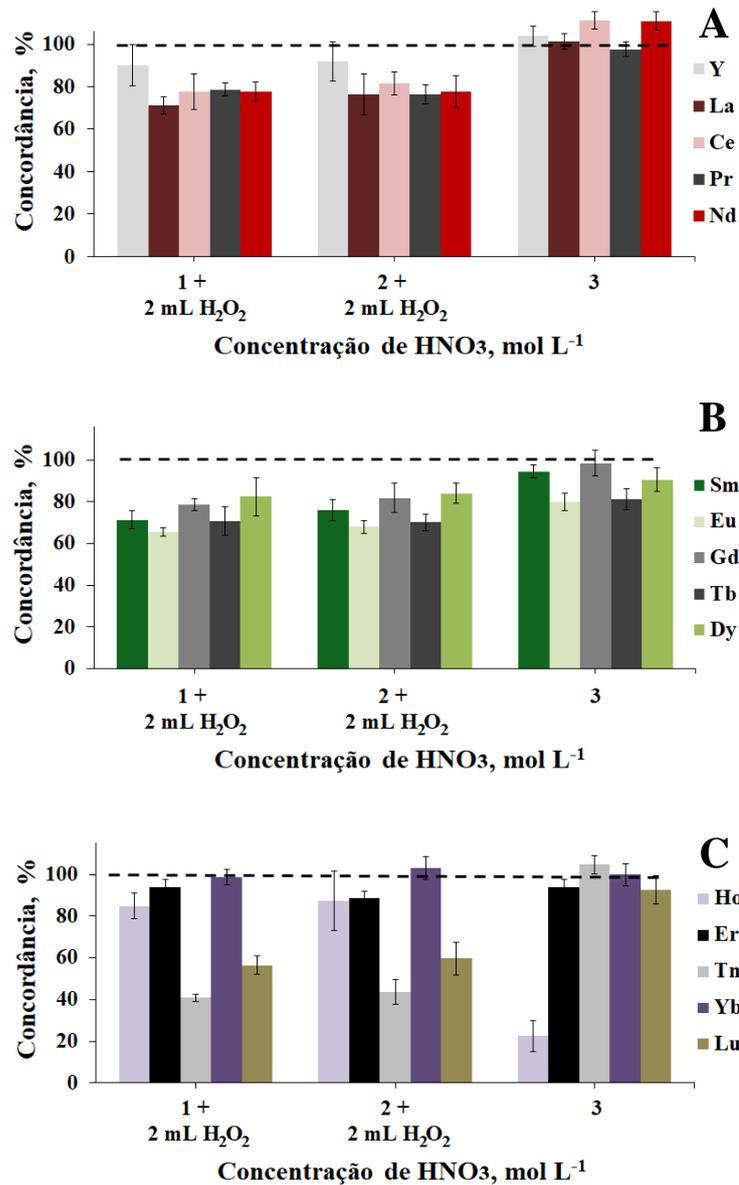


Como pode ser observado na Figura 16, a condição com maior concentração de C (2403 mg L^{-1}) foi com 2 mol L^{-1} de HNO_3 sem a presença de H_2O_2 , o que já era esperado devido ao aspecto da solução. Quando 2 mL de H_2O_2 foram adicionados à solução de decomposição, a concentração de C nos digeridos diminuiu aproximadamente 49%, comprovando o aumento da eficiência de decomposição pela ação do H_2O_2 . Ainda, quando o H_2O_2 foi utilizado, pode ser observado que a acidez residual aumentou significativamente, o que pode ser atribuído à regeneração do HNO_3 na presença de H_2O_2 .

Comparando a concentração de carbono quando 3 mol L^{-1} de HNO_3 foram utilizados na MAWD-UV e na MAWD (consultar Figura 9), observa-se uma diminuição de cerca de 80%, comprovando que a ação simultânea das radiações UV e micro-ondas promove uma maior eficiência de decomposição, possibilitando a utilização de soluções ácidas mais diluídas.

A acidez residual dos digeridos foi de 25, 58, 50 e 57% para as condições com 2 mol L^{-1} de HNO_3 , 3 mol L^{-1} de HNO_3 , 1 mol L^{-1} de $\text{HNO}_3 + 2 \text{ mL H}_2\text{O}_2$ e 2 mol L^{-1} de $\text{HNO}_3 + 2 \text{ mL H}_2\text{O}_2$, respectivamente, que correspondem aos respectivos valores de acidez final: 0,27, 0,79, 0,26 e 0,54 mol L^{-1} . De maneira geral, as três condições que obtiveram digeridos com aspectos límpidos (6 mL de HNO_3 3 mol L^{-1} , 6 mL de HNO_3 $2 \text{ mol L}^{-1} + 2 \text{ mL de H}_2\text{O}_2$ e 6 mL de HNO_3 $1 \text{ mol L}^{-1} + 2 \text{ mL de H}_2\text{O}_2$) apresentaram concentrações de carbono e de acidez final relativamente baixas. Portanto, foram realizadas as determinações de REE na amostra "A" nas três condições. Os resultados estão expressos em concordância com o método de referência na Figura 17.

Figura 16 - Concordância entre o método proposto (MAWD-UV) e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) usando diferentes soluções de decomposição (1 mol L^{-1} de HNO_3 + 2 mL de H_2O_2 , 2 mol L^{-1} de HNO_3 + 2 mL de H_2O_2 e 3 mol L^{-1} de HNO_3) para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 15 mL de solução de decomposição.

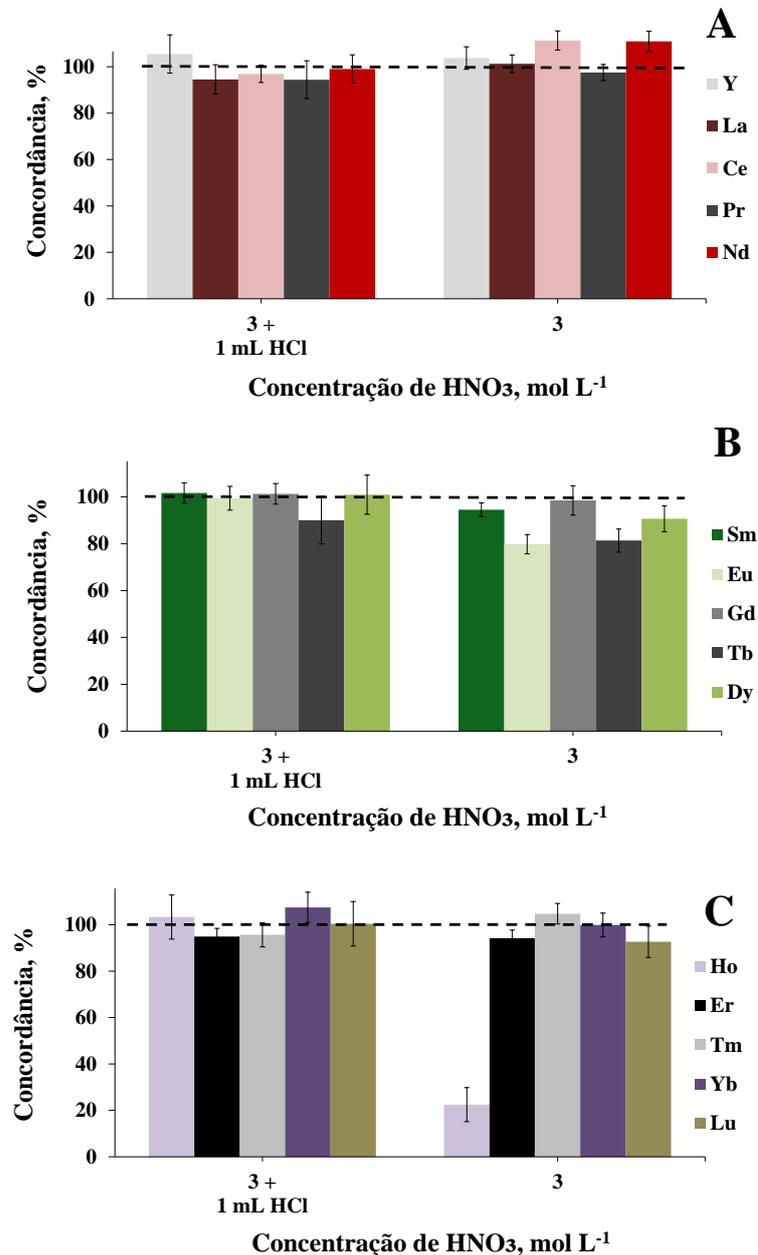


Como pode ser observado na Figura 17, a condição que apresentou maiores concordâncias para os REE foi com a utilização 3 mol L^{-1} de HNO_3 . Embora a utilização de H_2O_2 tenha aumentado à eficiência de decomposição, as duas outras condições apresentaram concordâncias abaixo de 90% para grande parte dos REE. A primeira condição (1 mol L^{-1} de HNO_3 + 2 mL de H_2O_2) obteve concordâncias superiores a 90% somente para Er (94%) e Tb

(99%). Os demais REE apresentaram concordâncias entre 41% (Tm) e 90% (Y), com valores de RSD entre 4% (Tm) e 12% (Ce). A segunda condição (2 mol L⁻¹ de HNO₃ + 2 mL de H₂O₂) apresentou concordâncias similares com a primeira, com valores entre 44% (Tm) e 103% (Yb) e com valores de RSD entre 5% (Tb) e 18,8% (Sm).

Quando terceira condição foi utilizada (3 mol L⁻¹ de HNO₃) foram obtidas concordâncias entre 91 e 110% para grande parte dos analitos (Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Gd, Dy, Er, Tm, Yb e Lu). Porém, a concordância ficou abaixo de 90% para Eu (80%), Tb (81%) e Ho (22%). Um efeito similar ao que foi observado no método de MAWD pode ter evitado a solubilização completa destes analitos em solução. Além disso, a decomposição do H₂O₂ em O₂ pode ter auxiliado na formação de óxidos durante a decomposição das amostras, facilitando a formação de compostos pouco solúveis. Nesse viés, a adição de 1 mL de HCl na solução de decomposição também foi testada. Para isso, a condição com HNO₃ 3 mol L⁻¹ foi utilizada por apresentar os maiores valores de concordância entre as condições avaliadas. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 18 em forma de concordância com os resultados obtidos pelo método de referência.

Figura 17 - Concordância entre o método proposto (MAWD-UV) e o método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}) usando 3 mol L^{-1} de HNO_3 com e sem o emprego de 1 mL de HCl 12 mol L^{-1} para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 15 mL de solução de decomposição



Assim como ocorreu na MAWD, a utilização de 1 mL de HCl promoveu um significativo aumento na concentração de alguns analitos, aumentando os valores de concordância com o método de referência. O aumento de concordância mais pronunciado novamente foi para o Ho (de 22 para 103%). De maneira geral, nessa condição foram obtidas concordâncias entre 90 (Tb) e 107% (Yb) e RSDs entre 4% (Tb) e 10,3% (Nd).

Os resultados obtidos confirmam que o HCl, por ser um agente complexante, promove a solvatação dos REE, garantindo uma maior solubilização desses elementos em solução, promovendo uma recuperação quantitativa. Portanto, a mistura de HNO_3 3 mol L^{-1} e 1 mL de HCl 12 mol L^{-1} foi escolhida como solução de decomposição ideal para a o preparo de amostras de insetos por MAWD-UV para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS.

4.3.2.2 Avaliação da exatidão do método de MAWD-UV

Para a avaliação da exatidão da MAWD-UV com a solução de decomposição que obteve os melhores resultados (HNO_3 3 mol L^{-1} + 1 mL de HCl) foi utilizado o CRM BCR-668, que foi submetido ao preparo pelo método otimizado e a determinação dos REE realizada por USN-ICP-MS. Os valores certificados e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 13. Para Ho e Yb o material não apresenta valores certificados, somente valores indicativos

Tabela 13 - Concentração dos REE no CRM BCR-668 obtidos por USN-ICP-MS após MAWD-UV (método proposto) e valores certificados, em ng g⁻¹ (média ± SD, n=3)

Analito	MAWD-UV	Valor certificado
Y	54,2 ± 4,6	59 ± 5
La	76,0 ± 5,4	80 ± 6
Ce	93,0 ± 4,0	89 ± 7
Pr	13,9 ± 1,3	12,3 ± 1,1
Nd	57,4 ± 5,9	54 ± 4
Sm	11,9 ± 0,9	11,2 ± 0,8
Eu	2,87 ± 0,12	2,79 ± 0,16
Gd	13,2 ± 1,4	13,0 ± 0,6
Tb	1,58 ± 0,07	1,62 ± 0,12
Dy	8,35 ± 0,59	8,9 ± 0,6
Ho	2,08 ± 0,19	1,8 ± 0,6
Er	4,35 ± 0,38	4,5 ± 0,5
Tm	< 0,90*	0,48 ± 0,08
Yb	3,08 ± 0,19	2,8 ± 0,5
Lu	< 1,4*	0,389 ± 0,024

* LOQ do método

Os valores apresentados na Tabela 12 indicam que o método proposto (MAWD-UV) é adequado para ser utilizado como preparo de amostras para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Não houve diferença significativa entre os valores certificados e os valores obtidos (teste t-student, 95% de confiança). Assim como na MAWD, os valores obtidos para Lu e Tm ficaram abaixo de LOQ, impossibilitando a quantificação destes elementos. Além disso, apesar da utilização de HNO₃ mais diluído, os LOQs de maneira geral ficaram mais altos que os obtidos na MAWD (método proposto), o que pode ser explicado pelo volume maior de solução utilizada para a decomposição das amostras (15 mL na MAWD-UV e 6 mL na MAWD), com conseqüente maior volume de HNO₃. Este volume foi necessário para cobrir a superfície da lâmpada UV, evitando a perda de parte da radiação da lâmpada e o conseqüente baixo aproveitamento da radiação UV²³. Além disso, as lâmpadas ficam em contato direto com a solução de decomposição, o que também contribui para a obtenção de maiores valores de brancos. É importante salientar que assim como ocorreu na MAWD com ácidos diluídos (método proposto), para contornar interferências causadas presença de elevada concentração de

K nas amostras, foi necessário o emprego de uma diluição mínima de 3 vezes nos digeridos obtidos após a MAWD-UV antes da etapa de determinação dos analitos por USN-ICP-MS.

4.3.2.3 Aplicação da MAWD-UV na decomposição de amostras de insetos

Após a otimização da solução de decomposição da MAWD-UV para a decomposição de insetos, foi realizada a determinação de REE nas amostras utilizadas no presente estudo. Na Tabela 14 estão apresentados os resultados obtidos para as amostras “A”, “B” e “C”.

Tabela 14 - Determinação de REE em insetos após MAWD-UV (método proposto). Resultados expressos em ng g^{-1} (média \pm SD, n=3)

Analito	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Y	410 \pm 25	267 \pm 19	52,9 \pm 2,1
La	687 \pm 37	453 \pm 18	75,7 \pm 7,5
Ce	1300 \pm 100	873 \pm 54	86,4 \pm 5,2
Pr	164 \pm 15	97,5 \pm 12,4	7,21 \pm 0,54
Nd	602 \pm 62	363 \pm 28	27,6 \pm 1,1
Sm	138 \pm 13	69,7 \pm 6,8	< 8,7*
Eu	31,5 \pm 2,6	12,7 \pm 0,7	1,49 \pm 0,60
Gd	122 \pm 7	60,8 \pm 3,4	5,11 \pm 0,25
Tb	25,6 \pm 1,0	7,57 \pm 0,87	< 0,57*
Dy	86,9 \pm 5,4	41,9 \pm 4,2	4,86 \pm 0,19
Ho	23,9 \pm 1,0	9,16 \pm 0,92	< 0,37*
Er	46,2 \pm 1,8	24,4 \pm 1,0	< 0,26*
Tm	21,7 \pm 1,2	1,46 \pm 0,15	1,67 \pm 0,49
Yb	31,8 \pm 2,6	16,4 \pm 1,2	2,75 \pm 0,12
Lu	16,2 \pm 0,7	2,75 \pm 0,18	< 1,4*

* LOQ do método

Como pode ser observado na Tabela 13, apesar de apresentar maiores LOQs quando comparado ao método de MAWD proposto, os únicos analitos que não puderam ser quantificados após a decomposição das amostras por MAWD-UV foram Sm, Tb, Ho, Er e Lu na amostra C. Ademais, os resultados são condizentes com os resultados obtidos através da aplicação do método de referência (MAWD com HNO_3 14,4 mol L^{-1}), demonstrando que o

método de MAWD-UV proposto é adequado para o preparo de amostras para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS.

4.3.3 Combustão iniciada por micro-ondas

O uso da MIC como método de preparo de amostras para a posterior determinação de halogênios e metais (incluindo REE) já é bem estabelecido na literatura. Proposto por Barin¹⁰⁵, este método tem sido aplicado no preparo de amostras para a determinação de diferentes tipos de analitos (incluindo REE)^{106,107}. Apesar de já ter sido aplicado para outros tipos de amostras biológicas^{94,110}, não foi encontrada na literatura nenhuma aplicação da MIC no preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE. Quanto ao uso para outros tipos de amostras e posterior determinação de REE, aplicações com utilizações de soluções ácidas diluídas¹⁶ e com água régia¹¹⁰ como solução absorvedora foram encontradas na literatura.

A MIC é conhecida por apresentar alta eficiência de decomposição de matrizes orgânicas, com RCC geralmente abaixo de 1%, dependendo da natureza da amostra, possibilitando, na maioria das vezes, a utilização de soluções absorvedoras diluídas¹⁰⁸. Dessa forma, no presente trabalho, a MIC foi investigada para a decomposição de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. A amostra “A” foi utilizada para a realização de todas as otimizações.

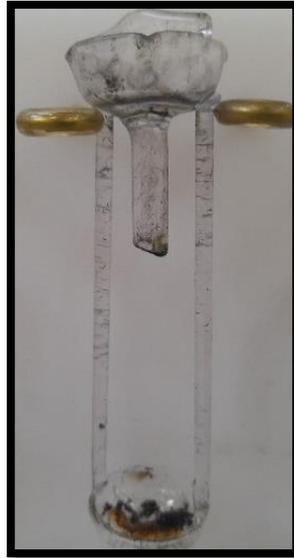
4.3.3.1 Avaliação da massa de amostra

O primeiro parâmetro avaliado na MIC foi a massa de amostra. Para isso, massas de amostra de 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg foram utilizadas, no intuito de avaliar a massa máxima de amostra possível de ser decomposta pelo método. As avaliações foram feitas de forma visual e através do monitoramento da pressão máxima atingida no interior do frasco durante a queima.

Quando foram utilizados até 500 mg de amostra a combustão ocorreu completamente, atingindo uma pressão máxima de aproximadamente 40 bar (metade do valor máximo recomendado pelo fabricante do forno de micro-ondas). Porém, quando 600 mg de amostra foram utilizados, a queima da amostra foi incompleta, com restos de fuligem presentes no interior do frasco e no suporte de quartzo, que podem ser observados na Figura 19. Dessa maneira, a condição com 500 mg de amostra foi selecionada. É importante salientar que nessa

condição o teor de carbono após a MIC foi inferior a $18,8 \text{ mg L}^{-1}$, comprovando a alta eficiência de decomposição da amostra.

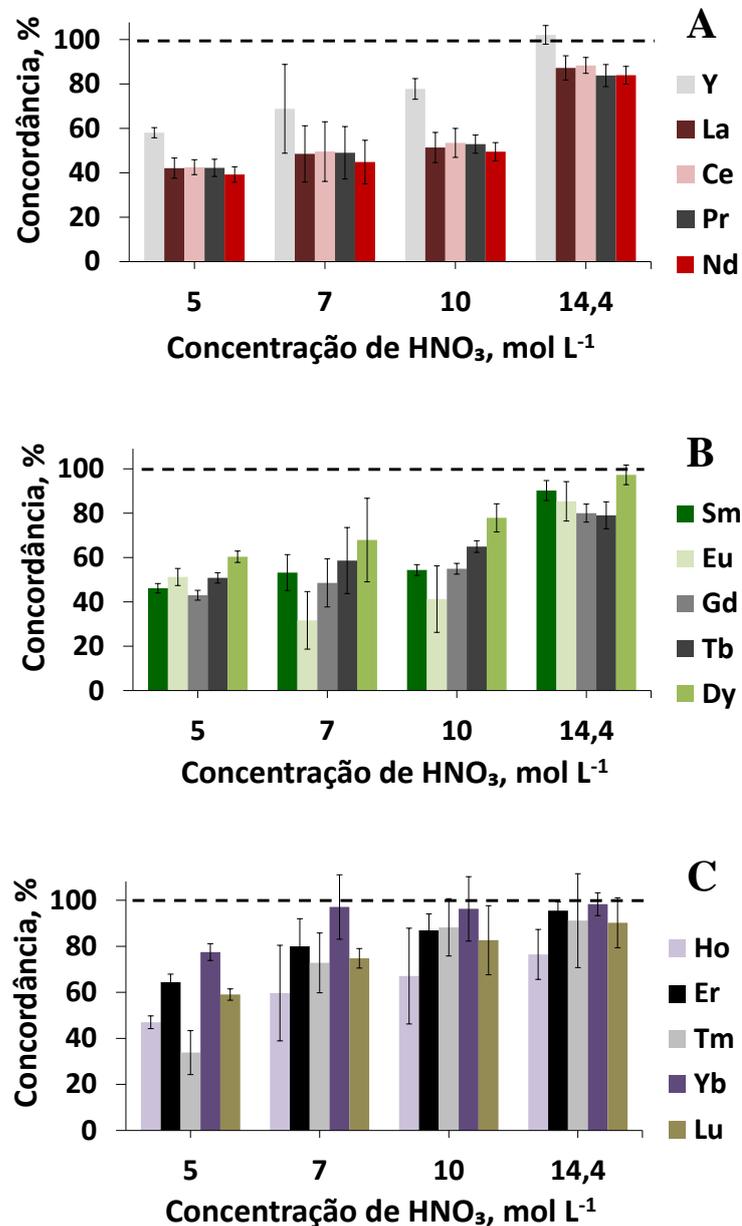
Figura 18 – Suporte de quartzo após queima incompleta na MIC utilizando 600 mg de amostra



4.3.3.2 Avaliação da concentração de HNO_3 na solução absorvedora

Na MIC, a solução de absorvedora é responsável por absorver os analitos após a etapa de combustão da amostra. Como citado anteriormente, por ser um método de combustão, a MIC se destaca por proporcionar decomposições mais eficientes quando comparada com métodos tradicionais de decomposição de amostras, como a MAWD, permitindo, na maioria das vezes, a utilização de soluções diluídas para absorver os analitos. Com base nessa informação, no presente trabalho foram avaliadas 4 concentrações de HNO_3 como solução absorvedora (5, 7, 10 e $14,4 \text{ mol L}^{-1}$). Os resultados, expressos em concordância com o método de referência, podem ser visualizados na Figura 20.

Figura 19 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$) usando diferentes concentrações de HNO_3 como solução absorvedora para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora.

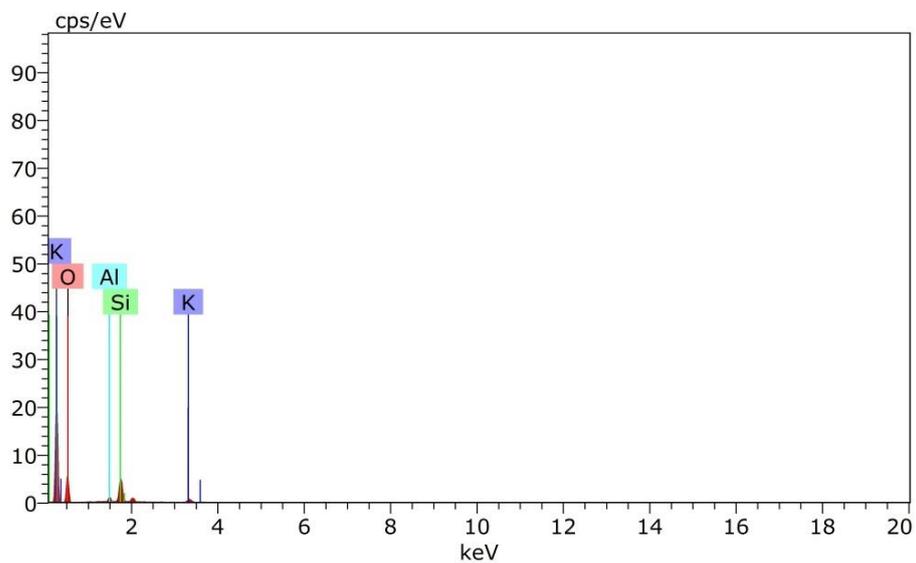


De acordo com os resultados expressos na Figura 20, as concordâncias dos REE com o método de referência aumentaram proporcionalmente ao aumento da concentração de HNO_3 . Porém, mesmo quando a concentração de $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada, as concordâncias para alguns analitos ficaram baixas, variando de 76% (Ho) para 102% (Y). Além disso, independente da concentração utilizada, foram observados resíduos da queima no suporte de quartzo. Esses resultados condizem com resultados obtidos em um trabalho anterior, onde o autor explica que os REE, por formarem cátions, geralmente trivalentes, volumosos e estáveis, tendem a formar

óxidos ternários na superfície do suporte de quartzo, o que pode explicar as baixas concentrações obtidas em comparação com o método de referência ¹¹⁰.

Visando elucidar quais compostos estavam sendo formados no suporte de quartzo, foi realizada a análise do resíduo presente nos suportes por microscopia eletrônica de varredura (MEV) no modo EDS (espectroscopia por energia dispersiva). Os resultados podem ser avaliados na Figura 21.

Figura 20 – Resultados da análise do resíduo da MIC por MEV-EDS



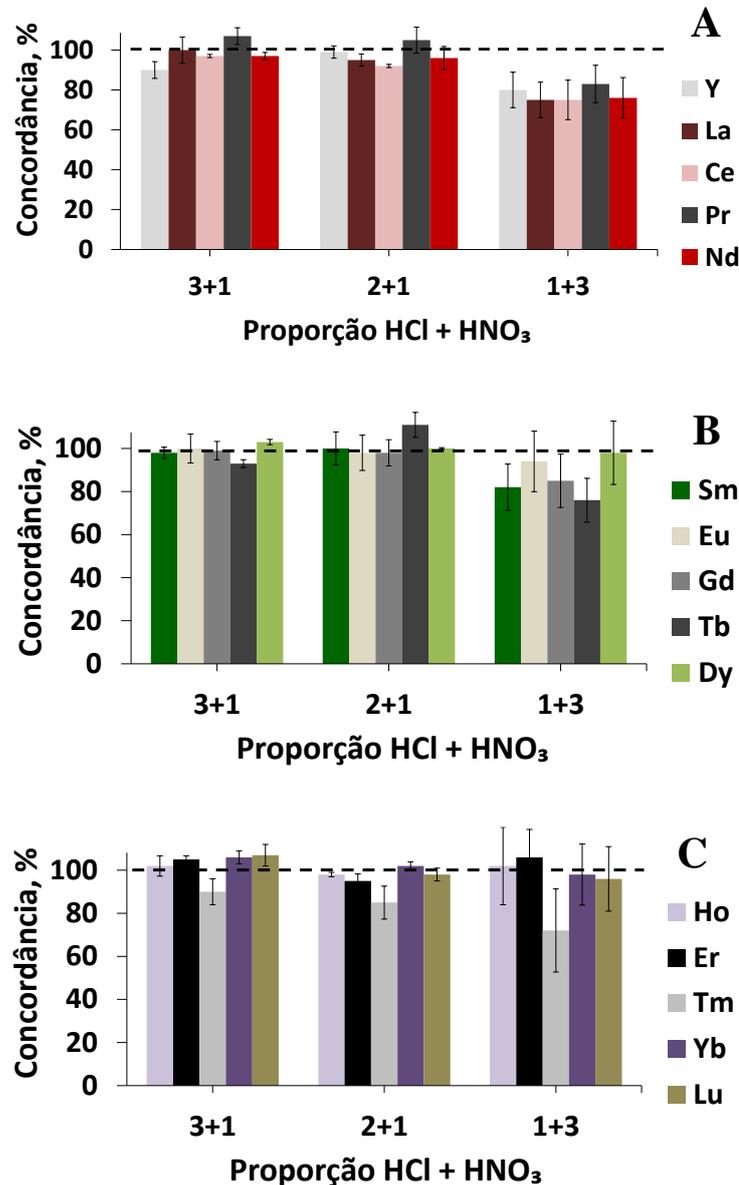
Conforme a Figura 21, pode ser observado na análise por MEV-EDS a presença de Si e Al no resíduo do suporte de quartzo. Estes elementos podem interagir com os REE através da formação de óxidos ternários, do tipo $M_3M'(XO_4)_3$, onde M e M' são normalmente cátions di e triplos positivos e X pode ser Si, Al, Ga e Ge ¹²⁹. Possivelmente a formação destes compostos na superfície do suporte de quartzo dificultou a solubilização completa dos REE na solução absorvedora, semelhantemente ao efeito observado em trabalho anterior ¹¹⁰.

Para determinar o percentual de Si que ficou aderido ao suporte de quartzo, foi realizada a determinação de Si nos digeridos após a MIC e MAWD. Os resultados obtidos após a MIC ficaram abaixo de LOQ para todas as concentrações de HNO₃ avaliadas. Porém, os digeridos obtidos após MAWD apresentaram a concentração de $860 \pm 42,8 \mu\text{g L}^{-1}$ de Si. Com isso, pode-se concluir que 100% do Si presente na amostra ficou aderido ao suporte e nas paredes do frasco de quartzo.

4.3.3.3 Avaliação da utilização de HCl na solução absorvedora

Como citado anteriormente, o HCl auxilia na formação de compostos solúveis, além de ser um forte complexante, podendo auxiliar na retenção dos REE na solução absorvedora após a etapa de combustão e durante a etapa de refluxo²³. Portanto, diferentes proporções de HCl + HNO₃ foram avaliadas como soluções absorvedoras (3+1, 2+1 e 1+3), mantendo o volume de solução em 6 mL. Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 22.

Figura 21 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO₃ 14,4 mol L⁻¹) usando diferentes proporções de HCl + HNO₃ como solução absorvedora para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora.



Como pode ser observado na Figura 22, a proporção 1 + 3 (HCl + HNO₃) não foi o suficiente para aumentar os valores de concordância com o método de referência. Além disso, nessa condição foram obtidos altos valores de RSD. Porém, com o aumento da concentração de HCl em relação ao HNO₃ (2 + 1 e 3 + 1), os RSDs diminuíram consideravelmente e as concordâncias com o método de referência aumentaram. Quando a proporção 2 + 1 foi utilizada, concordâncias entre 85% (Tm) e 105% (Yb) foram obtidas. Já quando a proporção 3 + 1 foi utilizada, as concordâncias variaram entre 90% (Tm e Y) e 107% (Pr).

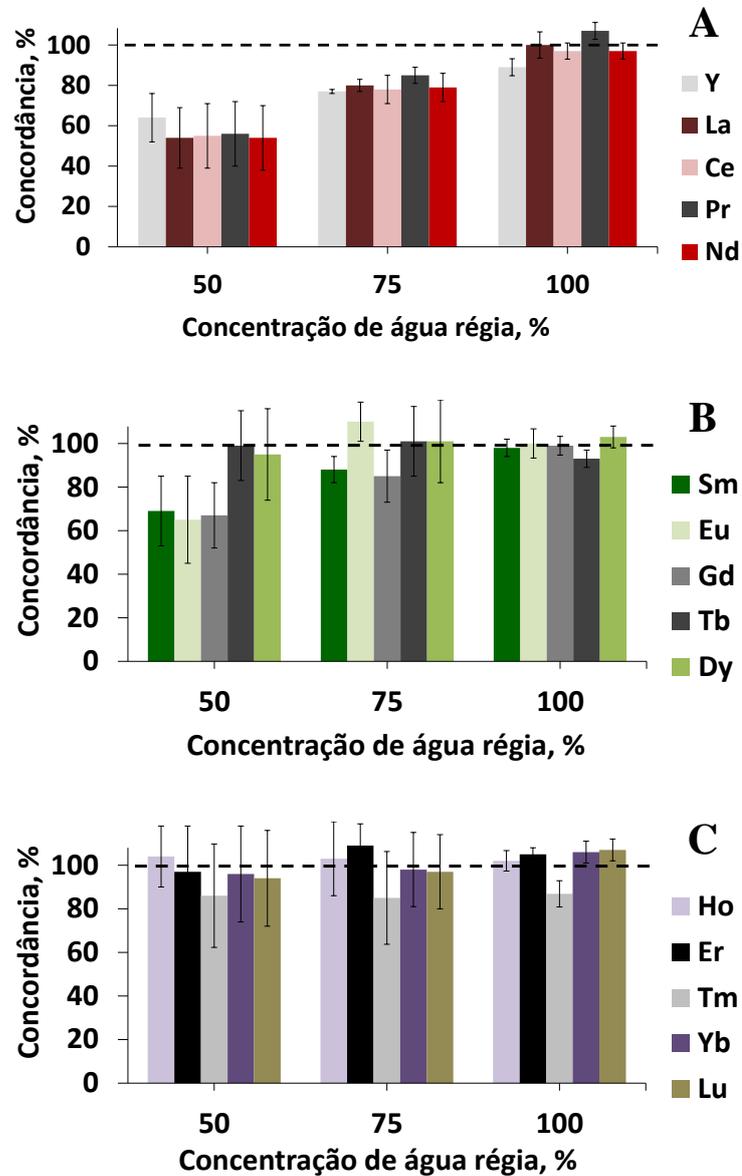
Os resultados obtidos comprovam o importante papel do HCl para a solubilização completa dos REE na solução absorvedora. Possivelmente os cloretos formados durante a etapa de refluxo têm poder complexante suficiente para solvatar os REE, retendo-os na solução absorvedora de forma quantitativa.

Como pode ser observado na Figura 22, a absorção dos analitos em solução aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração de HCl utilizada na solução absorvedora. Dessa forma a proporção de HCl + HNO₃ 3 + 1 (água régia) foi escolhida como solução absorvedora para a MIC.

4.3.3.4 Avaliação da concentração da solução de HCl + HNO₃ 3 + 1

A necessidade do uso de HCl para a recuperação quantitativa dos REE foi comprovada (seção 4.3.3.3). Resultados com variação máxima de 10% em comparação com os resultados de referência foram obtidos somente quando a proporção 3 + 1 (HCl + HNO₃) foi utilizada. Porém, todos os testes foram realizados através da utilização de ácidos concentrados (HCl 12 mol L⁻¹ e HNO₃ 14,4 mol L⁻¹). Portanto, foi verificada a possibilidade de utilização de uma solução de HCl + HNO₃ 3 + 1 diluída como solução absorvedora. Para isso, foram utilizadas as concentrações de 50% e 75%. Os resultados podem ser visualizados na Figura 23.

Figura 22 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$) usando diferentes concentrações de $\text{HCl} + \text{HNO}_3$ 3+1 como solução absorvedora para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora.

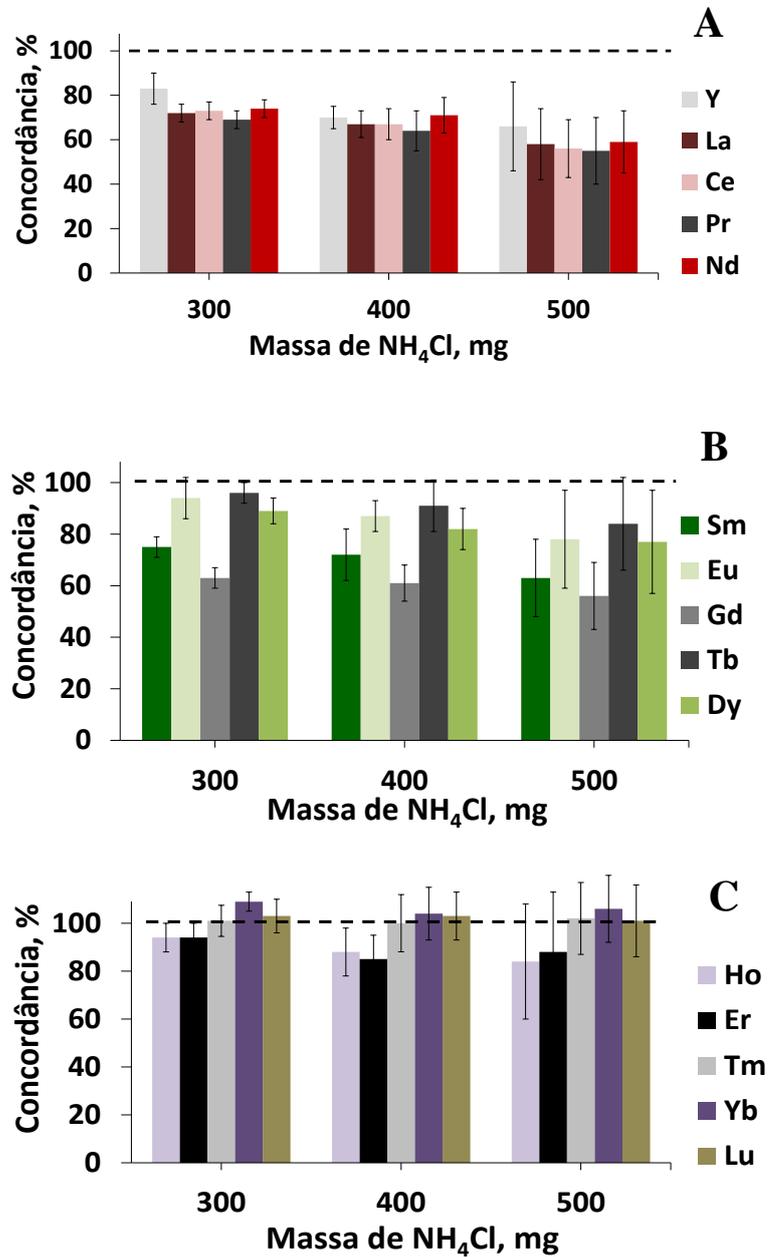


Como pode ser observado na Figura 23, quando soluções absorvedoras diluídas foram utilizadas houve uma considerável diminuição nos valores de concordância para grande parte dos REE. Além disso, os RSDs aumentaram significativamente. Dessa forma, optou-se por continuar utilizando água régia como solução absorvedora, de modo a garantir a completa absorção dos REE em solução.

4.3.3.5 Avaliação do uso de NH_4Cl

Com o objetivo de substituir parcialmente o HCl e proporcionar a utilização de soluções ácidas diluídas na MIC, foi avaliada a utilização de NH_4Cl como fonte de cloretos. O NH_4Cl pode atuar de maneira semelhante ao HCl, proporcionando a formação de cloretos durante a combustão e facilitando a solubilização dos analitos na solução absorvedora. Em trabalhos anteriores ^{130,131} o NH_4Cl já foi utilizado com sucesso na MIC como auxiliar de volatilização para Cr, proporcionando recuperações quantitativas através da formação de cloretos. Portanto, foram testadas as massas de 300, 400 e 500 mg de NH_4Cl misturadas com a amostra previamente à confecção do *pellet*. Para a realização dos testes 500 mg de amostra foram utilizados e HCl + HNO_3 (3 + 1) 50% foi utilizada como solução absorvedora. Os resultados podem ser verificados na Figura 24.

Figura 23 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$) usando diferentes diferentes massas de NH_4Cl para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora ($\text{HCl} + \text{HNO}_3$ 3 + 1, 50%).

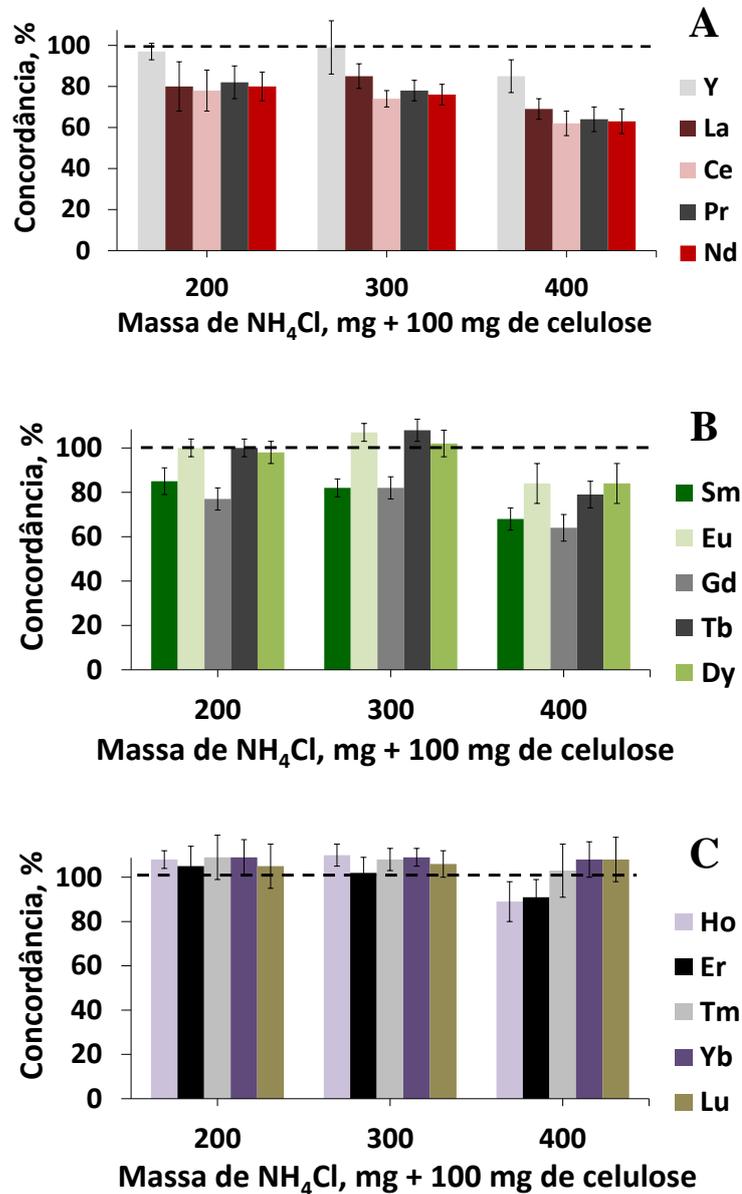


Na Figura 24 pode ser observado que quando maiores massas de NH_4Cl foram utilizadas, maiores RSDs foram obtidos, o que pode ser explicado pela diminuição do poder de queima da combustão a partir do aumento da massa do constituinte inorgânico, resultando em queimas incompletas. A queima completa da amostra não ocorreu em nenhuma das condições. Porém, quanto maior a massa de NH_4Cl , maior foi a quantidade de resíduo presente no suporte

de quartzo após a queima. Como pode ser visualizado na Figura 24, apesar da queima da amostra não ocorrer completamente, a utilização de 300 mg de NH_4Cl promoveu a obtenção de RSDs mais baixos e maiores concordâncias com relação a utilização de $\text{HCl} + \text{HNO}_3$ (3 + 1) 50% sem o uso de NH_4Cl . As concordâncias com o método de referência variaram entre 63% (Gd) e 109% (Yb).

Com o objetivo de aumentar o poder de queima da MIC, possibilitando a queima completa da amostra com a utilização de NH_4Cl , foi avaliada a utilização de 100 mg de microcelulose cristalina como auxiliar de combustão. Para isso, a massa de amostra se manteve em 500 mg e foram avaliadas massas de 200, 300 e 400 mg de NH_4Cl . Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 25.

Figura 24 - Concordância entre o método proposto (MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$) usando diferentes diferentes massas de NH_4Cl + 100 mg de celulose microcristalina para (A) Y, La, Ce, Pr e Nd, (B) Sm, Eu, Gd, Tb e Dy e (C) Ho, Er, Tm, Yb e Lu. A linha tracejada representa 100% de concordância com o método de referência. Condição: 500 mg de amostra e 6 mL de solução absorvedora ($\text{HCl} + \text{HNO}_3$ 3 + 1, 50%).



Como pode ser verificado na Figura 25, a utilização da celulose microcristalina como auxiliar de combustão aumentou o poder de queima da MIC, diminuindo os RSDs e promovendo a queima completa da amostra quando 200 e 300 mg de NH_4Cl foram utilizados (quando a massa de 400 mg de NH_4Cl foi utilizada, mesmo com a utilização de 100 mg celulose, a queima da amostra não foi completa). Porém, mesmo aumentando significativamente as concordâncias dos REE, o uso de NH_4Cl não foi o suficiente para promover a recuperação quantitativa de todos os REE. Considerando a condição que obteve os melhores resultados de

concordância (300 mg de NH_4Cl + 100 mg de celulose), para La, Ce, Pr, Nd, Sm foram obtidas concordâncias entre 74 e 85%. Para os demais analitos, foram obtidas concordâncias entre 99% (Y) e 110% (Ho). Com isso, a condição com 500 mg de amostra e 6 mL de água régia como solução absorvedora foi selecionada para a análise das demais amostras de insetos.

4.3.3.6 Avaliação da exatidão da MIC

Para a avaliação da exatidão da MIC, foi utilizado o CRM BCR-668 e a determinação dos REE foi realizada por USN-ICP-MS. Os valores certificados e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 15. Para Ho e Yb o material não apresenta valores certificados, somente valores indicativos.

Tabela 15 - Concentração dos REE no CRM BCR-668 obtidos por USN-ICP-MS após MIC (método proposto) e valores certificados, em ng g^{-1} (média \pm SD, n=3)

Analito	MIC	Valor certificado
Y	60,1 \pm 5,9	59 \pm 5
La	79,1 \pm 7,8	80 \pm 6
Ce	86,3 \pm 7,2	89 \pm 7
Pr	13,3 \pm 0,9	12,3 \pm 1,1
Nd	59,2 \pm 5,3	54 \pm 4
Sm	12,1 \pm 0,9	11,2 \pm 0,8
Eu	2,58 \pm 0,26	2,79 \pm 0,16
Gd	13,3 \pm 1,2	13 \pm 0,6
Tb	< 2,1*	1,62 \pm 0,12
Dy	8,67 \pm 1,22	8,9 \pm 0,6
Ho	< 3,6*	1,8 \pm 0,6
Er	4,98 \pm 0,38	4,5 \pm 0,5
Tm	< 1,9*	0,48 \pm 0,08
Yb	2,93 \pm 0,29	2,8 \pm 0,5
Lu	< 1,6*	0,389 \pm 0,024

* LOQ do método

Os valores apresentados na Tabela 12 indicam que o método proposto (MIC) é adequado para ser utilizado como preparo de amostras para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Não houve diferença significativa entre os valores certificados e os valores obtidos (teste t-student, 95% de confiança). Porém, é importante salientar que de maneira geral os LOQs aumentaram significativamente com relação aos obtidos pela MAWD com ácidos diluídos e pela MAWD-UV. Com isso, a quantificação dos analitos Tb, Ho, Tm e Lu não foi possível. Esse aumento dos valores de LOQ observado é consequência do aumento da concentração dos brancos, pois não foi possível a utilização de ácidos diluídos na solução absorvedora. Além disso, um fator de diluição mínimo de 5 vezes teve que ser utilizado antes da determinação de REE por USN-ICP-MS, visto que, conforme um estudo realizado em um trabalho prévio ¹¹⁰, concentrações de água régia acima de 20% promovem efeitos de supressão de sinal para os REE, podendo impactar na obtenção de resultados quantitativos.

4.3.3.7 Aplicação da MIC na decomposição de amostras de insetos

Após a definição dos parâmetros ideais e comprovação da exatidão da MIC, o método proposto foi aplicado para as demais amostras de insetos utilizadas no presente trabalho. Os resultados estão expressos na Tabela 16.

Tabela 16 - Determinação de REE em insetos após MIC (método proposto). Resultados em ng g⁻¹ (média ± SD, n=3).

Analito	Amostra A	Amostra B	Amostra C
Y	350 ± 14	253 ± 12	49,8 ± 2,8
La	730 ± 51	478 ± 31	77,1 ± 3,1
Ce	1312 ± 53	917 ± 37	80,9 ± 4,9
Pr	185 ± 7	108 ± 4	6,98 ± 0,48
Nd	590 ± 24	377 ± 15	25,9 ± 1,2
Sm	133 ± 14	70,2 ± 2,8	< 8,3*
Eu	31,9 ± 2,2	13,1 ± 0,9	< 1,6*
Gd	119 ± 5	64,4 ± 2,8	4,96 ± 0,36
Tb	26,4 ± 1,4	7,16 ± 0,29	< 2,1*
Dy	88,8 ± 3,6	42,5 ± 1,7	4,61 ± 0,25
Ho	23,7 ± 1,2	9,15 ± 0,91	< 3,6*
Er	51,1 ± 2,1	24,5 ± 0,9	< 2,9*
Tm	20,4 ± 2,9	< 1,9*	< 1,9*
Yb	31,4 ± 1,2	16,1 ± 0,7	< 2,4*
Lu	18,1 ± 0,7	2,99 ± 0,21	< 1,6*

* LOQ do método

Como já era esperado devido aos maiores LOQs obtidos para a MIC, alguns analitos não puderam ser quantificados (Tm na amostra B e Sm, Eu, Tb, Ho, Er, Tm, Yb e Lu na amostra C). Esses resultados comprovam a importância da utilização de ácidos diluídos durante o preparo de amostras, promovendo uma considerável diminuição nos valores dos brancos e por consequência, menores LOQs, permitindo a quantificação de um maior número de analitos.

4.4 LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO

Os LOQs foram calculados a partir do desvio padrão de 10 leituras do branco somados às médias dos brancos, levando em consideração a massa de amostra utilizada, o volume de aferição e o fator de diluição de cada método. De maneira geral, foi possível a obtenção de LOQs relativamente baixos (ng g⁻¹) com a utilização da técnica USN-ICP-MS.

Tabela 17 - Limites de quantificação obtidos pelo método de referência e pelos métodos propostos. Valores expressos em ng g^{-1}

Elemento	Limites de quantificação, ng g^{-1}			
	Método de referência	MAWD (HNO_3 diluído)	MAWD-UV	MIC
Y	82	3,9	5,8	12
La	145	22	29	34
Ce	169	15	37	69
Pr	23	1,8	4,8	6,2
Nd	58	7,2	14	17
Sm	71	7,7	8,7	8,3
Eu	1,1	0,12	0,15	1,6
Gd	2,2	0,49	0,52	2,2
Tb	6,5	0,46	0,57	2,1
Dy	3,4	0,19	0,43	2,4
Ho	4,6	0,37	0,38	3,6
Er	3,9	0,17	0,26	2,9
Tm	3,9	0,84	0,90	1,9
Yb	5,6	0,37	1,3	2,4
Lu	8,4	0,52	1,4	1,6

Como pode ser observado na Tabela 17, os LOQs obtidos pelo método de referência foram bem maiores em comparação com os LOQs dos métodos propostos. Diversos fatores contribuíram para um aumento pronunciado dos LOQs do método de referência, como a utilização de menor massa de amostra (250 mg), a utilização de HNO_3 concentrado como solução de decomposição e a necessidade de uma diluição prévia de 20 vezes dos digeridos, necessária para contornar interferências causadas por diferenças nas propriedades físicas (viscosidade, densidade e tensão superficial) dos digeridos com relação aos padrões de calibração.

De maneira geral, entre os métodos propostos os menores LOQs foram obtidos pela MAWD, apesar da menor concentração de HNO_3 utilizada na MAWD-UV. Essa diferença pode ser atrelada ao contato direto da lâmpada UV com a solução de decomposição na MAWD-UV que eleva os valores dos brancos, além da necessidade da utilização de um maior volume de

solução (15 mL) para cobrir completamente o bulbo da lâmpada UV. Já na MIC, os maiores LOQs podem ser explicados pela utilização de ácidos concentrados e pela presença do suporte no interior do frasco de quartzo que elevam os valores dos brancos, além da necessidade de utilização de um maior fator de diluição (5 vezes) quando comparado com os demais métodos propostos (3 vezes).

4.5 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS

No presente trabalho foram avaliados três métodos de preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. De uma maneira geral, todos os métodos foram considerados adequados. Na Tabela 18 está apresentada uma comparação geral do método de referência com os métodos propostos.

Tabela 18 - Comparação entre o método de referência e os métodos investigados para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS

Parâmetro	Método de referência	Métodos investigados		
	(MAWD)	MAWD	MAWD-UV	MIC
Massa de amostra, mg	250	500	500	500
Solução utilizada	HNO ₃ 14,4 mol L ⁻¹	HNO ₃ 5 mol L ⁻¹ + 1 mL de HCl 12 mol L ⁻¹	HNO ₃ 3 mol L ⁻¹ + 1 mL de HCl 12 mol L ⁻¹	Água régia
Teor de carbono em solução, mg L ⁻¹	3600	1265	1370	< 18,3
Volume de aferição, mL	25	25	30	25
Fator de diluição	20	3	3	5
Acidez final, mol L ⁻¹	2,90	0,77	1,05	-
Tempo de decomposição, min	60	60	60	35
Número de replicatas por ciclo de decomposição	44	8	8	8

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, os métodos MAWD e MAWD-UV propostos mostraram ser os mais adequados para o preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE. Ambos os métodos possibilitaram a utilização de soluções ácidas diluídas e mostraram-se de fácil execução. Ainda, a concentração de carbono (1265 mg L⁻¹ na MAWD e 1370 mg L⁻¹ na MAWD-UV) em solução não causou interferências na etapa de determinação, visto que os digeridos tiveram que ser diluídos previamente de 3 a 4 vezes por causa da alta concentração de K. Mesmo com uma concentração de HNO₃ ligeiramente maior, a MAWD apresentou menores LOQs quando comparada com a MAWD-UV, possibilitando a quantificação de Ho na amostra C. Esses resultados podem ser associados ao maior volume de solução de decomposição necessário para a MAWD-UV e ao contato direto da lâmpada UV com a solução de decomposição das amostras que elevou os valores dos brancos.

A MIC apresenta, quando comparada com os demais métodos avaliados, as vantagens de obter digeridos com menor teor de carbono (<18,3 mg L⁻¹) e do menor tempo de decomposição das amostras (aproximadamente 35 min). Porém, a necessidade do uso de água régia como solução absorvedora aumentou consideravelmente os valores dos brancos, além de necessitar um maior fator de diluição (5 vezes) quando comparado com os demais métodos propostos, aumentando consideravelmente os valores de LOQ.

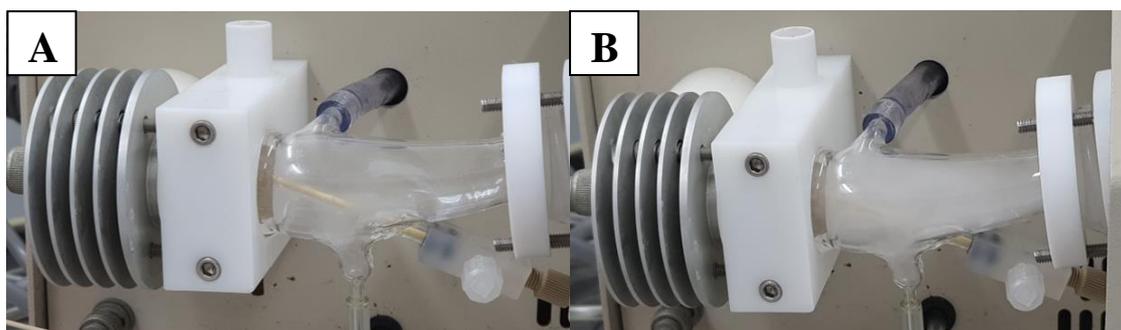
Adicionalmente, para comprovar os efeitos causados pela alta concentração de carbono e acidez dos digeridos obtidos pelo método de referência e a necessidade de utilização de um fator de diluição de 20 vezes, foram realizados testes comparativos entre o método MAWD-UV proposto e o método MAWD de referência. Para isso, diferentes diluições prévias foram utilizadas e a determinação de REE foi realizada por USN-ICP-MS.

Quando analisados os digeridos do método de referência sem diluição prévia, observou-se uma forte diminuição do aerossol formado no interior do nebulizador USN, conforme pode ser observado na Figura 26 (A), possivelmente devido a mudanças drásticas nas propriedades físico-químicas da solução (viscosidade, densidade e tensão superficial)¹²², causando a supressão do sinal dos REE em cerca de 80%. Quando os fatores de diluição de 5 e 10 vezes foram usados, também ocorreu a supressão de sinal dos analitos, embora não houvesse diminuição visível no aerossol da amostra dentro do nebulizador. Assim, foi necessário um fator de diluição de 20 vezes para os digeridos obtidos após MAWD, a fim de se obter resultados precisos. Esta é uma desvantagem óbvia para o método de referência com relação aos métodos propostos.

Por outro lado, quando os digeridos obtidos após MAWD-UV foram analisados por USN-ICP-MS sem diluição prévia, não foi observada a diminuição do aerossol (Figura 26 (B)).

No entanto, apesar do baixo teor de carbono (1370 mg L^{-1}) e acidez ($1,05 \text{ mol L}^{-1}$), observou-se uma supressão de cerca de 20% no sinal para o REE quando nenhum fator de diluição foi aplicado, comprovando o efeito causado pela presença de K na matriz da amostra (112 mg L^{-1}), como citado anteriormente. Assim, observou-se que um fator de diluição de, pelo menos 3 vezes, era necessário para obter resultados precisos após a MAWD e a MAWD-UV propostas, mostrando uma clara vantagem sobre o método de referência.

Figura 25 - Aerossol obtido a partir da nebulização do digerido obtido por (A) método de referência (MAWD) e (B) método proposto (MAWD-UV).



A abordagem proposta por Nowak et al.³⁵ foi usada para comparar o quão “verde” é cada método proposto, além do método utilizado como referência. As pontuações foram de 77,5, 80, 67,5 e 67,5 para a MAWD-UV, MAWD (método proposto), MIC e MAWD (método de referência), respectivamente. O fator que mais impactou para uma maior pontuação da MAWD-UV e da MAWD foi a utilização de ácidos diluídos e consequente geração de menor quantidade de resíduos.

Adicionalmente, para avaliar o quão “branco” é cada método utilizado no presente trabalho foi considerado o modelo RGB proposto por Nowak et al.³⁵. A abordagem propõe conciliar os princípios da química analítica “verde” com a funcionalidade através do modelo RGB, onde um método analítico “branco” mostra a consistência entre os atributos analíticos (vermelho), ecológicos (verde) e práticos (azul)³⁵. As pontuações obtidas foram de 74,4, 76,9, 71 e 70,2 para a MAWD-UV, MAWD (método proposto), MIC e MAWD (método de referência), respectivamente. Os métodos MAWD (método proposto e método de referência) apresentam menor custo (considerando o custo das lâmpadas na MAWD-UV e dos suportes de quartzo na MIC). Já o método MAWD de referência, por possibilitar a decomposição de um número maior de replicatas por ciclo (44 replicatas), apresenta maior pontuação quando o fator tempo é considerado. Porém, considerando os três parâmetros utilizados para a comparação (R, G e B), os três métodos propostos provaram ser mais “brancos” que o método de referência,

pois fornecem menores valores de LOQ. Um resumo da pontuação de cada método é apresentado na Figura 27.

Figura 26 - Comparação entre os métodos avaliados no presente estudo (MAWD-UV, MAWD com ácidos diluídos e MIC) e o método de referência (MAWD com HNO_3 $14,4 \text{ mol L}^{-1}$ para posterior determinação de REE por USN-ICP-MS de acordo com 12 princípios de WAC, realizada usando o algoritmo RGB 12.

Método: MAWD-UV					
R1: Escopo de aplicação	100	G1: Toxicidade dos reagentes	70,0	B1: Custo	70,0
R2: LOD e LOQ	90	G2: Quantidade de reagentes e resíduos	90	B2: Tempo	60,0
R3: Precisão	100	G3: Energia	50,0	B3: Requisitos	62,5
R4: Exatidão	100	G4: Impactos diretos	100	B4: Simplicidade operacional	0,0
	97,5	77,5		48,1	
	74,4				

Método: MAWD (proposto)					
R1: Escopo de aplicação	100	G1: Toxicidade dos reagentes	70,0	B1: Custo	80,0
R2: LOD e LOQ	100,0	G2: Quantidade de reagentes e resíduos	100,0	B2: Tempo	60,0
R3: Precisão	100	G3: Energia	50,0	B3: Requisitos	62,5
R4: Exatidão	100	G4: Impactos diretos	100	B4: Simplicidade operacional	0,0
	100,0	80,0		50,6	
	76,9				

Método: MIC					
R1: Escopo de aplicação	100	G1: Toxicidade dos reagentes	70,0	B1: Custo	70,0
R2: LOD e LOQ	80,0	G2: Quantidade de reagentes e resíduos	50,0	B2: Tempo	70,0
R3: Precisão	100	G3: Energia	50,0	B3: Requisitos	62,5
R4: Exatidão	100	G4: Impactos diretos	100	B4: Simplicidade operacional	0,0
	95,0	67,5		50,6	
	71,0				

Método: MAWD (referência)					
R1: Escopo de aplicação	100	G1: Toxicidade dos reagentes	70,0	B1: Custo	80,0
R2: LOD e LOQ	50,0	G2: Quantidade de reagentes e resíduos	50,0	B2: Tempo	80,0
R3: Precisão	100	G3: Energia	50,0	B3: Requisitos	62,5
R4: Exatidão	100	G4: Impactos diretos	100	B4: Simplicidade operacional	0,0
	87,5	67,5		55,6	
	70,2				

5. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram investigados três métodos analíticos (MAWD, MAWD-UV e MIC) para o preparo de amostras de insetos para a posterior determinação de REE por USN-ICP-MS. Durante o desenvolvimento dos métodos buscou-se condições que proporcionassem o uso reduzido de reagentes e menores teores de carbono e acidez residual. Ainda, quando possível, buscaram-se métodos que proporcionassem maior rapidez e simplicidade.

Na determinação de macronutrientes por ICP-OES foi possível observar que as amostras continham relativamente alta concentração de K, necessitando diluições de 3 a 4 vezes previamente à etapa de determinação para evitar interferências na técnica de USN-ICP-MS.

Em relação aos métodos investigados, todos foram considerados adequados para o preparo de amostras de insetos visando a determinação de REE por USN-ICP-MS, sendo que a exatidão de todos os métodos foi comprovada através da análise do CRM BCR-668. Todos os métodos necessitaram da utilização de HCl para proporcionar a solubilização quantitativa dos REE em solução. Essa necessidade possivelmente está relacionada à presença de espécies poucos solúveis dos REE nas amostras, dificultando a solubilização completa quando soluções diluídas de HNO₃ são utilizadas. O HCl, por promover a formação de cloretos solúveis, auxilia na determinação quantitativa dos REE pelo método proposto.

A MAWD e a MAWD-UV possibilitaram a utilização de HNO₃ diluído como solução de decomposição, seguido da adição de 1 mL de HCl 12 mol L⁻¹. Porém na MIC somente a utilização de água régia permitiu a retenção dos REE de forma quantitativa na solução absorvedora. Dessa forma, a MIC apresentou os maiores LOQs considerando os três métodos propostos.

Considerando todos os resultados obtidos nos diferentes métodos avaliados, pode-se concluir que os métodos propostos apresentaram diferentes vantagens com relação ao método de referência. Enquanto a MAWD e a MAWD-UV proporcionaram o uso de ácidos diluídos e menores LOQs, a MIC proporcionou um menor tempo de preparo de amostras e menores teores de carbono em solução. Ainda, a escolha do método ideal dependerá de fatores como instrumentação disponível em cada laboratório e custo de análise.

REFERÊNCIAS

1. Molotoks, A., Smith, P., Dawson, T. P. Impacts of land use, population, and climate change on global food security, *10* (2021) 261.
2. Rehman, A., Ma, H., Ozturk, I., Ulucak, R. Sustainable development and pollution: the effects of CO₂ emission on population growth, food production, economic development, and energy consumption in Pakistan, *Environmental Science and Pollution Research* *29* (2022) 17319-17330.
3. Lange, K. W., Nakamura, Y. Edible insects as future food: chances and challenges, *Journal of Future Foods* *1* (2021) 38-46.
4. Ordoñez-Araque, R., Egas-Montenegro, E. Edible insects: A food alternative for the sustainable development of the planet, *International Journal of Gastronomy and Food Science* *23* (2021) 100-304.
5. Ordoñez-Araque, R., Quishpillo-Miranda, N., Ramos-Guerrero, L. Edible insects for humans and animals: nutritional composition and an option for mitigating environmental damage, *Insects* *13* (2022) 994.
6. Wade, M., Hoelle, J. A review of edible insect industrialization: scales of production and implications for sustainability, *Environmental Research Letters* *15* (2020) 123013.
7. Gwenzi, W., Mangori, L., Danha, C., Chaukura, N., Dunjana, N., Sanganyado, E. Sources, behaviour, and environmental and human health risks of high-technology rare earth elements as emerging contaminants, *Science of The Total Environment* *636* (2018) 299-313.
8. Celis Hidalgo, J., Espejo, W., González-Acuña, D. Chemical elements of emerging technologies are being increasingly demanded worldwide: a possible menace for wildlife conservation?, *Animal Conservation* *23* (2020) 3-6.
9. Egler, S. G., Niemeyer, J. C., Correia, F. V., Saggiaro, E. M. Effects of rare earth elements (REE) on terrestrial organisms: current status and future directions, *Ecotoxicology (London, England)* (2022) 689-699.
10. Naccarato, A., Tassone, A., Cavaliere, F., Elliani, R., Pirrone, N., Sprovieri, F., Tagarelli, A., Giglio, A. Agrochemical treatments as a source of heavy metals and rare earth elements in agricultural soils and bioaccumulation in ground beetles, *Science of The Total Environment* *749* (2020) 141438.
11. Wang, Z., Yin, L., Xiang, H., Qin, X., Wang, S. Accumulation patterns and species-specific characteristics of yttrium and rare earth elements (YREEs) in biological matrices from Maluan Bay, China: Implications for biomonitoring, *Environmental Research* *179* (2019) 108804.
12. Boynton, W. V. Chapter 37F Neutron activation analysis, *Handbook on the Physics and Chemistry of Rare Earths*, Elsevier 1979, pp. 457-470.
13. Orvini, E., Speziali, M., Salvini, A., Herborg, C. Rare earth elements determination in environmental matrices by INAA, *Microchemical Journal* *67* (2000) 97-104.
14. Zhang, N., Huang, C., Hu, B. ICP-AES Determination of trace rare earth elements in environmental and food samples by on-line separation and preconcentration with acetylacetone-modified silica gel using microcolumn, *Analytical Sciences* *23* (2007) 997-1002.
15. Druzian, G. T., Pereira, L. S. F., Mello, P. A., Mesko, M. F., Duarte, F. A., Flores, E. M. M. Rare earth element determination in heavy crude oil by USN-ICP-MS after digestion using a microwave-assisted single reaction chamber, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* *31* (2016) 1185-1191.

16. Pereira, J. S. F., Pereira, L. S. F., Mello, P. A., Guimarães, R. C. L., Guarnieri, R. A., Fonseca, T. C. O., Flores, E. M. M. Microwave-induced combustion of crude oil for further rare earth elements determination by USN–ICP-MS, *Analytica Chimica Acta* 844 (2014) 8-14.
17. Orvini, E., Speziali, M. Applicability and limits of instrumental neutron activation analysis: state of the art in the year 2000, *Microchemical Journal* 59 (1998) 160-172.
18. Gorbatenko, A. A., Revina, E. I. A review of instrumental methods for determination of rare earth elements, *Inorganic Materials* 51 (2015) 1375-1388.
19. Allain, P., Jaunault, L., Mauras, Y., Mermet, J. M., Delaporte, T. Signal enhancement of elements due to the presence of carbon-containing compounds in inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytical Chemistry* 63 (1991) 1497-1498.
20. Grotti, M., Todolí, J.-L. Nitric acid effect in inductively coupled plasma mass spectrometry: new insights on possible causes and correction, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 35 (2020) 1959-1968.
21. Serrano, R., Grindlay, G., Gras, L., Mora, J. Insight into the origin of carbon matrix effects on the emission signal of atomic lines in inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 177 (2021) 106070.
22. Todolí, J.-L., Mermet, J.-M. Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 54 (1999) 895-929.
23. Krug, F. J. Métodos de preparo de amostras para análise elementar, São Paulo, 2016, 470 p.
24. Kurita, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin, *Progress in Polymer Science* 26 (2001) 1921-1971.
25. Różyło, K., Jędruchiewicz, K., Krasucka, P., Biszczak, W., Oleszczuk, P., Physicochemical Characteristics of Biochar from Waste Cricket Chitin (*Acheta domestica*), *Molecules*, 2022.
26. Majumdar, S., Trujillo-Reyes, J., Hernandez-Viezcas, J. A., White, J. C., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. Cerium biomagnification in a terrestrial food chain: Influence of particle size and growth stage, *Environmental Science & Technology* 50 (2016) 6782-6792.
27. Pastorino, P., Brizio, P., Abete, M. C., Bertoli, M., Oss Noser, A. G., Piazza, G., Prearo, M., Elia, A. C., Pizzul, E., Squadrone, S. Macroinvertebrates as tracers of rare earth elements in freshwater watercourses, *The Science of the total environment* 698 (2020) 134282.
28. De la Torre Roche, R., Servin, A., Hawthorne, J., Xing, B., Newman, L. A., Ma, X., Chen, G., White, J. C. Terrestrial trophic transfer of bulk and nanoparticle La₂O₃ does not depend on particle size, *Environmental Science & Technology* 49 (2015) 11866-11874.
29. Grainger, M. N. C., Hewitt, N., French, A. D. Optimised approach for small mass sample preparation and elemental analysis of bees and bee products by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 214 (2020) 120858.
30. Hawthorne, J., De la Torre Roche, R., Xing, B., Newman, L. A., Ma, X., Majumdar, S., Gardea-Torresdey, J., White, J. C. Particle-size dependent accumulation and trophic transfer of cerium oxide through a terrestrial food chain, *Environmental Science & Technology* 48 (2014) 13102-13109.

31. Florian, D., Knapp, G. High-temperature, microwave-assisted UV digestion: A promising sample preparation technique for trace element analysis, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 1515-1520.
32. Souza, G. B., Carrilho, E. N. V. M., Oliveira, C. V., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A. Oxygen bomb combustion of biological samples for inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 57 (2002) 2195-2201.
33. Flores, E. M. M., Barin, J. S., Paniz, J. N. G., Medeiros, J. A., Knapp, G. Microwave-assisted sample combustion: A technique for sample preparation in trace element determination, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 3525-3529.
34. Barin, J. S., Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Mello, P. A., Pereira, J. S. F. Chapter 5 - Microwave-Induced Combustion, É. M. d. M. Flores (Ed.) Microwave-assisted sample preparation for trace element analysis, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 143-177.
35. Nowak, P. M., Wietecha-Posluszny, R., Pawliszyn, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 138 (2021) 116223.
36. Desa, U. United nations department of economic and social affairs, population division. world population prospects: The 2015 revision, key findings and advance tables, J Online Edition, New York, 2015, 66 p.
37. Oonincx, D. G. A. B., van Itterbeeck, J., Heetkamp, M. J. W., van den Brand, H., van Loon, J. J. A., van Huis, A. An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption, *Plos One* 5 (2011) 14445.
38. Beyer, R. M., Hua, F., Martin, P. A., Manica, A., Rademacher, T. Relocating croplands could drastically reduce the environmental impacts of global food production, *Communications Earth & Environment* 3 (2022) 1-11.
39. Ojha, S., Bekhit, A. E.-D., Grune, T., Schlüter, O. K. Bioavailability of nutrients from edible insects, *Current Opinion in Food Science* 41 (2021) 240-248.
40. Payne, C. L. R., Scarborough, P., Rayner, M., Nonaka, K. A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values, *Trends in Food Science & Technology* 47 (2016) 69-77.
41. Melo-Ruiz, V., Garcia, M., Sandoval, H., Jiménez, H. D., Calvo, C. Quality proteins from edible indigenous insect food of latin America and Asia, *Emirates Journal of Food and Agriculture* 23 (2011) 283-289.
42. Mlček, J., Rop, O., Borkovcová, M., Bednářová, M. A comprehensive look at the possibilities of edible insects as food in Europe – A review, *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 64 (2014) 147-157.
43. Onyeike, E. N., Ayalogu, E. O., Okaraonye, C. C. Nutritive value of the larvae of raphia palm beetle (*Oryctes rhinoceros*) and weevil (*Rhyncophorus pheonicis*), *Journal of the Science of Food* 85 (2005) 1822-1828.
44. Finke, M. D. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores, *Zoo Biology* 21 (2002) 269-285.
45. Kosečková, P., Zvěřina, O., Pěchová, M., Krulíková, M., Duborská, E., Borkovcová, M. Mineral profile of cricket powders, some edible insect species and their implication for gastronomy, *Journal of Food Composition and Analysis* 107 (2022) 104340.

46. Hawkey, K. J., Lopez-Viso, C., Brameld, J. M., Parr, T., Salter, A. M. J. A. R. A. B. Insects: a potential source of protein and other nutrients for feed and food, 9 (2021) 333-354.
47. Rim, K. A book review; Rare earth elements in human and environmental health; at the crossroads between toxicity and safety, *Journal of Applied Biological Chemistry* 60 (2017) 207-211.
48. Allison, J. E., Boutin, C., Carpenter, D., Ellis, D. M., Parsons, J. L. Cerium chloride heptahydrate ($\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) induces muscle paralysis in the generalist herbivore, *Melanoplus sanguinipes* (Fabricius) (Orthoptera: Acrididae), fed contaminated plant tissues, *Chemosphere* 120 (2015) 674-679.
49. Li, J., Hong, M., Yin, X., Liu, J. Effects of the accumulation of the rare earth elements on soil macrofauna community, *Journal of Rare Earths* 28 (2010) 957-964.
50. Egler, S. G., Niemeyer, J. C., Correia, F. V., Saggiaro, E. M. Effects of rare earth elements (REE) on terrestrial organisms: current status and future directions, *Ecotoxicology (London, England)* (2022).
51. Espín, S., Sánchez-Virosta, P., Zamora-Marín, J. M., León-Ortega, M., Jiménez, P., Zumbado, M., Luzardo, O. P., Eeva, T., García-Fernández, A. J. Toxic elements in blood of red-necked nightjars (*Caprimulgus ruficollis*) inhabiting differently polluted environments, *Environmental Pollution* 262 (2020) 114334.
52. Huang, X., He, E., Qiu, H., Zhang, L., Tang, Y., Zhao, C., Li, M., Xiao, X., Qiu, R. Do toxicokinetic and toxicodynamic processes hold the same for light and heavy rare earth elements in terrestrial organism *Enchytraeus crypticus*?, *Environmental Pollution* 262 (2020) 114234.
53. Li, J., Verweij, R. A., van Gestel, C. A. M. Lanthanum toxicity to five different species of soil invertebrates in relation to availability in soil, *Chemosphere* 193 (2018) 412-420.
54. MacMillan, G. A., Chételat, J., Heath, J. P., Mickpegak, R., Amyot, M. Rare earth elements in freshwater, marine, and terrestrial ecosystems in the eastern Canadian Arctic, *Environmental Science: Processes & Impacts* 19 (2017) 1336-1345.
55. Zhuang, M., Wang, L., Wu, G., Wang, K., Jiang, X., Liu, T., Xiao, P., Yu, L., Jiang, Y., Song, J., Zhang, J., Zhou, J., Zhao, J., Chu, Z. Health risk assessment of rare earth elements in cereals from mining area in Shandong, China, *Scientific Reports* 7 (2017) 9772.
56. Zocher, A.-L., Klimpel, F., Kraemer, D., Bau, M. Naturally grown duckweeds as quasi-hyperaccumulators of rare earth elements and yttrium in aquatic systems and the bioavailability of gadolinium-based MRI contrast agents, *Science of The Total Environment* (2022) 155909.
57. Yuan, Y., Cave, M., Zhang, C. Using local moran's I to identify contamination hotspots of rare earth elements in urban soils of London, *Applied Geochemistry* 88 (2018) 167-178.
58. Chen, Y., Huang, R., Guan, Y., Zhuang, T., Wang, Y., Tan, R., Wang, J., Zhou, R., Wang, B., Xu, J., Zhang, X., Zhou, K., Sun, R., Chen, M. The profiling of elements and pesticides in surface water in Nanjing, China with global comparisons, *Science of The Total Environment* 774 (2021) 145749.
59. Herrmann, H., Nolde, J., Berger, S., Heise, S. Aquatic ecotoxicity of lanthanum – A review and an attempt to derive water and sediment quality criteria, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124 (2016) 213-238.
60. Priorities for occupational safety and health research in Europe: 2013-2020, European Agency for Safety and Health at Work, 2013.

61. Liang, T., Li, K., Wang, L. State of rare earth elements in different environmental components in mining areas of China, *Environmental Monitoring and Assessment* 186 (2014) 1499-1513.
62. Featherston, E. R., Cotruvo, J. A. The biochemistry of lanthanide acquisition, trafficking, and utilization, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868 (2021) 118864.
63. Figueiredo, C., Grilo, T. F., Lopes, C., Brito, P., Diniz, M., Caetano, M., Rosa, R., Raimundo, J. Accumulation, elimination and neuro-oxidative damage under lanthanum exposure in glass eels (*Anguilla anguilla*), *Chemosphere* 206 (2018) 414-423.
64. Martin, B., Richardson, F. S. Lanthanides as probes for calcium in biological systems, *Quarterly Reviews of Biophysics* 12 (1979) 181-209.
65. Cui, J. a., Zhang, Z., Bai, W., Zhang, L., He, X., Ma, Y., Liu, Y., Chai, Z. Effects of rare earth elements La and Yb on the morphological and functional development of zebrafish embryos, *Journal of Environmental Sciences* 24 (2012) 209-213.
66. Evans, C. H. Interesting and useful biochemical properties of lanthanides, *Trends in Biochemical Sciences* 8 (1983) 445-449.
67. Lortholario, M., Poirier, L., Kamari, A., Herrenknecht, C., Zalouk-Vergnoux, A. Rare earth element organotropism in European eel (*Anguilla anguilla*), *Science of The Total Environment* 766 (2021) 142513.
68. Bertini, I., Gelis, I., Katsaros, N., Luchinat, C., Provenzani, A. Tuning the affinity for lanthanides of calcium binding proteins, *Biochemistry* 42 (2003) 8011-8021.
69. Rosangela Cristina, M., Larah Martins, F., Joyce Ribeiro, S.-R., DeJane Santos, A., Geraldo Andrade, C., Hudson Wallace Pereira de, C. Are cerium oxide nanoparticles transferred from plants to the aphid *Myzus Persicae* (Hemiptera: Aphididae)?, *Florida Entomologist* 102 (2019) 555-561.
70. Chen, S., Cheng, X., He, Y., Zhu, S., Lu, D. Determination of the rare earth elements La, Eu, and Yb using solidified floating organic drop microextraction and electrothermal vaporization ICP-MS, *Microchimica Acta* 180 (2013) 1479-1486.
71. Weeks, R. D., Jr., Wilson, L. T., Vinson, S. B., James, W. D. Flow of carbohydrates, lipids, and protein among colonies of polygyne red imported fire ants, *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae), *Annals of the Entomological Society of America* 97 (2004) 105-110.
72. Showler, A. T., James, W. D., Armstrong, J. S., Westbrook, J. K. An experiment using neutron activation analysis and a rare earth element to mark cotton plants and two insects that feed on them, *Applied Radiation and Isotopes* 64 (2006) 875-880.
73. Krejčová, A., Černohorský, T., Pouzar, M. O-TOF-ICP-MS analysis of rare earth elements, noble elements, uranium and thorium in river-relating species, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92 (2012) 620-635.
74. Boomsma, J. J. Estimation of worker numbers in ant populations after marking with Europium, *Oikos* 38 (1982) 222-227.
75. Showler, A. T., Knaus, R. M., Reagan, T. E. Foraging territoriality of the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren, in sugarcane as determined by neutron activation analysis, *Insectes Sociaux* 36 (1989) 235-239.
76. Řehoř, I., Macháčková, L., Bučánková, A., Matějková, S., Černá, K., Straka, J. Measuring the sugar consumption of larvae in bumblebee micro-colonies: a

- promising new method for tracking food economics in bees, *Apidologie* 45 (2014) 116-128.
77. Amyot, M., Clayden, M. G., MacMillan, G. A., Perron, T., Arscott-Gauvin, A. Fate and trophic transfer of rare earth elements in temperate lake food webs, *Environmental Science & Technology* 51 (2017) 6009-6017.
 78. Zawisza, B., Pytlakowska, K., Feist, B., Polowniak, M., Kita, A., Sitko, R. Determination of rare earth elements by spectroscopic techniques: a review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26 (2011) 2373-2390.
 79. Gorbatenko, A., Revina, E. A review of instrumental methods for determination of rare earth elements, *Inorganic Materials* 51 (2015) 1375-1388.
 80. Matusiewicz, H. Sample preparation for inorganic trace element analysis *Physical Sciences Reviews* 2 (2017) 20178001.
 81. Ossipov, K., Seregina, I. F., Bolshov, M. A. Inductively coupled plasma mass spectrometry in the analysis of biological samples and pharmaceutical drugs, *Russian Chemical Reviews* 85 (2016) 335-355.
 82. Tan, S. H., Horlick, G. Background spectral features in inductively coupled plasma/mass spectrometry, *Appl. Spectrosc.* 40 (1986) 445-460.
 83. Cerveira, C., Hermann, P. R. S., Pereira, J. S. F., Pozebon, D., Mesko, M. F., Moraes, D. P. Evaluation of microwave-assisted ultraviolet digestion method for rice and wheat for subsequent spectrometric determination of As, Cd, Hg and Pb, *Journal of Food Composition and Analysis* 92 (2020) 103585.
 84. Melaku, S., Gelaude, I., Vanhaecke, F., Moens, L., Dams, R. Comparison of pyrolysis and microwave acid digestion techniques for the determination of mercury in biological and environmental materials, *Microchimica Acta* 142 (2003) 7-12.
 85. Barnes, R. M., Júnior, D. S., Krug, F. J. Chapter 1 - Introduction to sample preparation for trace element determination, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 1-58.
 86. Bizzi, C. A., Flores, E. L. M., Nóbrega, J. A., Oliveira, J. S. S., Schmidt, L., Mortari, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 332-338.
 87. Brenner, I. B., Mermet, J. M., Segal, I., Long, G. L. Effect of nitric and hydrochloric acids on rare earth element (REE) intensities in inductively coupled plasma emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 50 (1995) 323-331.
 88. Costa, L. M., Santos, D. C. M. B., Hatje, V., Nóbrega, J. A., Korn, M. G. A. Focused-microwave-assisted acid digestion: Evaluation of losses of volatile elements in marine invertebrate samples, *Journal of Food Composition and Analysis* 22 (2009) 238-241.
 89. Rocha, F. R. P., Teixeira, L. S. G., Nobrega, J. d. A. Green strategies in trace analysis: Glimpse of simple alternatives for sample pretreatment and analyte determination, *Spectroscopy Letters* 42 (2009) 418-429.
 90. Miranda, K., Filho, E., Neto, J. A new closed-vessel conductively heated digestion system: Fostering plant analysis by inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 825-831.

91. Mello, P. A., Barin, J. S., Guarnieri, R. A. Chapter 2 - Microwave Heating, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 59-75.
92. Müller, E. I., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Korn, M. d. G. A., Flores, E. M. M. Chapter 4 - Wet Digestion Using Microwave Heating, E. M. M. Flores (Ed.) *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2014, pp. 99-142.
93. Hartwig, C. A., Pereira, R. M., Rondan, F. S., Cruz, S. M., Duarte, F. A., Flores, E. M. M., Mesko, M. F. 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* 31 (2016) 523-530.
94. Dash, K., Rastogi, L., Arunachalam, J. DNA quantification via traceable phosphorus measurement through microwave-assisted UV digestion-ion chromatography, *Analyst* 137 (2012) 668-674.
95. Limbeck, A. Microwave-assisted UV-digestion procedure for the accurate determination of Pd in natural waters, *Analytica Chimica Acta* 575 (2006) 114-119.
96. Holkem, A. P., Iop, G. D., Bitencourt, G. R., Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Mello, P. A. Combining microwave and ultraviolet energy for sample preparation of polymer-based materials for further halogen determination, *Advances in Sample Preparation* 4 (2022) 100038.
97. 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, *Analytical Chemistry* 85 (2013) 11034-11040.
98. Hoenig, M., Baeten, H., Vanhentenrijk, S., Vassileva, E., Quevauviller, P. Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods, *Analytica Chimica Acta* 358 (1998) 85-94.
99. Steehler, J. K. Sample preparation techniques in analytical chemistry (Mitra, Somenath), *Journal of Chemical Education* 81 (2004) 199.
100. Flores, E. M. M., Barin, J. S., Mesko, M. F., Knapp, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62 (2007) 1051-1064.
101. Flores, E. M. M., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Pereira, J. S. F., Mello, P. A., Barin, J. S., Knapp, G. Determination of halogens in coal after digestion using the microwave-induced combustion technique, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 1865-1870.
102. Takeda, K., Arikawa, Y. J. B. K. Determination of rare earth elements in petroleum by ICP-MS, 54 (2005) 939-943.
103. Schöniger, W. Eine Mikroanalytische Schnellbestimmung Von Halogen in Organischen Substanzen, *Microchimica Acta* 43 (1955) 123-129.
104. Osborne, B. G., Willis, K. H. J. A. Determination of low levels of chlorine in adipose tissue by means of the oxygen-flask combustion technique and gas-liquid chromatography, 110 (1985) 1037-1038.
105. Barin, J. S., Determinação de metais e não metais em produtos farmacêuticos após decomposição por combustão assistida por microondas em recipientes fechados,

Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia Farmacêutica.,
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2003

106. Enders, M. S. P., de Souza, J. P., Balestrin, P., Mello, P. A., Duarte, F. A., Muller, E. I. Microwave-induced combustion of high purity nuclear flexible graphite for the determination of potentially embrittling elements using atomic spectrometric techniques, *Microchemical Journal* 124 (2016) 321-325.
107. Pereira, L. S. F., Bizzi, C. A., Schmidt, L., Mesko, M. F., Barin, J. S., Flores, E. M. M. Evaluation of nitrates as igniters for microwave-induced combustion: understanding the mechanism of ignition, *RSC Advances* 5 (2015) 9532-9538.
108. Flores, E. M. M., Barin, J., Knapp, G. Trends in sample preparation using combustion techniques, 1 (2007) 73-114.
109. Bizzi, C. A., Pedrotti, M. F., Silva, J. S., Barin, J. S., Nóbrega, J. A., Flores, E. M. M. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32 (2017) 1448-1466.
110. Druzian, G. T., Desenvolvimento de métodos analíticos e estudos de interferências para a determinação de elementos terras raras em sangue por ICP-MS, Tese (Doutorado em ciências), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2021, pp. 248.
111. Golloch, A. 2. Analytics of Rare Earth Elements – Basics and Methods, G. Alfred (Ed.) Handbook of Rare Earth Elements, De Gruyter, Berlin, Boston, 2017, pp. 4-13.
112. Grindlay, G., Gras, L., Mora, J., de Loos-Vollebregt, M. T. C. Carbon-, sulfur-, and phosphorus-based charge transfer reactions in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 115 (2016) 8-15.
113. Dulski, P. Interferences of oxide, hydroxide and chloride analyte species in the determination of rare earth elements in geological samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 350 (1994) 194-203.
114. Longerich, H. P., Fryer, B. J., Strong, D. F., Kantipuly, C. J. Effects of operating conditions on the determination of the rare earth elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), *Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy* 42 (1987) 75-92.
115. Wysocka, I. Determination of rare earth elements concentrations in natural waters – A review of ICP-MS measurement approaches, *Talanta* 221 (2021) 121636.
116. AOAC INTERNATIONAL, Official Methods of Analysis, 21st ed., 2019.
117. Bligh, E. G., Dyer, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37 (1959) 911-917.
118. Ibitoye, E. B., Lokman, I. H., Hezmee, M. N. M., Goh, Y. M., Zuki, A. B. Z., Jimoh, A. A. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket, *Biomedical Materials* 13 (2018) 025009.
119. Rumpold, B. A., Schluter, O. K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects, *Mol Nutr Food Res* 57 (2013) 802-823.
120. Fraser, M., Beauchemin, D. Effect of concomitant elements on the distribution of ions in inductively coupled plasma-mass spectroscopy. Part 1. Elemental ions, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 55 (2000) 1705-1731.
121. Mineral commodity summaries, Reston, VA, 2023, pp. 210.
122. Flores, E. M. M. Microwave-assisted sample preparation for trace element determination, Elsevier, Amsterdam, 2014, 400 p.

123. Pereira, J. S. F., Desenvolvimento de métodos de preparo de amostras de petróleo e posterior determinação de elementos terras raras por ICP-MS, Tese (Doutorado em ciências), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2011, pp. 178.
124. Bulska, E., Danko, B., Dybczyński, R. S., Krata, A., Kulisa, K., Sameczyński, Z., Wojciechowski, M. Inductively coupled plasma mass spectrometry in comparison with neutron activation and ion chromatography with UV/VIS detection for the determination of lanthanides in plant materials, *Talanta* 97 (2012) 303-311.
125. Mesko, M. F., La Rosa Novo, D., Rondan, F. S., Pereira, R. M., Costa, V. C. Sample preparation of lipstick for further Cd and Pb determination by ICP-MS: is the use of complexing acids really necessary?, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 32 (2017) 1780-1788.
126. Krishna, M. V. B., Venkateswarlu, G., Karunasagar, D. Development of a simple and robust microwave-assisted decomposition method for the determination of rare earth elements in coal fly ash by ICP-OES, *Analytical Methods* 9 (2017) 2031-2040.
127. Muller, E. I., Souza, J. P., Muller, C. C., Muller, A. L. H., Mello, P. A., Bizzi, C. A. 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* 156-157 (2016) 232-238.
128. Leclercq, A., Nonell, A., Todolí Torró, J. L., Bresson, C., Vio, L., Vercouter, T., Chartier, F. Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations, *Analytica Chimica Acta* 885 (2015) 57-91.
129. Atkins, P. Shriver and Atkins' inorganic chemistry, Oxford University Press, USA, 2010.
130. Mello, P. A., Diehl, L. O., Oliveira, J. S. S., Muller, E. I., Mesko, M. F., Flores, E. M. M. Plasma-based determination of inorganic contaminants in waste of electric and electronic equipment after microwave-induced combustion, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 105 (2015) 95-102.
131. Santos, R. F., Cruz, S. M., Krzyzaniak, S. R., Duarte, F. A., Mello, P. A., Flores, E. M. M. Trace metal impurities determination in high-purity polyimide by plasma-based techniques, *Microchemical Journal* 146 (2019) 492-497.