



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA**

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DIRETA DE ELEMENTOS QUÍMICOS
EM AMOSTRAS DE MACROALGAS MARINHAS POR TÉCNICAS
ESPECTROANALÍTICAS**

GEYSA BARRETO BRITO

SALVADOR – BA

2015

Geysa Barreto Brito

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DIRETA DE ELEMENTOS QUÍMICOS
EM AMOSTRAS DE MACROALGAS MARINHAS POR TÉCNICAS
ESPECTROANALÍTICAS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química, área de Química Analítica, da Universidade
Federal da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Química.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Andrade Korn

Coorientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

SALVADOR – BA

2015

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Brito, Geysa Barreto.

Estratégias para determinação direta de elementos químicos em amostras de macroalgas marinhas por técnicas espectroanalíticas / Geysa Barreto Brito. - 2015
105 f. : il.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria das Graças Andrade Korn.

Coorientador: Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2015.

1. Alga marinha - Todos os Santos, Baía de (BA). 2. Fluorescência de raio X. 3. Espectroscopia de emissão. 4. Elementos químicos – Análise. 5. Quimiometria. I. Korn, Maria das Graças Andrade. II. Nóbrega, Joaquim de Araújo. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. IV. Título.

CDD – 589.414

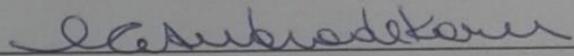
CDU – 543.62:582.272

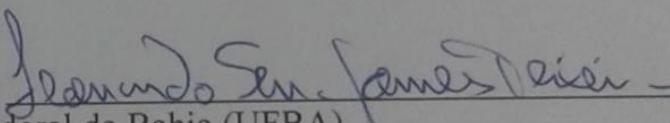
TERMO DE APROVAÇÃO

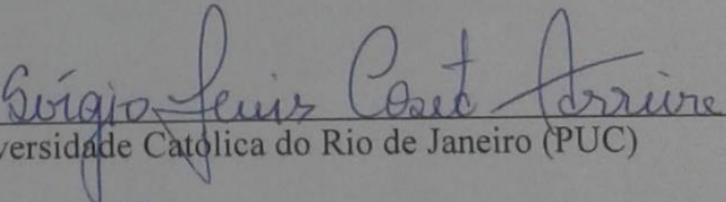
GEYSA BARRETO BRITO

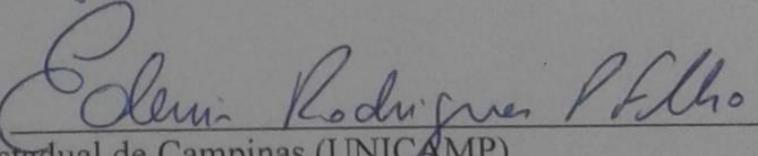
“Estratégias para determinação direta de elementos químicos em amostras de macroalgas marinhas por técnicas espectroanalíticas”

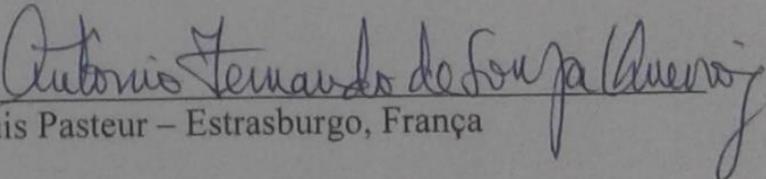
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Maria das Graças Andrade Korn 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira 
Doutorado em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Edenír Rodrigues Pereira Filho 
Doutorado em Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Universidade Federal de São Carlos

Prof. Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz 
Doutorado em Geoquímica, Universidade Louis Pasteur – Estrasburgo, França
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 17 de junho de 2015.

Este trabalho é dedicado:

*a meus pais que me incentivaram nos estudos,
em especial à minha mãe Anita pelo amor,
garra, carinho e apoio em todos os momentos da
minha vida;*

*à minha avó pelo carinho e exemplo de
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe, pelo exemplo, incentivo e amor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia, pela possibilidade da realização deste trabalho.

Às agências CNPq e FAPESB pela bolsa e suporte financeiro.

À Profa. Dra. Maria G. A. Korn, pela orientação, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Joaquim A. Nóbrega pela coorientação, sugestões e confiança.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho pelo apoio e contribuições.

Ao Prof. Dr. Leonardo Sena G. Teixeira pelo auxílio, disposição e sugestões.

Ao Prof. Dr. Sérgio L. C. Ferreira pelo incentivo e parceria.

Aos demais membros da banca pelas contribuições.

Ao Prof. Dr. Rennan G. O Araújo pela colaboração e parceria.

Ao Dr. Francisco Wendel B. de Aquino pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Carlos Wallace Moura pela ajuda com identificação das algas.

Aos professores Dr. Sílvio D. Cunha e Dra. Heloísa M. Andrade pelo apoio.

A Jefferson Silva pela ajuda e disponibilidade.

Aos colegas do grupo GPQA/UFBA pela compreensão e colaboração, como Milena Pinelli, Marcus Vinícius Souza, Thais L. Souza, em especial às amigas Isa S. Barbosa e Fernanda N. Costa.

A Edvaldo Pereira Q. Júnior e Roberta Natália C. S. Carvalho do grupo IDEIA/UFBA pelo apoio e parceria.

Às professoras Sarah Adriana R. Soares e Karina S. Garcia, do LEPETRO/NEA/IGEO/UFBA, pela atenção e disponibilidade.

A Marcello Bastos pela força, estímulo e apoio.

Aos colegas do grupo GRPQQ/UFBA pela parceria.

RESUMO

Este trabalho, desenvolvido no Grupo de Pesquisa em Química Analítica da UFBA, se encontra dentro do âmbito da FAPESB, no projeto Avaliação da Poluição e Identificação de Processos de Recuperação para Regiões de Manguezais sob Influência de Atividades Industriais na Baía de Todos os Santos, e teve por objetivo o estudo e desenvolvimento de dois métodos para determinação direta de elementos químicos em macroalgas marinhas. Esses organismos estão sendo utilizadas com êxito no monitoramento da qualidade ambiental e na biorremediação de contaminação aquática. Além disso, possuem elevado valor nutricional e grande potencial na fabricação de biocombustíveis. Diante de sua importância ambiental, nutricional e energética, o estudo de sua composição mineral é importante para avaliação de potenciais aplicações e consequências. Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos visando a determinação qualitativa e quantitativa de elementos químicos, em concentrações macro, micro e traço nas macroalgas, porém poucos são os trabalhos descritos na literatura usando métodos diretos de análise. A aplicação de métodos de análise direta de amostras sólidas é uma alternativa viável para diminuição de custos, consumo de reagentes, tempo de análise, geração de resíduos, além de minimizar a manipulação da amostra, evitando perdas de analitos e contaminação. As técnicas de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) e espectroscopia de emissão em plasma induzido por laser (LIBS) foram avaliadas para a determinação elementar em amostras de macroalgas marinhas. A principal dificuldade dessas técnicas para a análise direta de sólidos é estabelecer a estratégia de calibração externa, pois amostras sólidas podem ser heterogêneas, apresentar superfícies pouco uniformes, aliadas à falta de padrões compatíveis com as matrizes estudadas. Esses fatores acabam interferindo na exatidão, precisão e confiabilidade do método. Por isso, alternativas de calibração com uso de amostras de mesma matriz e análise multivariada foram aplicadas. Para verificação da eficiência das estratégias propostas, um método validado a partir de decomposição ácida de amostra assistida por radiação micro-ondas com determinação por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) foi utilizado para comparação de resultados, além do uso de sete materiais de referência certificados (CRMs) de diferentes materiais vegetais. A EDXRF possibilitou a determinação de Ca, K e Mg. Os valores de r^2 dos modelos de calibração, precisão (%) para $n=10$, LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) e faixa de recuperação (%) em diferentes CRMs foram para: Ca (0,9233, 2,07, 109,5 e 85,0-89,3), K (0,9964, 3,82, 207,0 e 126,6-129,6) e Mg (0,9432, 4,07, 195,6 e 92,7-115,4). Por outro lado, LIBS, com uso de regressão multivariada por PLS (regressão por mínimos quadrados parciais) gerou modelos de validação com dados de número de variáveis, variáveis latentes (VLs), erro médio da validação cruzada (RMSECV, em $\mu\text{g g}^{-1}$), r^2 e faixa recuperação (%) para os CRMs de: 55, 3, 9094, 0,9174 e 124-134 (Ca); 75, 1, 4264, 0,9626 e 84-90,7 (K); 235, 1, 1315, 0,5299 e 60-4953 (Mg); e 180, 2, 2580, 0,9781 e <LQ-87,1 (Na). Com estes dados, LIBS apresentou boas previsões para Ca e K, necessitando de um melhor ajuste para Na e Mg.

Palavras chave: EDXRF, LIBS, calibração multivariada, macroalgas marinhas, Quimiometria.

ABSTRACT

This work, developed in Analytical Chemistry Research Group from UFBA, is within the scope of FAPESB, in the Assessment of Pollution and Recovery Process Identification for Mangrove Regions under the Influence of Industrial Activities in the All Saints Bay project, with the objective to study and development of two methods for direct determination of chemical elements in marine macroalgae. These organisms are being successfully used for monitoring the quality of an environment and for bioremediation of aquatic contamination. Macroalgae are also known by their nutritional value and great potential for production of biofuels. The determination of mineral composition of macroalgae is relevant taking into account their relevant applications and potential consequences. Several studies have shown the determination of macro, micro, and trace elements in macroalgae, but few studies were dedicated to their direct analysis. The application of direct solid analysis is an attractive alternative to decrease costs, consumption of reagents, sample throughput, and generation of residues. Direct solid analysis also avoids analyte losses and contamination. In the work here described, energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF) and laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) were studied for elemental analysis of marine macroalgae. The main difficulty for both techniques for direct analysis of solids is the strategy for calibration, because solid samples may be heterogeneous, may have an irregular surface, and frequently there are no solid standards available considering sample matrices. These factors may affect negatively the accuracy, precision and reliability of the method. We investigated calibration strategies based on the use of same matrix and multivariate analysis. In a parallel procedure applied for comparison purposes, macroalgae samples were microwave-assisted acid digested and elemental analysis was performed by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) beyond the use of seven Certified Reference Materials (CRMs) of different plant materials. It was demonstrated that EDXRF led to accurate determination of Ca, K and Mg. The r^2 for the calibration models, accuracy (%) for $n = 10$, LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) and recovery ranges (%) at different CRMs values were to: Ca (0.9233, 2.07, 109.5 and 85.0 to 89.3), K (0.9964, 3.82, 207.0 and 126.6 to 129.6) and Mg (0.9432, 4.07, 195.6 and 92.7 to 115.4). Furthermore, LIBS, using PLS (partial least squares regression) generated validation's models with data for number of variable, latent variables (VLs), mean error of cross validation (RMSECV in $\mu\text{g g}^{-1}$), r^2 and range recovery (%) for CRMs of: 55, 3, 9094, 0.9174 and 124 to 134 (Ca); 75, 1, 4264, 0.9626 and 84 to 90.7 (K); 235, 1, 1315, 0.5299 and 60 to 4953 (Mg); and 180, 2, 2580, 0.9781 and <LQ to 87.1 (Na). With this data, LIBS had good forecasts for Ca and K, requiring a better adjustment for Na and Mg.

Keywords: EDXRF, LIBS, multivariate calibration, marine macroalgae, chemometrics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Transições eletrônicas provenientes de emissão de raios X.	28
Figura 2	ED-XRF: a) representação esquemática da técnica, b) equipamento simplificado de um instrumento com excitação por fonte radioativa.	30
Figura 3	Esquema instrumental de um espectrômetro de LIBS.	34
Figura 4	Macroalgas do gênero Rhodophyta (algas vermelhas). Da esquerda para a direita, de cima para baixo: a) <i>Acanthophora spicifera</i> , b) <i>Agardhiella</i> , c) <i>Bryothamnion triquetrum</i> , d) <i>Cryptonemia crenulata</i> , e) <i>Gracilaria domingensis</i> e f) <i>Hypnea musciformis</i> .	44
Figura 5	Macroalgas marinhas dos gêneros Chlorophyta (algas verdes) e Ochrophyta (algas pardas). Da esquerda para a direita, de cima para baixo: a) <i>Caulerpa cupressoides</i> , b) <i>Caulerpa racemosa</i> , c) <i>Caulerpa scalpelliformis</i> , d) <i>Codium isthmocladum</i> , e) <i>Ulva lactuca</i> , f) <i>Dictyopteris jamaicensis</i> , g) <i>Dictyota</i> sp., h) <i>Padina</i> sp. e i) <i>Sargassum</i> sp.	45
Figura 6	Liofilizadores utilizados para secagem das amostras de macroalgas marinhas (modelos L101 e 108, Liotop, SP-Brasil).	49
Figura 7	Moinho de bolas utilizado na moagem das amostras de macroalgas marinhas (Spex SamplePrep, 8000M mixer/Mill).	49
Figura 8	Prensa usada no fabrico das pastilhas e detalhe das amostras pastilhadas.	50
Figura 9	Fotos do forno de Micro-ondas com cavidade, copos e segmentos ETHOS EZ, Milestone.	51
Figura 10	Foto do espectrômetro simultâneo de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com configuração axial (Varian).	52
Figura 11	Esquema do EDXRF S2 RANGER da Bruker AXS empregado para determinação elementar neste trabalho.	54

Figura 12	Fotos do equipamento, amostrador e disco de Cu para calibração da EDXRF S2 RANGER da Bruker AXS e amostras sobre filme Mylar® de poliéster.	55
Figura 13	LIBS: fotos do amostrador, obtenção espectral, amostra de macroalga em pastilha dividida em quadrantes e padrão de ablação empregados.	57
Figura 14	Foto da montagem do copo de amostragem para análise por EDXRF das pastilhas de macroalgas, sobre filme polimérico, com cobertura de papel de filtro (com e sem amostra, respectivamente).	65
Figura 15	Curvas de regressão obtidas neste trabalho para K, Ca, Na e Mg por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) <i>versus</i> intensidade, nas análises de macroalgas.	66
Figura 16	Curvas de regressão obtidas neste trabalho para Al, Fe, Sr e P por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) <i>versus</i> intensidade, nas análises de macroalgas.	67
Figura 17	Curvas de regressão obtidas neste trabalho para Co, Mn, As e Zn por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) <i>versus</i> intensidade, nas análises de macroalgas.	68
Figura 18	Curvas de regressão obtidas neste trabalho para Ba, Sn, Ni e Cr por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) <i>versus</i> intensidade, nas análises de macroalgas.	69
Figura 19	Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Al, Ba, Ca e Co, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES <i>versus</i> EDXRF.	75
Figura 20	Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Cr, Fe, K e Mg, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES <i>versus</i> EDXRF.	76
Figura 21	Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Mn, P, Sr e Zn, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES <i>versus</i> EDXRF.	77

Figura 22	Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Mg, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES <i>versus</i> EDXRF, após retirada de 2 amostras.	78
Figura 23	Gráfico keV <i>versus</i> cps de 3 amostras de algas estudadas neste trabalho de diferentes filos, obtidos por EDXRF (13C – vermelha, 6C – verde e 3C – parda).	78
Figura 24	Gráficos espectrais keV <i>versus</i> cps das amostras de algas da 3ª coleta estudadas neste trabalho, obtidos por EDXRF.	80
Figura 25	Espectro de emissão de fluorescência obtidos por EDXRF (keV <i>versus</i> cps) de 46 amostras analisadas neste trabalho, delimitadas nas regiões de sinais mais intensos.	81
Figura 26	Importância das PCs sobre a explicação da variabilidade total dos dados obtidos nas análises de macroalgas por EDXRF.	81
Figura 27	Gráficos de PC1 <i>versus</i> PC2 para loadings (cima) e scores (baixo) dos dados espectrais obtidos por EDXRF das amostras de macroalgas estudadas.	82
Figura 28	Dendograma das 254 variáveis das análises de macroalgas por EDXRF.	83
Figura 29	Dendograma dos 46 casos das análises de macroalgas por EDXRF.	83
Figura 30	Regiões espectrais fragmentadas referentes a cada elemento (Ca, Fe, Na e K) para uso nos modelos de PLS nas amostras de macroalgas.	86
Figura 31	Regiões espectrais fragmentadas referentes a cada elemento (Mg, Al, P e Sr) para uso nos modelos de PLS nas amostras de macroalgas.	87
Figura 32	Gráficos de relação de teores, em $\mu\text{g g}^{-1}$, dos elementos determinados em macroalgas do conjunto de validação por ICP OES <i>versus</i> LIBS.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Táxons de macroalgas coletadas nos diferentes períodos de amostragem.	41
Tabela 2	Programa de aquecimento por forno de micro-ondas para decomposição das amostras.	51
Tabela 3	Condições operacionais utilizadas do ICP OES, Varian.	53
Tabela 4	Linhas espectrais de emissão usadas para determinação dos analitos nas amostras de macroalgas marinhas por ICP OES.	53
Tabela 5	Parâmetros instrumentais e de medida do LIBS empregados para determinação elementar nas amostras de macroalgas marinhas.	56
Tabela 6	Limites de detecção e quantificação dos analitos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos neste trabalho, por ICP OES.	59
Tabela 7	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM NIST 1515 obtidos neste trabalho.	59
Tabela 8	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM NIST 1547 obtidos neste trabalho.	60
Tabela 9	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM NIST 1570a obtidos neste trabalho.	60
Tabela 10	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 060 obtidos neste trabalho.	61
Tabela 11	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 482 obtidos neste trabalho.	61
Tabela 12	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 670 obtidos neste trabalho.	61

Tabela 13	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 279 obtidos neste trabalho.	62
Tabela 14	Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 414 obtidos neste trabalho.	62
Tabela 15	Valores de recuperação (%) dos CRMs pela determinação por ICP OES, com destaque para os valores mínimos e máximos de recuperação dos elementos certificados, entre os analitos e os CRMs.	63
Tabela 16	Configurações de medida para os analitos empregados neste trabalho.	65
Tabela 17	Desvios padrão relativos (RSD %) das intensidades medidas dos elementos em uma amostra por EDXRF (n = 10), obtidos neste trabalho.	71
Tabela 18	Valores dos limites de detecção e quantificação obtidos por EDXRF, em $\mu\text{g g}^{-1}$, neste trabalho.	72
Tabela 19	Valores determinados neste trabalho ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cada analito dos CRMs por EDXRF e os respectivos percentuais de recuperação, destacados em negrito.	73
Tabela 20	Faixas de comprimentos de onda referentes aos analitos determinados por LIBS em macroalgas, delimitadas para construção de modelos de PLS.	85
Tabela 21	Dados dos modelos de PLS gerados para cada analito, obtidos a partir das análises de macroalgas por LIBS.	89

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AAS	Espectrometria de absorção atômica (<i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ANP	Agência Nacional do Petróleo
BNDO	Banco Nacional de Dados Oceanográficos
CCD	Dispositivo de carga acoplada (<i>Charged Coupled Device</i>)
CLS	Regressão clássica por mínimos quadrados (<i>Classical Least-Square</i>)
CPS	Contagem por segundo
CRM	Material de Referência Certificado (<i>Certified Reference Material</i>)
CV	Validação cruzada (<i>Cross Validation</i>)
DHA	Ácido docosahexaenóico
DHN	Diretoria de Hidrografia e Navegações
EDXRF	Espectrometria de Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva (<i>Energy Dispersive X-Ray Fluorescence</i>)
EPA	Ácido eicosapentaenóico
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (<i>Flame Atomic Absorption Spectrometer</i>)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em Forno de Grafite (<i>Grafite Furnace Atomic Absorption Spectrometer</i>)
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos (<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
IR	Infravermelho (<i>Infrared</i>)
IRMM	<i>Institute for Reference Materials and Measurements</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LASS	<i>Laser Spark Spectroscopy</i>

LIB OES	<i>Laser Induced Breakdown Optical Emission Spectrometry</i>
LIBS	Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Laser (<i>Laser-Induced Breakdown spectroscopy</i>)
LIES	<i>Laser Induced Emission Spectroscopy</i>
LIPS	<i>Laser-Induced Plasma Spectroscopy</i>
LOD	ou LD, Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	ou LQ, Limite de quantificação (<i>Limito of Quantification</i>)
MLR	Regressão Linear Múltipla (<i>Multiple Linear Regression</i>)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
OLS	Calibração por mínimos quadrados ordinários (<i>Ordinary Least Square</i>)
PC	Componente Principal (<i>Principal Component</i>)
PCA	Análise por Componentes Principais (<i>Principal Components Analysis</i>)
PCR	Regressão por Componentes Principais (<i>Principal Components Regression</i>)
PLS	ou PLSR, Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (<i>Partial Least Squares</i>)
PPM	Parte por milhão
PTFE	Politetrafluoretileno
R²	Coeficiente de determinação
RMSEP	Raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>)
RMSEV	Erro médio quadrático de validação (<i>Root Mean Square Error of Validation</i>)
RMSECV	Erro quadrático médio de validação cruzada (<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>)
SIMCA	modelagem independente por similaridade de classes (<i>Soft Independent Modelling by Class Analogy</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SAT	<i>See Algae Technology</i>
SBR	Razão sinal analítico/sinal de fundo (<i>Signal-to-Background Ratio</i>)
SD	Desvio Padrão (<i>Standard Deviation</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 GERAL	18
2.2 ESPECÍFICOS	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1 MACROALGAS MARINHAS	19
3.2 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR	24
3.2.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X	26
3.2.2 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER	31
3.2.3 QUIMIOMETRIA	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 COLETA DE AMOSTRAS	41
4.1.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	42
4.1.2 DESCONTAMINAÇÃO DO MATERIAL DE CAMPO	45
4.1.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL	46
4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES	47
4.3 INSTRUMENTAÇÃO E EQUIPAMENTOS	48
4.3.1 PRÉ TRATAMENTO	48
4.3.2 MÉTODO COMPARATIVO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO	50
4.3.3 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR	53
4.3.3.1 <i>EDXRF</i>	53
4.3.3.2 <i>LIBS</i>	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 ESTUDOS DA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO	58

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO POR EDXRF	63
5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO POR LIBS	84
5.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE EDXRF E LIBS	92
6. CONCLUSÃO	94
REFERÊNCIAS	95

1. Introdução

Os instrumentos modernos de análise têm a capacidade de medir um grande número de variáveis e respostas em uma única amostra, necessitando cada vez mais de ferramentas que auxiliem na extração de informações relevantes, minimizando erros instrumentais e analíticos, e tratando os dados obtidos de forma a resultar informações confiáveis.

O aumento crescente da implementação de computadores nas diferentes análises químicas em laboratórios ajuda na aplicação de algoritmos matemáticos que facilitam os estudos de sistemas químicos complexos que têm suas análises dificultadas por conta de interferências químicas e espectrais, ruído instrumental, flutuações, efeitos provenientes da matriz, entre outros.

Aliado a obtenção de maiores quantidades de informações precisas em menor intervalo de tempo, outro fator que se busca alcançar é a análise para quantidades pequenas de amostras. Assim, técnicas não destrutivas têm sido foco de muitos trabalhos recentes. Não obstante, o desenvolvimento de metodologias que empreguem menor manipulação da amostra acarreta em diversas consequências positivas. Além de redução de custos e tempo, a minimização do consumo de reagentes e etapas de procedimentos metodológicos proporcionam menor geração de resíduos (desde provenientes de reagentes e de amostras, como também de consumíveis instrumentais) e redução no consumo de energia, minimizando impactos ambientais.

O maior problema no desenvolvimento de métodos com essas características, nas análises quantitativas em matrizes sólidas com pouco preparo de amostras, está na dificuldade de se obter métodos confiáveis e robustos. Técnicas como Espectroscopia de Emissão Óptica em Plasma Induzido por Laser (LIBS) e Fluorescência de Raios X (XRF) vêm sendo empregadas com esse propósito, além de suas usuais aplicações em análises qualitativas em caracterização de materiais. Para elas, como em outras técnicas similares, significativas interferências acarretam negativamente sobre as análises, principalmente na calibração que é a principal dificuldade encontrada na validação dos métodos propostos.

Inúmeras metodologias para correção de interferências foram propostas, tais como sistema de adição de padrão, sistema de calibração com padrões certificados e/ou de matrizes similares às amostras e métodos matemáticos quimiométricos (calibração multivariada, redes neurais, entre outros) (NAGATA et al., 2001).

O uso de ferramentas quimiométricas tem sido frequentemente associado a algumas técnicas, tais como LIBS e XRF, como poderosas fontes de calibração em análises de matrizes sólidas, quando a utilização de padrões de calibração é restrita e limitada. Nos trabalhos analíticos usando LIBS, aplicações de ferramentas que exploram métodos de classificação usualmente têm sido trabalhadas com SIMCA (modelagem independente por similaridade de classes, do inglês *Soft Independent Modeling by Class Analogy*), PCA (análise de componentes principais, do inglês *Principal Component Analysis*) e PLS (regressão por mínimos quadrados parciais, do inglês *Partial Least Squares*).

Os trabalhos desenvolvidos nos últimos anos têm destacado a técnica LIBS como fonte de análises qualitativas bem eficientes, na caracterização de matrizes, porém tem carências de estudos no desenvolvimento de metodologias complementares na sua aplicação como técnica quantitativa confiável e robusta. O mesmo acontece nas análises baseadas em emissão de fluorescência de raios X em matrizes sólidas.

Diante disso, estudos de desenvolvimento de metodologias com essas técnicas têm sido de grande importância no avanço da química analítica associada ao menor impacto ambiental. Portanto, este trabalho faz um estudo no desenvolvimento de metodologia por XRF e LIBS de forma a determinar elementos em macroalgas marinhas, matriz de importantes aplicabilidades na atualidade. Devido a essas técnicas serem passíveis de significativas interferências, principalmente em matrizes complexas como plantas, o que acarreta na confiabilidade dos resultados, diferentes alternativas de calibração foram testadas a fim de dar maior aplicabilidade nas análises. Foram empregadas ferramentas quimiométricas nas determinações e interpretação de dados e comparação por técnica validada.

2. Objetivos

2.1 GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver procedimentos analíticos visando análise elementar de amostras de macroalgas marinhas de forma direta, rápida e precisa.

2.2 ESPECÍFICOS

- Desenvolver procedimento analítico por EDXRF para determinação de macro-minerais em macroalgas marinhas.
- Avaliar calibração univariada e parâmetros de desempenho da metodologia por EDXRF.
- Estudar espectros de emissão de fluorescência de raios X na determinação de padrões para caracterização das amostras de macroalgas com auxílio de ferramentas quimiométricas.
- Construir modelos empíricos multivariados de calibração utilizando a técnica de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) em função dos espectros obtidos das análises por LIBS para predição de concentrações de macro-minerais em algas.
- Avaliar a estratégia quimiométrica para otimização das condições experimentais e o emprego de calibração multivariada visando a determinação simultânea de macroelementos em macroalgas marinhas por LIBS.
- Comparar e verificar exatidão das metodologias propostas a partir de método validado por ICP OES.

3. Fundamentação Teórica

3.1 MACROALGAS MARINHAS

No planeta Terra, cerca de três quartos da superfície estão cobertos por mares e oceanos. Neles, há uma riqueza de organismos aquáticos, destacando-se as algas. Estas podem ocorrer em todos os ambientes do planeta, exceto nas regiões arenosas desérticas (BICUDO; BICUDO, 1970; FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Existem as algas unicelulares que vivem geralmente suspensas nos corpos d'água e são consideradas planctônicas, e as macroalgas, que por sua vez são multicelulares e geralmente vivem fixas, fazendo parte dos bentos (LAVRADO; IGNACIO, 2006).

Estima-se que existam cerca de 1,5 milhão de algas no planeta Terra (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012), e alguns fatores importantes determinam a presença das macroalgas no ambiente como: luz, nutrientes, temperatura, salinidade e substrato. São organismos fotossintetizantes e contribuem para o funcionamento dos ecossistemas costeiros, na medida em que são grandes repositores de oxigênio no meio, absorvem e transformam nutrientes inorgânicos além de fazerem parte do elo primário da cadeia alimentar. No ambiente marinho, as macroalgas servem ainda de abrigo, local de desova e alimentação para diversas espécies de animais (LAVRADO; IGNACIO, 2006; CARIDADE; CORREIA, 2007).

As macroalgas marinhas estão reunidas em três filos: Chlorophyta (algas verdes ou clorofíceas), Ochrophyta (algas pardas ou feofíceas) e Rhodophyta (algas vermelhas ou rodofíceas).

As algas vermelhas (Rhodophyta) estão representadas por cerca de 700 gêneros e cerca de 4000 a 6000 espécies. Essas são predominantes em ambiente marinho, embora cerca de 100 espécies ocorram em ambiente de água doce (COLE; SHEATH, 1990). O cloroplasto de dupla membrana das algas vermelhas contém além de clorofila **a**, carotenos e xantofilas, ficobilinas, que mascaram a cor da clorofila e confere às rodofíceas sua coloração vermelha característica. O produto de reserva é o amido das florídeas. Uma característica importante do grupo é a ausência de centríolos e de células flageladas. A parede celular é composta por microfibrilas de celulose (em alguns casos, podendo ser substituída por manose ou xilose) e por

camada mucilaginosa, composta de galactana sulfatada (ágar ou carragenana). Alguns gêneros de algas vermelhas depositam carbonato de cálcio nas paredes celulares, o que muitas vezes conferem dureza ao talo. A organização do talo pode ser desde unicelular, rara, até filamentosa, predominante nas rodófitas (RIVIERS, 2006).

As algas pardas (Ochrophyta/Phaeophyceae) compreendem cerca de 270 gêneros e 1500 espécies (RIVIERS, 2006), sendo predominantemente marinhas. Apresentam grande diversidade do talo, podendo ser constituídos desde filamentos microscópicos até talos parenquimatosos, em forma de fita estreita, ventarola, vesículas, crostas, dentre outros. Não ocorre organização unicelular. Nessa classe são encontradas as maiores algas do planeta, a exemplo dos kelps (*Macrocystis*, *Laminaria*, *Nerocystis*). O cloroplasto presente nas células é composto por quatro membranas sendo que a mais externa envolve o núcleo. Como pigmentos fotossintéticos apresentam a clorofila **a** e **c**, fucoxantina, xantofila, que confere coloração marrom-escura característica, além de carotenos; o produto de reserva proveniente da fotossíntese é a crisolaminaria, armazenado dentro de vesículas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). O flagelo presente nas células móveis (gametas ou esporos) é geralmente em número de dois, sendo um liso e outro franjado com mastigonemas tripartidos, exceto na ordem Dictyotales que apresenta um flagelo franjado (RIVIERS, 2006).

As clorofíceas (Chlorophyta) são as algas mais diversificadas quanto à organização do talo, incluindo desde formas unicelulares flageladas e não flageladas, coloniais móveis ou não, filamentosas até laminares. Estas são cosmopolitas, ocorrendo desde ambiente de água doce até o marinho. Incluem cerca de 600 gêneros e 17 mil espécies. O cloroplasto de dupla membrana presente nas células das clorofíceas contém além de clorofila **a** e **b**, carotenos e xantofilas (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). O produto de reserva, que é oriundo da fotossíntese, é o amido.

A divisão engloba cinco classes, Prasinophyceae, Pedinophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae e Ulvophyceae, esta última incluindo representantes quase que exclusivamente marinhos (RIVIERS, 2006). Em Ulvophyceae os gêneros apresentam desde organização filamentosa, até talos compostos de lâminas achatadas ou formados por talos macroscópicos e multinucleados. Uma das características das Ulvophyceae é a presença de mitose

fechada, na qual o envelope nuclear persiste durante todo processo de divisão celular; o fuso mitótico é persistente durante a citocinese.

As algas são organismos de grande importância econômica, ambiental e nutricional. As macroalgas marinhas são consideradas ótimos biomonitores e indicadores ambientais. Segundo Callisto e Gonçalves Júnior (2005), bioindicadores são ferramentas que podem ser utilizadas na avaliação da saúde ambiental, integridade ecológica e preservação de ecossistemas aquáticos. O uso desses organismos como bioindicadores é baseado em um princípio simples: submetidos a condições adversas, os organismos se adaptam ou morrem. Os organismos que vivem em um dado ecossistema estão adaptados às suas condições ambientais e, por isso, devem refletir o nível de preservação de condições naturais ou as alterações provocadas pela emissão de poluentes ambientais.

Conforme Johnson, Wiederholm e Rosenberg (1993), um indicador biológico ideal deve ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível por não especialistas; apresentar distribuição geográfica ampla; ser abundante ou de fácil coleta; ter baixa variabilidade genética e ecológica; preferencialmente possuir tamanho grande; apresentar baixa mobilidade e longo ciclo de vida; dispor de características ecológicas bem conhecidas; e possibilidade de uso em estudos em laboratório.

O uso de bioindicadores ou biomonitores macrobentônicos apresentam vantagens, pois fornecem medidas diretas da condição da biota e podem revelar problemas não detectados ou subestimados por outros métodos (BORJA; FRANCO; PÉREZ, 2000); a sua mobilidade limitada impede que escapem condições adversas como o acúmulo de poluentes de origem antrópica (KINGSTON et al., 1995; WEISBERG et al., 1997; PAUL et al., 2001); respondem a múltiplas condições sobre relativamente longos períodos de tempo (KINGSTON et al., 1995; RANASINGHE et al., 2002); e têm uma diversidade taxonômica que geralmente podem ser classificados em resposta funcional de diferentes grupos (SMITH et al., 2001).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos empregando as macroalgas marinhas como indicadores de poluição. Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de algumas espécies acumularem metais em seus talos, sendo enquadradas como bons monitores de contaminação metálica em ambientes aquáticos (MACHADO; FERREIRA; ZALMON, 2003; TUZEN et al., 2009; PÉREZ et al., 2007; SAWIDIS et al., 2001; CONTI; CECCHETTI, 2003; CHAUDHURI et al. 2007;

ABDALLAH; ABDALLAH; BELTAGY, 2005; AKCALI; KUCUKSEZGIN, 2011; BRITO et al., 2012). Macroalgas marinhas são capazes de absorver íons de metais. Comparadas com outros organismos de mesma capacidade, como fungos, bactérias, leveduras e microalgas, elas têm a vantagem de estar facilmente disponíveis, apresentam custo baixo e maior capacidade para absorção dos metais (SANDAU et al., 1996). A capacidade de bioacumulação de metais em algas deve-se ao fato de que a suas células têm grande área superficial com sítios ativos capazes de interagir com os íons metálicos presentes no meio.

Sua superfície é composta de muitas macromoléculas como proteínas e carboidratos que têm grande facilidade de reagir com as espécies metálicas (OLIVEIRA; KLEINÜBING; SILVA, 2005). Na parede celular encontram-se os principais sítios de captação, os quais incluem amina, amida, imidazol, hidróxido, carboxilato, fosfato, tiol, tioéter, entre outros (CID et al., 1995; CRIST et al., 1981) que mantêm alguns desses íons metálicos capturados funcionando como micronutrientes essenciais (VILLARES; CARBALLEIRA, 2004).

Além dos metais, a determinação de alguns outros elementos, como N e P, pode ser estudada na avaliação do impacto ambiental das descargas de efluentes. Como exemplo, sob condições adversas, com maiores lançamentos de produtos nitrogenados no meio aquático, o nitrogênio pode ser estocado nas espécies da divisão rodófitas na forma de nitrato ou como pigmentos fotossintetizantes, ácidos aminados e proteínas (NALDI; WHEELER, 1999; LAPOINTE, 1981).

A quantificação de diversos elementos foi capaz de estudar o efeito de bioremediador das macroalgas, no sentido de verificar a potencial capacidade de filtração das águas pelas mesmas, apresentando maior eficiência e minimização de custos (GUPTA; SHRIVASTAVA; JAIN, 2001). Muitos estudos foram feitos avaliando a sorção de diferentes elementos, principalmente os potencialmente tóxicos, pelas algas (PLAZA et al., 2011; VOLESKY; PRASETYO, 1994; CRIST et al., 1994; FOUREST; VOLESKY, 1996; COSTA et al., 1995; SARAIVA; TAVARES, 1997; DÖNMEZ et al., 1999; HAYASHI, 2001). Biosorção pode ser definido como a remoção de espécies metálicas ou metaloide, compostos e partículas da solução por material biológico e grandes quantidades de espécies podem ser acumuladas por diferentes processos independente do metabolismo (WANG; CHEN, 2009). Conforme Costa e colaboradores (1995), os polissacarídeos presentes na parede celular são os principais responsáveis pela captura de íons metálicos em solução.

Outro fator importante a ser considerado sobre as algas marinhas é seu potencial valor econômico agregado. Anualmente, milhões de toneladas de algas são coletadas no mundo, tendo destaque no Japão e China, como também nos EUA e Noruega. Elas são fontes de matéria-prima para diversos produtos de elevado consumo pelo homem. Alguns deles, produzidos largamente e comercializados há décadas, são: produtos abrasivos, cremes dentais, produtos cosméticos, fertilizantes, fonte de alimento humano e animal e extração de ficocolóides como alginato, ágar e carragenana. Estes ficocolóides são usados como espessantes, emulsificantes e estabilizantes, aplicados na fabricação de gomas e produção de diversos alimentos como iogurtes, flans, sorvetes, achocolatados, salsicha, presunto, gelatinas e geleias, bem como na indústria não alimentícia no fabrico de tintas, têxteis, perfumes, fármacos, dentre outros, produzidos principalmente pelas algas vermelhas (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; POMIN; MOURÃO, 2006; YOKOYAMA; GUIMARÃES, 1975).

No Brasil, *Gracilaria* spp. e *Hypnea* spp. são as principais macroalgas marinhas vermelhas cultivadas experimentalmente para extração do ágar e da carragenana, respectivamente, sendo o cultivo viável em praticamente todas as regiões do país, porém encontra-se mais desenvolvido entre os estados do Ceará, Rio Grande do Norte e da Paraíba (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004; OSTRENSKY; BORGHETTI; SOTO, 2008; CAVALLI; FERREIRA, 2010).

São hoje conhecidas outras aplicações das macroalgas como na regeneração óssea para enxertos odontológicos, compostos por fosfato de cálcio proveniente de algumas espécies, entre outras (TEIXEIRA, 2013). Para substituição de fontes de energia não renováveis, há a aplicação de algas para produção de biodiesel, as quais são responsáveis por uma produção de óleo por hectare 24 vezes maior quando comparada a cultura de palmeiras, e consideradas menos custosas e ajudam a reduzir emissões de carbono na atmosfera (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Este último está sendo impulsionado no Brasil com o desenvolvimento de indústria no estado de Pernambuco para produção de biocombustível. O projeto está sendo financiado pelo grupo brasileiro JB, produtor de etanol no nordeste do Brasil e a empresa See Algae Technology (SAT), da Áustria, mas o produto ainda precisa ser aprovado e validado pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) (CARVALHO, 2012).

Utilizada na nutrição humana, as algas são importantes alimentos funcionais, ou seja, além dos nutrientes básicos, possuem propriedades de prevenção ou diminuição dos sintomas de algumas doenças (enfermidades cardiovasculares,

hipertensão, inflamações, asma, artrite, psoríase e alguns tipos de câncer). Esses efeitos são atribuídos principalmente à presença de ácidos graxos n-3. As algas são ricas fontes de ácido α linolênico 18:3 (n-3), ácido docosahexaenóico (DHA) 22:6 (n-3) e ácido eicosapentaenóico (EPA) 20:5 (n-3), sendo o primeiro ácido graxo essencial (não produzido pelo organismo humano), e os seguintes ácidos graxos altamente insaturados, respectivamente (SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002; STANGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Como estudado por Souza e colaboradores (2008), numa avaliação nutricional em 32 espécies de algas marinhas *in natura*, coletadas no estado de Ceará, além dos ácidos graxos, carotenoides provitamina A e vitamina E, também são encontrados nas algas, principalmente nas do gênero Chlorophyta, α , β -caroteno e α -tocoferol. A presença de polissacarídeos, como alginatos, fucanos e laminaranos, além de numerosas substâncias antioxidantes, vitaminas, fibras, proteínas e minerais (RAO; MANTRI; GANESAN, 2007; ORTIZ et al., 2006), associada a baixo teor de gordura, qualificam as algas como um aliado na boa alimentação humana (ROCHA et al., 2007; RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004).

Para garantir a segurança alimentar, controle ambiental eficiente e fabrico de produtos de alta qualidade, estudos sobre o teor de elementos químicos em macroalgas marinhas, que podem influenciar no processo industrial e controle de qualidade, impactos na saúde humana (minerais tóxicos e avaliação da composição nutricional) e ambiental, são de fundamental importância, devido a abrangência dessas pesquisas em diversas aplicações.

3.2 PROCEDIMENTOS E TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

Antes da análise da amostra, é importante fazer uma correta amostragem para garantir a confiabilidade dos resultados de forma a representar a composição de todo um universo amostral, sendo fundamental para representatividade estatística de um material foco, de uma determinada análise química. Qualquer desvio durante a etapa de amostragem pode significar um erro de exatidão ou de precisão da análise (ASTM E877, 2008).

Seguindo a marcha analítica para uma análise química, a primeira etapa desta consiste em submeter a amostra a um tratamento adequado, visando a sua utilização

nas etapas subsequentes. É a etapa mais crítica, demorada e custosa do protocolo analítico, e objetiva que os analitos presentes estejam em uma forma adequada para serem determinados por uma técnica ou método analítico (PRIEGO-CAPOTE; CASTRO, 2004).

Na atualidade, muitos trabalhos são desenvolvidos com intuito de avaliar a concentração elementar em macroalgas marinhas, como citado anteriormente. Geralmente, as amostras passam por processos diversos de tratamento a fim de determinar os elementos, sendo escolhidos em função de: método utilizado, objetivos e faixas de concentração elementar. Os constituintes determinados em um procedimento analítico podem abranger uma enorme faixa de concentração. Os majoritários são aqueles que estão presentes na faixa de peso relativo entre 1% e 100%. As espécies de interesse na faixa de 0,01% a 1% são geralmente denominadas constituintes minoritários, enquanto aquelas presentes em quantidades entre 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ (0,01%) e 1 ng g^{-1} são denominadas “constituintes traço”. Já os componentes em quantidades inferiores a 1 ng g^{-1} são considerados “constituintes ultratraço” (SKOOG et al., 2006).

Um fator importante na escolha do procedimento de preparo de amostra é sua adequação à técnica de quantificação a ser utilizada. O ideal é que essa etapa seja rápida, eficiente, com níveis de contaminação que não interfiram nos resultados, apresente menores custos, tenha alta frequência analítica e, em anos mais recentes, a preocupação que seja ambientalmente menos impactante.

Como a maioria das técnicas disponíveis atualmente necessita que a amostra seja líquida, a transformação do seu estado físico tem que estar bem relacionada com a fração de analitos disponíveis para determinação. Assim, a espécie química tem que se apresentar numa condição apropriada para análise no método de determinação a ser aplicada. A grande parte de trabalhos da literatura faz os estudos de níveis de elementos químicos em macroalgas marinhas por decomposição da amostra.

Alguns procedimentos de decomposição são feitos por meio de técnicas de digestão, tais como, fusão ou dissolução ácida, sendo que, por essas vias, a amostra acaba sendo diluída e o analito fica em uma concentração que muitas técnicas de análise não são capazes de detectar, ocasionando perda em sensibilidade no procedimento analítico. Muitas vezes o pré-tratamento da amostra demanda o uso de reagentes de alto grau de pureza, de alto custo, é tedioso e exige do analista prática e experiência. Dessa forma, torna o procedimento muitas vezes não acessível e

indisponível no laboratório de análise e principalmente, por ocorrer em várias etapas e exigir uma grande manipulação da amostra, propicia maiores chances de apresentar erros associados ao método (MAGALHÃES; ARRUDA, 1998). Erros sistemáticos devido à contaminação ou perdas por volatilização estão entre os mais frequentes, podendo afetar diretamente a exatidão e precisão dos resultados analíticos.

Uma alternativa para superar essas limitações está em realizar análise direta da amostra sólida, com um mínimo de manipulação da mesma. Como é abordado no trabalho de Nomura e colaboradores (2008), podem ser empregados para esse tipo de análise o uso de suspensões ou a análise direta em uma amostra sólida em pó ou prensada, com tamanho de partícula controlado. Dessa forma, algumas facilidades são incorporadas ao método e certos inconvenientes são minimizados ou mesmo eliminados, tais como: simplificação no pré-tratamento da amostra, possibilitando reduzir o tempo gasto nessa etapa, aumentando, assim, a frequência analítica; minimização dos riscos de contaminação devido ao uso de quantidades reduzidas de reagentes, pouca manipulação ou baixa exposição ao ambiente; minimização das perdas do analito, principalmente por volatilização, derramamento e/ou adsorção em frascos reacionais; menor periculosidade devido a não utilização de reagentes tóxicos ou corrosivos; minimização de geração de resíduos, o que permite classificar os métodos dentro da química verde; e maior detectabilidade, uma vez que as amostras não são diluídas.

Algumas técnicas estão disponíveis no mercado que atendem a necessidade de se trabalhar com amostragem sólida, sendo que algumas delas funcionam com amostrador sólido acopladas a outras técnicas, tais como AAS, ICP OES, ICP-MS. Dentre elas, tem-se: atomização eletrotérmica (ex.: forno de grafite, filamento de tungstênio), sistema de vaporização por laser (ex: ablação a laser acoplado, LIBS), fluorescência de raios X (XRF), dentre outras.

3.2.1 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X

A análise por XRF é normalmente um procedimento simples, no qual o tempo para se realizar uma análise é baixo, considerando as etapas anteriores, desde o preparo de amostra. Ainda assim, a preparação de certos materiais pode ser uma tarefa difícil pela complexidade em tornar a amostra adequada para análise.

Os raios X podem ser gerados pelas técnicas analíticas, segundo Holler, Skoog e Crouch (2009), de 4 formas:

(1) pelo bombardeamento de um alvo metálico com um feixe de elétrons de alta energia, (2) pela exposição de uma substância a um feixe primário de raios X para gerar um feixe secundário de fluorescência de raios X, (3) pelo uso de uma fonte radioativa cujo processo de decaimento resulta na emissão de raios X, e (4) a partir de uma fonte de radiação síncrotron (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A técnica de XRF apresenta características que superam limitações de muitas técnicas espectrométricas, como: capacidade para a realização de determinações multielementares simultâneas (tipicamente, de sódio até urânio); capacidade para análise qualitativa e quantitativa; operação com amostras sólidas e líquidas; apresentação de caráter não-destrutivo; e independe da forma química em que as espécies de interesse se encontram (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Por ser uma técnica que muitas vezes utiliza pequenas quantidades de amostra e não é destrutiva, ela é muito aplicada em áreas que necessitam da conservação da amostra, como arqueologia, artes (pintura, cerâmica), além da análise em matrizes biológicas, entre outras.

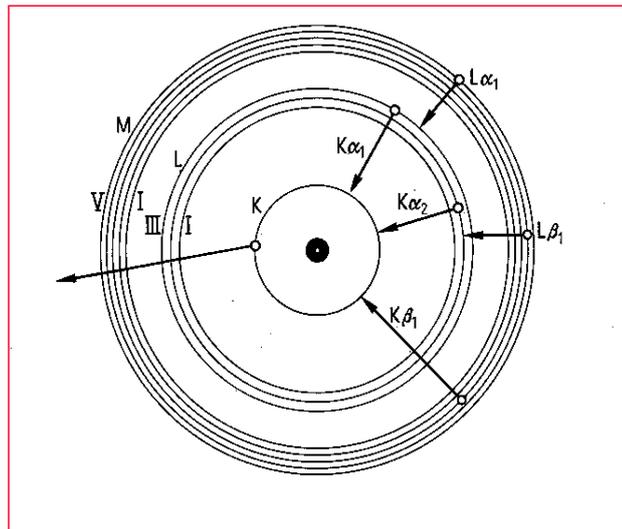
A XRF pode ser classificada como uma técnica de emissão atômica, fundamentada no efeito fotoelétrico. A análise por espectrometria de fluorescência de raios-X é baseada no fato de que os elementos químicos emitem radiações características quando submetidos a uma excitação adequada. Na XRF, a diferença de potencial aplicada para acelerar os elétrons da fonte catódica (de até 100 kV) se converte em parte, após a colisão com o alvo, em raios X, podendo-se obter um espectro contínuo ou de linhas superposto a ele, a depender das condições aplicadas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Conforme Holler, Skoog e Crouch (2009), o espectro contínuo é uma consequência da desaceleração dos elétrons incididos após as colisões ocorridas entre eles e os átomos da amostra, e a diferença de energia cinética do elétron produz um fóton de raios X (fluorescência) de energia equivalente. Dentro de um feixe emitido, as sucessivas colisões promovem diferentes variações de energia, gerando diferentes energias de fótons de raios X emitidos de um mesmo elemento do alvo, dentro de um intervalo de comprimento de onda (medidas em Å). Além desses, linhas de emissão intensas são produzidas e consistem em duas séries de linhas para cada elemento: K (grupo de menores comprimentos de onda) e L (maiores comprimentos de onda),

sendo que elementos de número atômico inferiores a 23 possuem apenas a série K. Além disso, quanto maior o número atômico, maior a voltagem necessária para aceleração mínima de excitação das linhas.

O espectro de linhas de raios X são provenientes de transições eletrônicas em orbitais atômicos mais internos, de onde são ejetados elétrons após a colisão. Para estabilização desta forma excitada, elétrons das camadas eletrônicas mais externas caem rapidamente para as vacâncias geradas, liberando a diferença de energia existente entre os dois níveis de energia envolvidos (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Diferentes processos de transições geram as linhas das séries K e L, conforme pode ser visualizado na Figura 1, a seguir:

Figura 1. Transições eletrônicas provenientes de emissão de raios X.



Fonte: Manual Bruker AXS (2003).

A série K é produzida pela emissão de uma fração quantizada de radiação X, após a formação de íons gerados pela colisão de elétrons proveniente da fonte quando removem elétrons dos orbitais internos atômicos e os elétrons de orbitais externos sofrem transições para o orbital vazio. Essa série é proveniente, então, das transições eletrônicas de níveis mais energéticos e a camada K. Sinais em diferentes comprimentos de onda podem ser gerados (α e β), em regiões de maior e menor \AA , respectivamente. A série L é produzida principalmente como consequência do que ocorre para gerar a série K. Elas são geradas com a perda de elétron no segundo nível principal, após a ejeção por um elétron do catodo ou da transição de um elétron

L para o nível K, que acompanha a produção de um quantum de radiação K (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

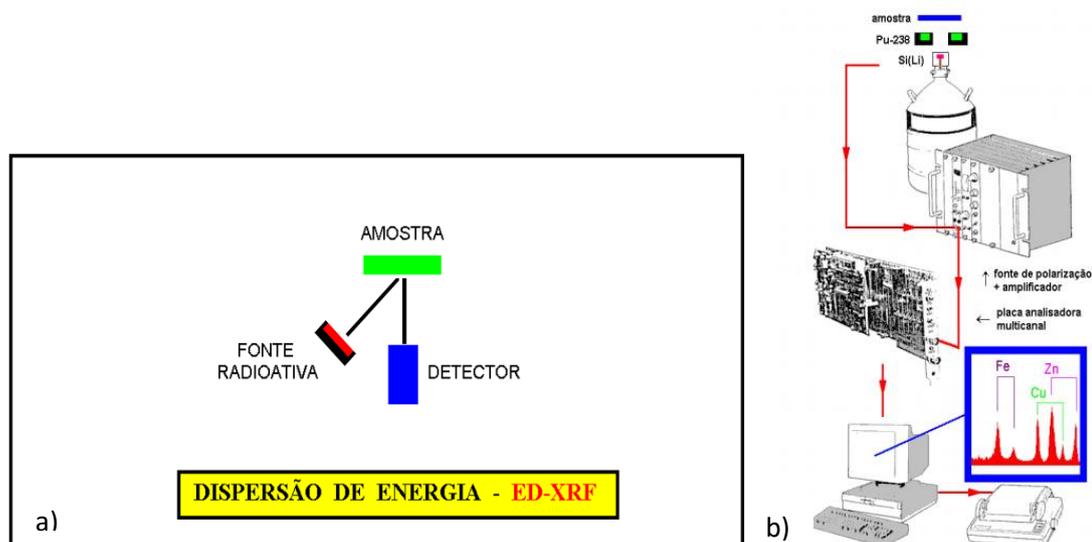
Essas transições eletrônicas e emissões de radiação X em determinadas energias são características de cada elemento, podendo ser identificada a espécie presente no alvo bombardeado pela radiação. Como a intensidade da radiação emitida é diretamente proporcional à concentração da espécie, a técnica também fornece informações quantitativas (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Pode-se dizer, de forma geral, que a análise por essa técnica possui basicamente três estágios: a excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X.

Até 1966, a XRF era realizada unicamente por espectrômetros por dispersão de comprimento de onda (WD-XRF, abreviação de *wavelength dispersive X-ray fluorescence*), baseados na lei de Bragg, os quais necessitam de um movimento sincronizado e preciso entre o cristal difrator e o detector. Com o desenvolvimento do detector semicondutor de Si(Li), capaz de discriminar raios X de energias próximas, foi possível o surgimento da fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), também conhecida como fluorescência de raios X não dispersiva (SANTOS et al., 2013).

A EDXRF apresenta instrumentação menos dispendiosa e emprego mais prático (NASCIMENTO FILHO, 1999), como pode ser observado nos esquemas da Figura 2. O termo “energia dispersiva” refere-se à técnica de detecção dos raios-X emitidos, que é efetuada por um detector de Si que gera um espectro de intensidade em função da energia. A intensidade da energia característica emitida pelos componentes da amostra está relacionada com a concentração de cada elemento presente (ALEXANDRE; BUENO, 2006).

Um espectrômetro de raios X dispersivo de energia consiste numa fonte policromática, um amostrador, detector semicondutor e componentes eletrônicos para fazer a discriminação de energia, não possuindo partes móveis como um WD-XRF e acaba sendo mais barato que esse. Este tipo de equipamento, apesar das vantagens sobre as técnicas espectrométricas mais usuais, não tem uma sensibilidade tão elevada. A faixa pode atingir de 1 a 20 ppm, a depender da amostra e do elemento em estudo (WASTOWSKI et al., 2010). O resultado do espectro de XRF mostra a intensidade dos raios-X, geralmente em contagens por segundo (cps), como uma função da energia, em keV.

Figura 2. ED-XRF: a) representação esquemática da técnica, b) equipamento simplificado de um instrumento com excitação por fonte radioativa.



Fonte: Nascimento Filho (1999).

É considerada uma técnica seletiva, com espectros mais simples quando comparados com a emissão ultravioleta. Possui elevada robustez, tendo os comprimentos de onda das linhas de raios X características independentes do estado físico e químico do elemento, já que as transições eletrônicas que ocorrem não envolvem elétrons que participam de ligações químicas. Por outro lado, a XRF é passível de algumas interferências. A principal é decorrente do efeito de matriz, além de ocorrer efeitos sobre a estrutura física da matriz (para sólidos inteiros, em pó e prensados), além de interferências espectrais, como descritas a seguir.

Parte dos problemas de interferência em análise de sólidos é resultado de amostras heterogêneas. Segundo Nagata, Bueno e Peralta-Zamora (2001), em XRF, esse fenômeno é agravado pelo efeito do tamanho das partículas presentes em amostras e padrões. A irradiação sobre a amostra acaba sendo também heterogênea e causa sombras nas partículas de menores granulometria, quando essas encontram-se nas proximidades de partículas significativamente maiores. Porém, recursos podem ser utilizados para minimização desse efeito, como métodos de moagem, peneiramento e posterior homogeneização da amostra.

Uma outra dificuldade encontrada por interferências nas análises é a sobreposição de linhas espectrais das espécies. Elementos próximos na Tabela Periódica apresentam características similares, como no caso a que influencia nessa

técnica, energia de excitação dos elétrons, causando a emissão de fótons de raios X de energia muito próximas. A depender da proximidade entre os elementos, intensidade do sinal e resolução do equipamento, há grandes possibilidades de interferências positivas sobre o sinal analítico (SCHIMIDT; BUENO; POPPI, 2002).

A mais difícil de superação é decorrente dos efeitos de matriz. Conhecido também como efeito interelementos, esse tipo de interferência é causada basicamente por fenômenos de absorção ou intensificação do sinal de emissão, por parte dos outros elementos que compõem a matriz amostral (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Numa análise de sólido, a interferência é ainda mais intensificada. Num processo de fluorescência os raios X são gerados pelos átomos da superfície e dos átomos logo abaixo. Com isso, parte da radiação incidente e da resultante da fluorescência atravessam camadas da amostra onde podem ocorrer fenômenos de absorção e/ou espalhamento. Dessa forma, a intensidade de radiação que alcança o detector depende não só da concentração do analito como também é influenciada pela concentração e coeficiente de absorção dos demais elementos da matriz (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Mesmo assim, em análise de sólidos, o uso de padrões que simulem a matriz, correções matemáticas e aplicações de ferramentas quimiométricas minimiza potencialmente esse efeito.

Contudo, a XRF apresenta-se como uma técnica vantajosa, dentro de algumas perspectivas, como já citado anteriormente, além do desenvolvimento de dispositivos portáteis que propiciou o aumento no emprego para análises qualitativas e quantitativas em diversas matrizes (SIL et al., 2010; ROLDÁN et al., 2010; PAGÈS-CAMAGNA et al., 2010; GRIETEN; CASADIO, 2010; NIE et al., 2011; SHEPPARD et al., 2011; HOCQUET et al., 2011; GOODALE et al., 2012; ABE et al., 2012; LIU et al., 2013; BONIZZONI et al., 2013; BUSTAMANTE et al., 2013; CESAREO et al., 2013; KAJIYA et al., 2014; NEIVA et al., 2014). Em contrapartida, na literatura, não há trabalhos sobre determinação direta de elementos em macroalgas marinhas.

3.2.2 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUZIDO POR LASER

A espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) é uma técnica que, apesar de existir como ferramenta analítica desde os anos 1960, teve um grande impulso na aplicação em análises quantitativas de elementos

químicos no fim dos anos 1990, devido ao avanço tecnológico na construção e desenvolvimento de dispositivos mais eficientes, potentes, de custo mais acessível e miniaturizados (SANTOS JÚNIOR et al., 2006).

Sua origem deveu-se aos estudos dos lasers e suas capacidades associadas. O primeiro impulso foi após a invenção do laser de rubi na década de 1960. Ele foi usado para produzir vapores na superfície de materiais metálicos e não metálicos e posteriormente excitados por uma fonte de energia auxiliar para formar um microplasma com objetivo de detectar seu espectro de emissão. Nesse momento, as atenções à formação de plasma induzido foram aumentadas. Nessa mesma década, alguns artigos foram publicados aplicando-se essa técnica em análises de diferentes matrizes, quando um primeiro equipamento foi desenvolvido e primeiramente lançado comercialmente pela VEB Carl Zeiss, Jena. Devido aos elevados custos instrumentais, potências relativamente baixas dos lasers, quando comparados aos de atualmente, e desempenho inferior às técnicas difundidas até então, LIBS foi deixada de lado por alguns anos (RADZIEMSKI; CREMERS, 2013).

Na literatura pode-se encontrar diferentes nomes para essa técnica. Inicialmente fora denominada LIPS (espectroscopia de plasma induzido por laser, do inglês *Laser Induced Plasma Spectroscopy*), LASS (do inglês *Laser Spark Spectroscopy*) ou LIES (*Laser Induced Emission Spectroscopy*). Posteriormente foi denominada LIB OES (*Laser Induced Breakdown Optical Emission Spectrometry*), usando o “breakdown” pelo efeito de ruptura dielétricas das ligações moleculares do material que ocorre anteriormente à formação do plasma e envolve propriedades da amostra, como elasticidade e compressibilidade. Porém, desde 2005 o termo LIBS foi estabelecido por convenção internacional (AMARAL, 2008; GODOI, 2011).

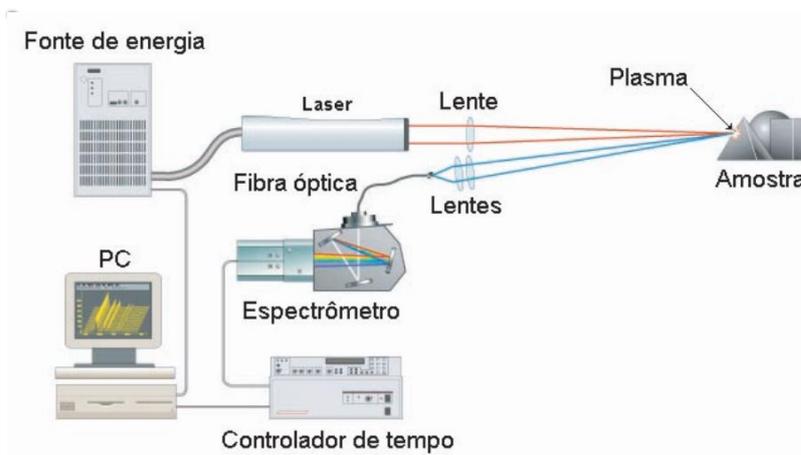
LIBS é uma técnica espectroanalítica que promove a excitação dos átomos e emprega a ablação a laser nas microamostragens. O princípio fundamental da LIBS está baseado na aplicação de laser pulsada de alta energia sobre amostra (sólida, líquida ou gasosa), criando uma ruptura dielétrica, originando um plasma. A alta temperatura gerada no meio fornece energia suficiente para promover a transição dos átomos dos níveis fundamentais aos mais energéticos. O retorno ao estado fundamental libera energia característica do elemento anteriormente excitado, gerando um espectro de linha (PASQUINI et al., 2007).

Como o próprio nome indica, a fonte de excitação em LIBS é a fonte de laser pulsada. Usualmente, cada pulso de laser gera um único espectro de emissão, ou

seja, uma única medida em LIBS. Lasers são fontes de alta irradiância (W/cm^2), usualmente chamada de Intensidade, necessária para a formação do plasma. Para LIBS com pulso de nanosegundo, a energia varia tipicamente entre 10 e 100 mJ. Durante essa aplicação, ocorrem os seguintes fenômenos: aquecimento, vaporização, dissociação de molécula, ignição e expansão do plasma, atomização e ionização, excitação de átomos e íons e emissão óptica. Segundo Amaral (2008), muitas características dos lasers influenciam na análise em LIBS como: a densidade de potência do pulso focalizado (irradiância), a energia do pulso, o comprimento de onda, a qualidade do feixe e a divergência do feixe laser. Apesar de teoricamente poder gerar plasma com feixes de comprimento de onda tanto no ultravioleta (UV), no visível quanto no infravermelho (IR), alguns comprimentos de onda podem acoplar mais fortemente em determinados materiais tornando a ablação mais eficiente. Um laser na região do UV é mais eficiente para ablacinar materiais, enquanto um laser no IR é mais eficiente no processo térmico do plasma.

A instrumentação da LIBS é similar às outras técnicas baseadas em espectroscopia de emissão atômica. A principal diferença está no uso de laser como fonte de excitação. Os principais componentes são: fonte de laser pulsada, sistema de focalização com espelhos e lentes que foca o laser sobre a amostra, espaço da amostra, sistema de lentes que direciona a luz após a ablação ao detector, sistema de detecção com filtros para dispersão da luz, sistema eletrônico computacional para transformação e armazenamentos de dados e geradores do espectro (CREMERS; RADZIEMSKI, 2006). A Figura 3 apresenta um esquema da instrumentação da técnica.

A maioria dos equipamentos opera com laser do tipo Nd:YAG (meio ativo contendo ítrio e alumínio dopado com íons neodímio), pois este fornece confiáveis, compactas e fáceis fontes de laser pulsada de alta densidade de potência focalizada. Além disso, emite radiação em comprimentos de onda que abrange regiões espectrais do infravermelho próximo ao ultravioleta. As especificações convencionais de um Nd:YAG de laboratório são: pulso de energia de até 450 mJ; taxa de repetição de 10 Hz; estabilidade de energia de aproximadamente 2%; potência requerida de 220 V de corrente alternada e 12 A (CREMERS; RADZIEMSKI, 2006).

Figura 3. Esquema instrumental de um espectrômetro de LIBS.

Fonte: appliedphotonics (2015)

Até alguns anos atrás essa técnica estava limitada a poucos elementos numa única análise. Hoje em dia ela é capaz de monitorar todos os elementos químicos presentes na amostra ao mesmo tempo com um único pulso de laser na amostra (DELUCIA JÚNIOR et al., 2005).

Como técnica analítica, a LIBS apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas mais consolidadas como F AAS, GF AAS, ICP OES, ICP-MS, dentre outras. Pode-se destacar: pouca ou nenhuma preparação da amostra; análise e identificação de materiais químicos e biológicos em amostras sólidas, líquidas e gasosas; resultados em tempo real; análise *in situ*; baixo custo frente a outras técnicas mais difundidas; e, para a maioria dos casos, é uma técnica não destrutiva. Apesar dessas características, apresenta baixa sensibilidade na ordem de 1 ppm a 500 ppm, a depender do analito (AMARAL, 2008), quando comparadas às técnicas supracitadas.

Muitos trabalhos têm sido feitos com LIBS nos últimos anos, tanto em análises qualitativas, quanto em quantitativas. Esse fato está descrito conforme trabalho publicado por Santos Júnior e colaboradores (2006). Após o desenvolvimento de dispositivos tecnologicamente mais avançados, havia uma resistência no desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando LIBS como técnica. Por dez anos, entre 1985 e 1994, o número de publicações não chegava a 10 trabalhos por ano. Cinco anos mais tarde, até 1999, esse número cresceu, atingindo 40 publicações anuais. Daí até o ano de 2005, o desenvolvimento e divulgação cresceu exponencialmente, atingindo, em 2005, o número de 120 trabalhos.

Mais recentemente, diferentes aplicações em diversas matrizes são estudadas, como em amostras de cabelo (EMARA et al., 2013), resíduos eletrônicos (AGUIRRE et al., 2013), moedas (AMARAL, 2008), brinquedos (GODOI, 2011), amostras aquosas (YESILLER; YALCIN, 2013), material histórico-cultural (BRAI et al., 2009), microbiologia (BEDDOWNS; TELLE, 2005), ar (KOTZAGIANNI; COURIS, 2013), ligas metálicas (MOHAMED, 2008), vidro (NAES et al., 2008), material biológico (KAISER et al., 2012), matrizes ambientais (MUKHONO et al., 2013), material odontológico (SAMEK; TELLE; BEDDOWNS, 2001), além de revisões sobre histórico, fundamentos e aplicabilidades (ARAGÓN; AGUILERA, 2008; SANTOS JÚNIOR et al., 2006, 2012; KHATER, 2013; NOLL et al., 2001; RADZIEMSKI; CREMER, 2013; HAHN; OMENETTO, 2010; PASQUINI et al., 2007; TOGNONE et al., 2002). Alguns trabalhos abordam aplicações em plantas (TREVIZAN et al., 2008, 2009; GOMES et al., 2013; CARVALHO et al., 2012, 2015; KAISER et al., 2009; PEREIRA et al., 2010) e dois em algas, desenvolvidos por Garcimuño, Díaz Pace e Bertuccelli (2013) e Porizka e colaboradores (2012), com macroalgas e microalgas, respectivamente.

Adicionalmente às vantagens da LIBS mencionadas anteriormente, outra característica atraente da técnica é a possibilidade de realizar medidas a distância, possibilitando maior segurança ao analista em ambientes de alta periculosidade e em locais inacessíveis a outras técnicas analíticas. Apesar dessas características atraentes, ela tem sido empregada com certa facilidade em análises qualitativas, mas requer esforço considerável em análises quantitativas, face aos limites de detecção e às dificuldades de calibração (SANTOS JÚNIOR et al., 2006). Diante da limitação perante a calibração, trabalhos foram desenvolvidos tendo como foco fornecer alternativas para aplicações confiáveis, principalmente com uso de ferramentas quimiométricas (BULAJIC et al., 2002; GUPTA et al., 2011; MUKHONO et al., 2013; GOMES et al., 2013).

3.2.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências e permitir a obtenção do máximo de informações a partir da análise de dados químicos. Dessa forma, o desenvolvimento de um procedimento analítico torna-se mais rápido, simplificado, com mais expressividade, além de fazer uma classificação

das espécies químicas e interpretação de dados por reconhecimento de padrões (BRUNS; FAIGLE, 1985).

As técnicas espectrométricas têm capacidade de obter, numa única análise, em sua maioria, dados de centenas ou milhares comprimentos de onda. Essa quantidade de dados necessitou um avanço nos estudos de desenvolvimentos de programas matemáticos para que pudessem tratá-los eficientemente, obtendo informações relevantes, como a quimiometria (FERREIRA et al., 1999). Esta possui vários ramos, dentre os quais têm-se a etapa posterior às análises, para classificação e interpretação de resultados e a etapa anterior às análises, com predição de modelos. Este último estará descrito a seguir.

Em sistemas químicos, a concentração de uma ou mais espécies pode ser estimada a partir das medidas de suas propriedades como absorção de radiação eletromagnética que segue a lei de Beer-Lambert como uma relação linear entre o espectro e a concentração da amostra. Em determinações de um analito, bons resultados de proporcionalidade entre concentração e intensidade de radiação são obtidos com calibração a partir de soluções padrão (FERREIRA et al., 1999). Neste caso, a calibração em um sistema de medidas relaciona grandeza de entrada com a de saída. Essas grandezas envolvem uma função analítica, $x = f(q)$, representando a distribuição de analitos e suas concentrações, e uma função medida, $y = g(z)$, que muitas vezes, a depender da técnica empregada, pode ser um espectro (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAÚJO, 2002). É determinado um algoritmo matemático que, a partir de registros obtidos pela técnica numa análise, produza propriedades de interesse, prevendo a concentração do componente químico.

Porém, numa amostra real, efeitos de matriz podem causar interferências espectrais, ocasionando erros nas medidas (FERREIRA et al., 1999). Entre os métodos de calibração existentes, os mais difundidos são os univariados, tendo uma medida instrumental para cada uma amostra de calibração. Esses modelos apresentam restrições quanto a situações em que a grandeza medida diretamente no sistema esteja isenta de interferentes que causem desvios nas mesmas, entre sua relação linear e a propriedade de interesse (BRAGA; POPPI, 2004).

Na determinação de várias espécies presentes em matrizes complexas, a aplicação de análises multivariadas representa melhor a realidade da amostra, implicando em resultados mais precisos, bem como facilita a identificação de alguns

problemas com linha de base nas amostras usadas para calibração e de previsão (PIMENTEL; GALVÃO; ARAÚJO, 2008).

Nesse tipo de calibração são formados dois conjuntos de dados. Num primeiro, os espectros geram uma matriz de variáveis independentes, onde, nas linhas, são dispostas as respostas medidas para cada amostra, e nas colunas, os comprimentos de onda específicos. Em outro conjunto de dados, há duas ou mais variáveis dependentes, geradoras de outra matriz. Dessa forma, há primeiramente o processo de geração de modelos com o conjunto de amostras de calibração, estabelecendo uma relação matemática entre as duas matrizes, e posteriormente a validação, com outro conjunto de amostras, otimizando essa relação. Após a conclusão dessas etapas de calibração, o sistema gerado está apto a ser utilizado para previsão em outras amostras (FERREIRA et al., 1999).

Os dados muitas vezes apresentam-se em escalas diferentes, com variâncias distintas e distribuição não adequada, dificultando sua interpretação. Para tanto, faz-se necessário um pré-tratamento dos dados que pode ser de várias formas, normalmente consistindo em escalonamento de dados e o centrado na média (FERREIRA et al., 1999). Vários softwares e ambientes computacionais apresentam comandos para esses tipos de processamentos.

Existem vários efeitos negativos das calibrações tradicionais – método de quadrados mínimos ordinários (OLS), também conhecido como método de mínimos quadrados (CLS) e regressão linear múltipla (MLR) – dentre eles: inclusão de toda informação espectral para modelagem de concentração, necessidade de se conhecer as concentrações de cada espécie presente espectroscopicamente ativa na amostra e problemas de colinearidade. Para minimizá-los, outros métodos de calibração multivariada são aplicados eficientemente sobre essas condições. Os mais comumente usados são Regressão por Componente Principal (PCR – *Principal Component Regression*) e Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS – *Partial Least Squares*) (FERREIRA et al., 1999).

A base para os tratamentos por calibração multivariada, como PCR e PLS, é derivada da PCA (Análise de Componentes Principais). Fazendo parte do contexto de análise multivariada, a PCA tem como objetivos principais: i) redução de dados ou simplificação estrutural: o fenômeno sob estudo é representado da maneira mais simples possível, sem sacrificar informações valiosas e tornando as interpretações mais simples; ii) ordenação e agrupamento: agrupamento de objetos (tratamentos) ou

variáveis similares, baseados em dados amostrais ou experimentais; iii) investigação da dependência entre variáveis: estudos das relações estruturais entre elas, iv) predição: relações entre variáveis devem ser determinadas para o propósito de predição de uma ou mais variável com base na observação de outras; v) construção e teste de hipóteses (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

PCA está fundamentada em algoritmos de elaboração de gráficos que representam grande parte de informações contidas num determinado conjunto de dados, principalmente com elevado número de amostras e variáveis, reescrevendo as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para análise de dados (MOITA NETO; MOITA, 1998). O reconhecimento de padrões permite a obtenção de mais informações que tratamentos univariados (CORREIA; FERREIRA, 2007). É considerada como metodologia exploratória e não supervisionada, visando reduzir a dimensionalidade de um certo conjunto de dados, preservando o máximo de informações (variâncias) possíveis, a partir de variáveis formadas ortogonalmente entre si, denominadas componentes principais (PCs) (FERREIRA et al., 2002).

As PCs são plotadas em gráficos onde os eixos são as próprias PCs, sendo combinações lineares das variáveis, e são ordenadas em forma decrescente de importância (PC 1 detém mais informação estatística que a PC2 e esta tem mais informações estatísticas que a PC 3, e assim sucessivamente). Os gráficos, que podem ser até tridimensionais, expressam inter-relações entre as variáveis (caso existam), facilitando a interpretação do comportamento das amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007) e podem expressar grande percentual da informação com poucas PCs (normalmente até 3 PCs chegam a explicar aproximadamente 90% de informação dos dados).

A análise exploratória por PCA também favorece no entendimento de importância das variáveis originais por peso (*loadings*), sendo possível interpretar a distribuição dos pontos no gráfico de PCs, identificando as variáveis que mais influenciam no comportamento da combinação linear das PCs mais importantes (MOITA NETO; MOITA, 1998). Além do gráfico de *loadings*, há o de *scores*, nos quais são projetados os dados. Os *scores* fornecem a composição das PCs em relação às amostras e os *loadings* fornecem essa composição em relação às variáveis. Sendo as PCs ortogonais, é possível verificar as relações entre amostras e variáveis pelos dois tipos de gráficos formados. Assim, também pode-se estimar a influência de cada variável em cada amostra, também utilizada para divulgar a importância da mesma

(SENA et al., 2000). Permite também revelar a existência de amostras anômalas, de relações entre as variáveis medidas e de agrupamentos entre amostras (LYRA et al., 2010).

Outro método de análise exploratória é a análise hierárquica de agrupamentos (HCA). Esta é baseada em um processo hierárquico em que pares semelhantes são agrupados, até reunião de todos os dados, diminuindo sua matriz. Seu objetivo é exibir os dados em um espaço bidimensional de maneira a enfatizar os seus agrupamentos e padrões naturais. A distância entre os pontos (amostras ou variáveis) reflete a similaridade de suas propriedades (BUSSAD, 1990 *apud* FERREIRA et al., 2002).

Essa técnica de agrupamento interliga as amostras por suas associações, produzindo um gráfico, denominado dendograma. A suposição básica de sua interpretação é esta: quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. Os dendogramas são especialmente úteis na visualização de semelhanças entre amostras ou objetos representados por pontos em espaço com dimensão maior do que três, onde a representação de gráficos convencionais não é possível (MOITA; MOITA NETO, 1998).

Originada da PCA, a calibração por regressão PLS foi desenvolvida por Herman Wold e colaboradores na década de 1970 (WOLD; JÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001), baseada na relação linear entre as variáveis instrumentais e independentes (geradoras da matriz X) e de interesse, dependentes (geradoras da matriz Y). Utiliza a modelagem de componentes principais na redução da dimensionalidade do conjunto de dados para posterior correlação entre as duas matrizes formadas (espectro e propriedade de interesse), e inclui todas as variáveis relevantes para geração dos modelos, que, além de eficiente até na presença de interferentes, não necessita conhecer o número e natureza deles (SOUZA et al., 2013). Para o cálculo de cada PC é levado em consideração não só as respostas instrumentais (como acontece no PCR), mas também informações das concentrações na obtenção dos fatores com mesma intensidade. Nesse caso, as PCs são chamadas de variáveis latentes (VL) que descrevem a direção máxima de variância correlacionada com a concentração, sendo combinações lineares das PCs (FERREIRA et al., 1999; SOUZA et al., 2013). Os modelos podem ser gerados para mais de um analito, ou um modelo ótimo para cada analito. O primeiro caso funciona quando os analitos estão correlacionados.

Para determinação do número de VL a ser empregada, utiliza-se usualmente o método de validação cruzada (CV), também chamada de *uma por vez*. Consiste na

retirada de uma amostra do modelo de calibração gerado e o valor na espécie de interesse é previsto na mesma, com o modelo sem ela, empregando algumas VLS, em ordem crescente. Esse procedimento é feito sucessivamente nas demais amostras individualmente, até não haver variação significativa no erro médio (RMSECV) calculado para cada VL empregada, sendo esse erro, então, um fator determinante na escolha da quantidade de VL a ser utilizada no modelo (SOUZA et al., 2013).

Após a construção dos modelos, para aplicação nas amostras, é necessário o estudo para validar a modelagem com um conjunto de amostras (de validação) para testar a capacidade de predição das concentrações. Pode ser a CV ou interna (amostras de calibração são usadas na validação), ou a validação externa (quando um conjunto de amostras distinto é utilizado). Para esta última, usa-se amostras que não foram utilizadas na calibração e que se tenha conhecimento do comportamento do analito para avaliar se o modelo irá refletir o mesmo.

O objetivo da validação externa é verificar a capacidade de previsão do modelo e garantir previsões confiáveis para as concentrações das amostras desconhecidas (MARRETO, 2012). Nessa etapa, deve-se levar em consideração o número de fatores a serem utilizados nos modelos, que pode ser as PCs ou VLS, e a identificação de amostras anômalas (FERREIRA et al., 1999). Um erro quadrático médio de validação (RMSEV) é calculado similarmente ao RMSECV. Os valores previstos pelos modelos são comparados aos “reais”, fazendo-se um ajuste pela geração de um gráfico com as duas grandezas, podendo ser avaliados pelo coeficiente de determinação, r^2 , da reta (SOUZA et al., 2013). Outras figuras de mérito são utilizadas para garantir a confiabilidade do método, como: exatidão – calculada através da raiz quadrada do erro médio quadrático de previsão (RMSEP), precisão, sensibilidade, intervalo de confiança, faixa linear dinâmica, seletividade e limites de detecção e quantificação (VALDERRAMA; BRAGA; POPPI, 2009).

4. Materiais e métodos

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As coletas das macroalgas marinhas foram feitas no período entre marés, principalmente nos dias de lua cheia e nova que caracterizam as marés de sizígia, consultando o horário apropriado em “Tábuas das Marés para a Costa do Brasil” editadas anualmente pela Diretoria de Hidrografia e Navegações (DHN) da Marinha do Brasil, com dados do Observatório Nacional, armazenados no Banco Nacional de Dados Oceanográficos (BNDO). Foram realizadas coletas em 4 momentos. Inicialmente, 3 coletas foram realizadas em momentos próximos, obedecendo-se os horários da maré baixa, nos dias 29/03/2014, 30/04/2014 e 16/05/2014. A 4ª coleta foi realizada em 22/11/2014. As espécies coletadas foram identificadas por um número (de 1 a 15), conforme trabalho de BRITO (2011) e as diferentes coletas identificadas por letras (de A a D). A Tabela 1 contém as classificações de 46 macroalgas coletadas nos diferentes dias supracitados.

Tabela 1. Táxons de macroalgas coletadas nos diferentes períodos de amostragem.

n°	Amostra	Coletas			
		A	B	C	D
1	<i>Ulva lactuca</i>	x	x	x	x
2	<i>Caulerpa scalpelliformis</i>	x	x	x	x
3	<i>Padina</i> spp.	x	x	x	x
4	<i>Bryothamnion triquetrum</i>	x	x	x	x
5	<i>Codium isthmocladum</i>	x	x	x	
6	<i>Caulerpa racemosa</i>	x	x	x	x
7	<i>Sargassum</i> spp.	x	x	x	x
8	<i>Hypnea musciformis</i>	x	x	x	
9	<i>Dictyopteris jamaicensis</i>	x			
10	<i>Acanthophora spicifera</i>	x	x	x	x
11	<i>Dictyota</i> spp.	x	x	x	x
12	<i>Cryptonemia crenulata</i>		x		
13	<i>Agardhiella</i> sp.			x	x
14	<i>Gracilaria domingensis</i>			x	x
15	<i>Caulerpa cupressoides</i>			x	x

4.1.1 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

As macroalgas marinhas estão reunidas em três filós: Chlorophyta (algas verdes), Ochrophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas). Abaixo estão listadas e classificadas¹ as espécies utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, divididas nos 3 filós, as quais podem ser vistas nas Figuras 4 e 5:

- *Algas vermelhas – Rhodophyta*

Ordem: Ceramiales

Família: Rhodomelaceae

Acanthophora spicifera (Vahl) Børgesen, 1910: 201

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Agardhiella F.Schmitz, 1897: 371

Ordem: Ceramiales

Família: Rhodomelaceae

Bryothamnion triquetrum (S.G.Gmelin) M.A.Howe 1915: 222

Ordem: Halymeniales

Família: Halymeniaceae

Cryptonemia crenulata (J.Agardh) J.Agardh 1851: 225-226

Ordem: Gracilariales

Família: Gracilariaceae

Gracilaria domingensis, (Kützing) Sonder ex Dickie, 1874

Ordem: Gigartinales

Família: Cystocloniaceae

Hypnea musciformis (Wulfen) J.V.Lamouroux 1813: 43

- *Algas verdes – Chlorophyta/Ulvophyceae*

Ordem: Bryopsidales

Família: Caulerpaceae

Caulerpa cupressoides (Vahl) C.Agardh 1817: xxiii

¹ Dados extraídos da base internacional de dados sobre algas: AlgaeBase. Disponível em <http://www.algaebase.org/>.

Ordem: Bryopsidales

Família: Caulerpaceae

Caulerpa racemosa* var. *occidentalis (J. Agardh) Børgesen, 1907: 337-392

Ordem: Bryopsidales

Família: Caulerpaceae

Caulerpa scalpelliformis (R. Br. ex Turner) C. Agardh, 1817: XXII

Ordem: Bryopsidales

Família: *Codiaceae*

Codium isthmocladum Vickers, 1905: 57

Ordem: Ulvales

Família: Ulvaceae

Ulva lactuca Linnaeus, 1753: 2

- *Algas pardas – Ochrophyta/Phaeophyceae*

Ordem: Dictyotales

Família: Dictyotaceae

Dictyopteris jamaicensis W. R. Taylor, 1960: 631

Ordem: Dictyotales

Família: Dictyotaceae

Dictyota J.V.Lamouroux, 1809: 38

Ordem: Dictyotales

Família: Dictyotaceae

***Padina* spp.** Adanson, 1763: 586

Ordem: Fucales

Família: Sargassaceae

***Sargassum* spp.** C. Agardh, 1820: 1

Figura 4. Macroalgas do gênero Rhodophyta (algas vermelhas). Da esquerda para a direita, de cima para baixo: a) *Acanthophora spicifera*, b) *Agardhiella*, c) *Bryothamnion triquetrum*, d) *Cryptonemia crenulata*, e) *Gracilaria domingensis* e f) *Hypnea musciformis*.

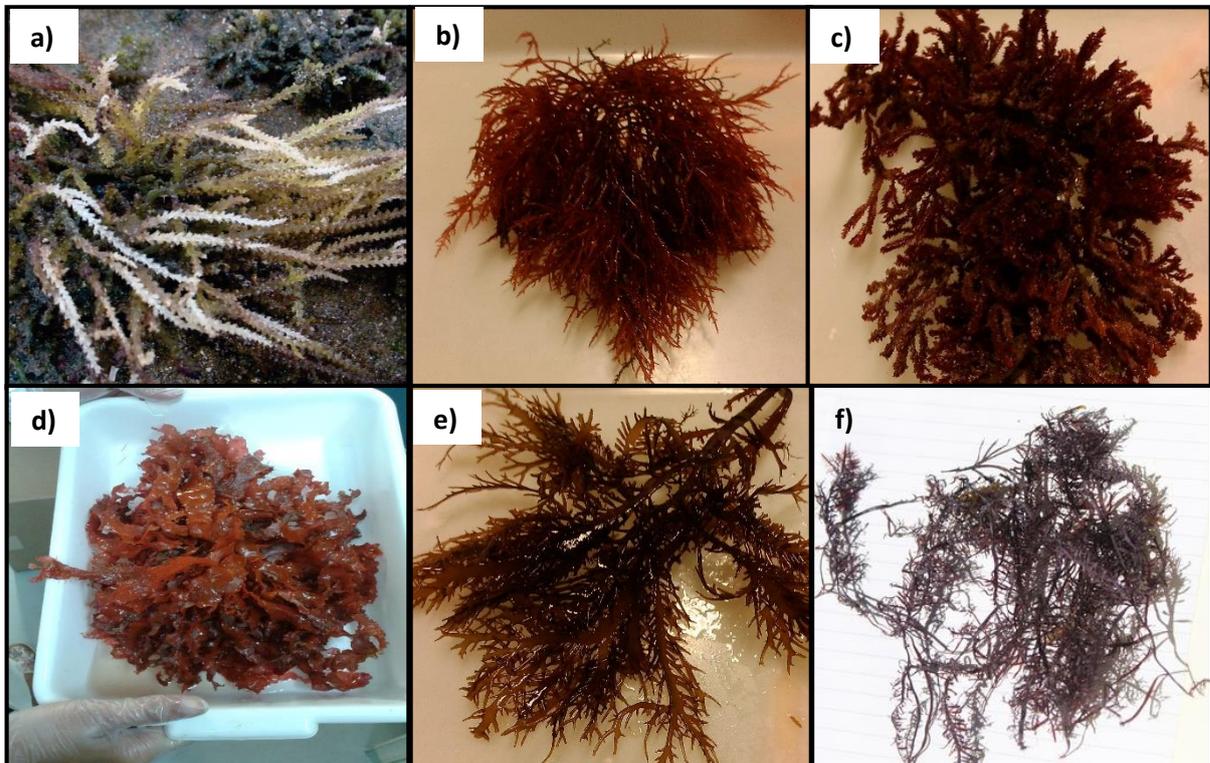
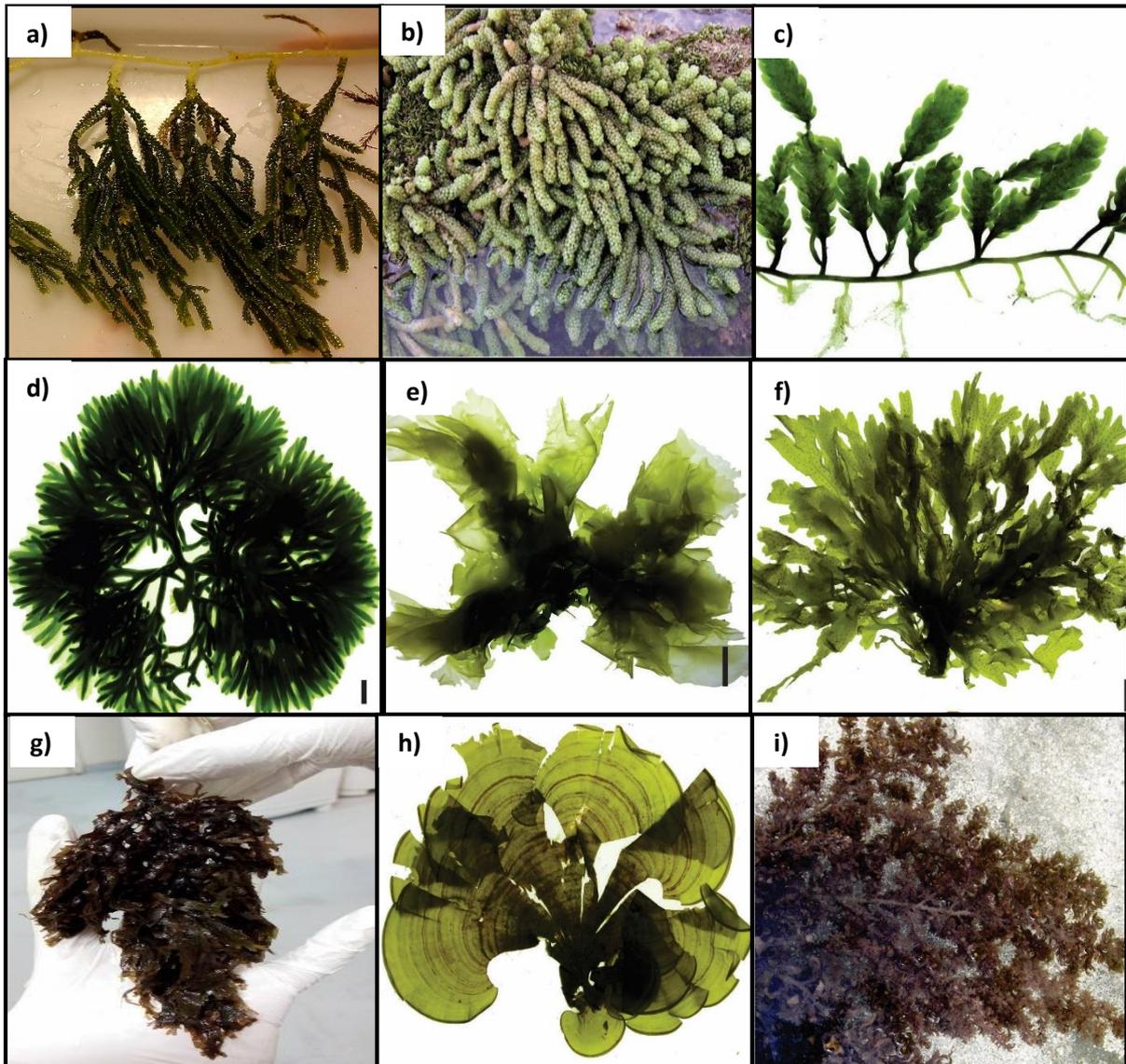


Figura 5. Macroalgas marinhas dos gêneros Chlorophyta (algas verdes) e Ochrophyta (algas pardas). Da esquerda para a direita, de cima para baixo: a) *Caulerpa cupressoides*, b) *Caulerpa racemosa*, c) *Caulerpa scalpelliformis*, d) *Codium isthmocladum*, e) *Ulva lactuca*, f) *Dictyopteris jamaicensis*, g) *Dictyota* sp., h) *Padina* sp. e i) *Sargassum* sp.



4.1.2 DESCONTAMINAÇÃO DO MATERIAL DE CAMPO

Todo o material de campo (espátulas, sacos e recipientes de plástico), que entrou em contato com as amostras, foi descontaminado da seguinte forma:

- Banho de detergente 5% (v/v) por pelo menos 24 h. Lavagem em abundância com água corrente;

- Rinsagem abundante com água desionizada;
- Banho em ácido nítrico 10% (v/v) por pelo menos 48 h. O material ficou totalmente imerso na solução, de modo que ar não estivesse retido no interior do recipiente. O banho ácido foi trocado a cada 15 dias, ou antes, se necessário. Não foi colocado material metálico e/ou recipientes com resíduos de marcador permanente no banho ácido;
- Lavagem com água destilada-desionizada ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) em abundância.

Após a descontaminação, o material foi seco em ambiente limpo, coberto e, posteriormente, embalado em sacos plásticos e assim mantido até seu uso no campo. O manuseio de todo material foi feito utilizando-se luvas sem talco.

4.1.3 PROCEDIMENTO AMOSTRAL

Conjuntos individualizados de materiais (luvas, espátulas, sacos e/ou recipientes) foram levados para o campo, para atender o número de amostras a serem coletadas.

Em campo, as amostras foram pré-identificadas e coletadas manualmente. Para cada tipo de alga foi feita uma amostra composta para cada local amostrado (pontos diferentes em uma mesma área amostral, e.g. pradaria), com peso aproximado entre 300 e 500 mg. Quanto ao tamanho da área amostrada, este foi diferenciado para cada táxon, pois dependia de biogeografia de cada espécie. Como diferentes espécies de um mesmo gênero podem viver num mesmo meio, para aquelas que não era possível fazer uma identificação a olho nu, a coleta foi feita em uma menor área, visando minimizar a possível mistura de espécies.

O material coletado foi lavado com água do mar para retirar excesso de sedimentos e epífitas. Após a lavagem, as amostras foram acondicionadas em recipientes plásticos descontaminados e postos dentro de sacos plásticos, também descontaminados, ou mesmo diretamente armazenados em sacos plásticos. As amostras foram estocadas em recipientes isotérmicos resfriados (caixa de isopor ou bolsas térmicas com gelo).

No laboratório, as amostras foram submetidas a lavagem com água desionizada, removendo o excedente de incrustações de sedimentos além de outros seres. Após esse procedimento, uma pequena parte foi separada, colocada novamente num saco plástico e levada para identificação da espécie. A maior parte foi levada ao freezer, mantida assim em recipiente em que iria posteriormente para a secagem.

Os sacos plásticos, ou recipientes contendo as amostras, foram identificados com etiquetas ou canetas permanentes, indicando claramente as seguintes informações: i. Local de coleta; ii. Número/código da amostra; iii. Data. Às vezes os recipientes eram apenas numerados e todas as identificações pendentes anotadas em lista previamente elaborada.

4.2 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura, com resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, de um sistema de purificação Elga LabWater® (Option-Q, Reino Unido). Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido nítrico (Merck, Alemanha) concentrado, destilado num destilador de ácidos (Subpur, Millestone) e peróxido de hidrogênio 30% v/v (Merck, Alemanha).

Para análise por técnica comparativa para avaliar a exatidão, foram preparadas soluções de trabalho a partir de soluções estoque elementar contendo 1000 mg L^{-1} dos elementos estudados (SpecSol® e Quemis) em meio ácido nítrico destilado. A partir de alíquotas apropriadas e diluição necessária, preparou-se a solução multielementar de referência em meio de HNO_3 5% e, com esta, a construção da curva analítica de calibração com faixa linear de trabalho compreendida entre $0,025$ a 15 mg L^{-1} e $0,5$ a 100 mg L^{-1} para es elementos em concentração micro e macro, respectivamente. As soluções foram estocadas em frascos de polietileno previamente descontaminados.

A descontaminação de vidrarias, frascos plásticos e materiais em geral, foi realizada em banho de detergente comum 10% v/v e passados para HNO_3 10% v/v, por no mínimo 24 h em cada banho. Posteriormente, os materiais foram lavados abundantemente com água ultrapura e secos em temperatura ambiente.

Os frascos de TFM[®] PTFE, utilizados no forno de micro-ondas com cavidade ETHOS EZ (Milestone, Itália), foram submetidos à descontaminação de NO_x em estufa com circulação de ar por 3 h a 180 °C e, quando necessário, foram passados anteriormente a um programa de descontaminação rápida no próprio forno de micro-ondas com ácido nítrico concentrado, empregando-se programa de aquecimento apropriado, recomendado pelo fabricante. Após essas etapas, foram lavados com água deionizada e mergulhados em banho de ácido nítrico 10% (v/v) por 24 h. Após esse período, foram lavados com água ultra-pura e colocados em organizadores plásticos, previamente descontaminados, para a secagem.

4.3 INSTRUMENTAÇÃO E EQUIPAMENTOS

Vários equipamentos foram utilizados durante as metodologias analíticas empregadas neste trabalho. A seguir, estão listados os instrumentos de acordo com cada etapa do método.

4.3.1 PRÉ TRATAMENTO DE AMOSTRAS

Os procedimentos na etapa de pré-tratamento de amostras consistiram em secagem, moagem, peneiramento e prensagem. A seguir estão descritas cada etapa bem como caracterizada cada instrumentação utilizada.

Na secagem das amostras de algas foram empregados liofilizadores da marca Liotop (L101 e L108, SP – Brasil) (Figura 6), do laboratório do Núcleo de Estudos Ambientais situado no Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia. A depender do tipo de alga e de suas características físicas, como presença de grande quantidade de água em seu interior, além da quantidade em massa, elas passaram por liofilização entre 24 e 72 h em vácuo numa velocidade de vácuo de 10,2 m³/h (70 lpm). Quando retiradas, foram cobertas com filme plástico, levadas para dessecador e moídas no mesmo dia ou em dia seguinte.

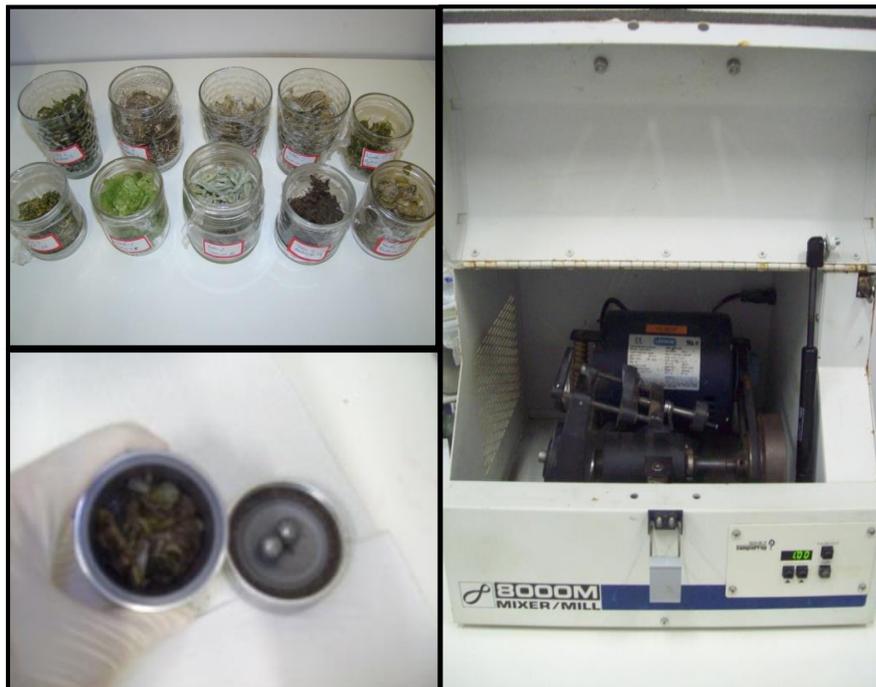
As amostras foram moídas em moinho de bolas (Spex SamplePrep, 8000M mixer/Mill) equipado com frascos e bolas de carbeto de tungstênio (Figura 7), por tempo que variou de 60 a 150 s. Em seguida, ficaram estocadas em recipientes plásticos previamente descontaminados e mantidos em dessecador. Após esse

processo, as amostras foram submetidas a passagem em malhas de nylon com orifícios de 100 µm para obter granulometria menor e mais homogênea, garantindo a repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Em dois táxons (*Penicillus capitatus* e *Codium isthmocladum*) houve uma perda significativa da amostra quando passado em malha, sendo analisada apenas a parte de menor granulometria. Para as demais amostras, massas desprezíveis foram descartadas.

Figura 6. Liofilizadores utilizados para secagem das amostras de macroalgas marinhas (modelos L101 e 108, Liotop, SP-Brasil).

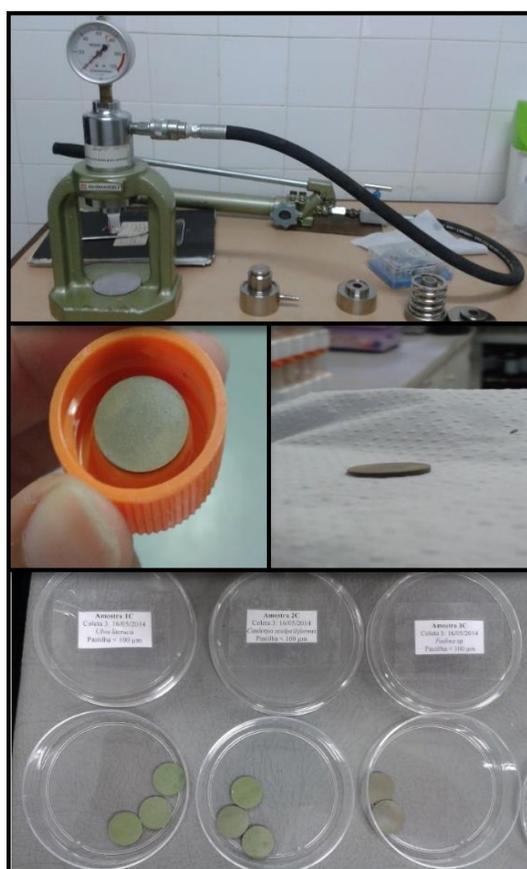


Figura 7. Moinho de bolas utilizado na moagem das amostras de macroalgas marinhas (Spex SamplePrep, 8000M mixer/Mill).



Para o procedimento de pastilhamento, foi usada uma massa aproximada de 150 mg de cada amostra, em triplicata, para a maioria das amostras. A prensa hidráulica e o pastilhador utilizados foram da Shimadzu (Figura 8), do Grupo de Pesquisa em Síntese Química e Bioatividade Molecular da Universidade Federal da Bahia, para confecção de pastilha de 13 mm de diâmetro, sob pressão de 9-10 toneladas-força (ou 80-90 K N) por 4-5 min, para melhor compactação e uniformidade das mesmas. A altura média das pastilhas, variando com a densidade da granulometria de cada espécie, ficou em torno de 1 mm.

Figura 8. Prensa usada no fabrico das pastilhas e detalhe das amostras pastilhadas.



4.3.2 MÉTODO COMPARATIVO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

Para avaliação da exatidão dos métodos propostos, foi utilizada metodologia validada por BRITO (2011) para determinação de elementos por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) após decomposição ácida das amostras por via úmida em forno de micro-ondas com cavidade.

Para a decomposição, foi utilizado forno de micro-ondas com cavidade, modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, Itália), (Figura 9), que possui rotor para 10 frascos de 100 mL confeccionados em TFM® (PTFE modificado). Este sistema permite a utilização de métodos com ajuste automático da potência de digestão mediante as rampas de temperatura escolhidas. Durante a digestão, a temperatura foi monitorada.

Foram pesados 250 mg das amostras secas, com granulometria uniformizada a 100 μm , adicionando 7,0 mL de HNO_3 concentrado sub-destilado e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v). O programa de decomposição utilizado para as amostras de macroalgas marinhas está descrito na Tabela 2.

Figura 9. Fotos do forno de Micro-ondas com cavidade, copos e segmentos ETHOS EZ, Milestone.

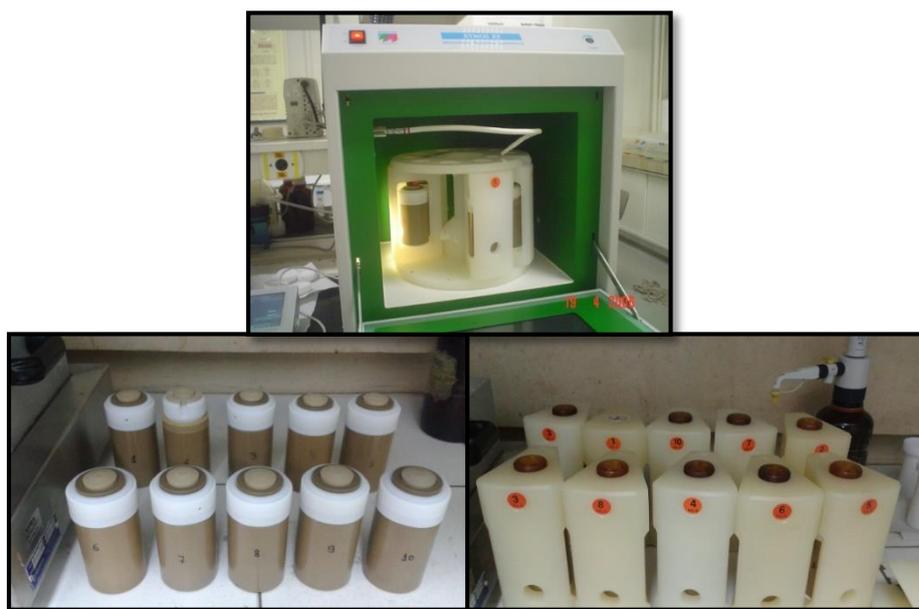


Tabela 2. Programa de aquecimento por forno de micro-ondas para decomposição das amostras.

Etapas	Tempo (min)	Temperatura °C	Potência (W)
1	5	120	700
2	3	120	700
3	10	210	1000
4	15	210	1000
Ventilação	20	-	-

A determinação quantitativa dos elementos foi feita num ICP OES – VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália) simultâneo, com arranjo axial e detector do estado sólido para a determinação dos analitos, com tocha de quartzo de corpo único equipado com arranjo óptico Littrow e rede Echelle. O detector de estado sólido possui arranjo de dispositivo de carga acoplada (CCD) e opera em comprimentos de onda na faixa de 167 a 785 nm. Possui interface *end-on gas*, que com o fluxo frontal contracorrente de gás, protege a região pré-óptica de superaquecimento e remove a zona mais fria do plasma. O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução estoque multielementar e, para o alinhamento óptico, utilizou-se uma solução contendo Mn 5,0 mg L⁻¹. A Figura 10 apresenta a visão do equipamento e sua tocha, na configuração axial. O sistema de introdução de amostras é constituído por uma câmara de nebulização do tipo Sturman-Masters de PTFE e um nebulizador com ranhura em V.

As linhas espectrais foram selecionadas de acordo com verificação de interferências, maior sensibilidade, melhor calibração, além de escolha pela maior relação sinal analítico/sinal de fundo (SBR). O controle das condições robustas foi realizado medindo-se a razão Mg II/Mg I - linhas iônica (Mg II 280 nm) e atômica (Mg I 285 nm). A literatura recomenda que a razão obtida experimentalmente utilizando o sistema ICP OES, modelo Vista Pro (Varian), seja multiplicada pelo fator de correção igual a 1,8, de forma a compensar a diferença na resposta entre os dois comprimentos de onda. Se a razão for menor que 8, o plasma estava sendo operado em condições não robustas e se a razão for maior que 8 o plasma estava sendo operado em condições robustas (BRENNER; ZANDER, 2000). As Tabelas 3 e 4 relacionam as configurações operacionais do equipamento e as linhas de emissão estudadas.

Figura 10. Foto do espectrômetro simultâneo de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado com configuração axial (Varian).

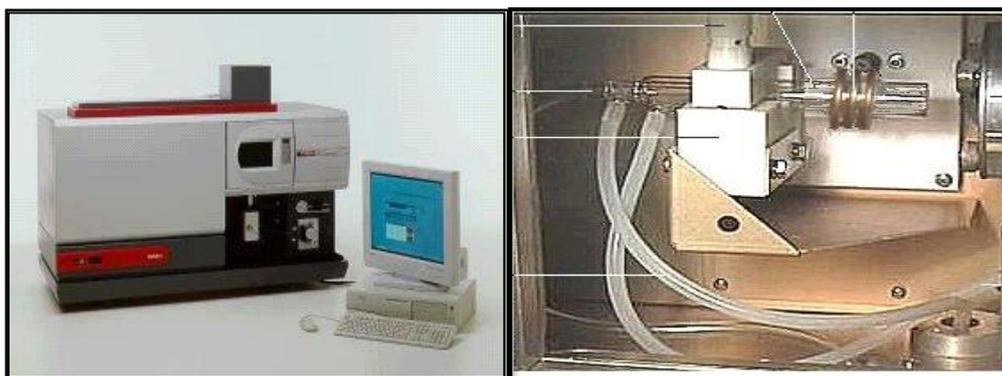


Tabela 3. Condições operacionais utilizadas do ICP OES, Varian.

Parâmetros	Configurações/tipo
Rádio frequência gerador (MHz)	40
Vazão gás nebulização (L min ⁻¹)	0,7
Vazão gás plasma (L min ⁻¹)	15,0
Vazão gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Potência aplicada RF (kW)	1,3
Câmara de nebulização	Sturmann-Masters
Nebulizador	Ranhura em V

Tabela 4. Linhas espectrais de emissão usadas para determinação dos analitos nas amostras de macroalgas marinhas por ICP OES.

Analito	Linhas de emissão	Analito	Linhas de emissão
Al	(I) 396,152	Mn	(II) 257,610
As	(I) 193,696	Mo	(II) 202,032
Ba	(II) 455,403	Na	(II) 289,592
Ca	(II) 396,847	Ni	(II) 216,555
Co	(II) 238,892	P	(I) 177,434
Cr	(II) 267,726	Pb	(II) 220,353
Cu	(I) 327,395	Sb	(I) 206,834
Fe	(II) 238,204	Sn	(II) 189,927
K	(I) 769,897	Sr	(II) 421,552
Mg	(II) 280,270	Zn	(I) 213,857

(I) linhas de emissão atômicas; (II) linhas de emissão iônicas.

4.3.3 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

Neste trabalho foram propostas duas metodologias para análise de macroalgas marinhas pastilhadas. A seguir estão a descrição dos equipamentos utilizado para a determinação elementar.

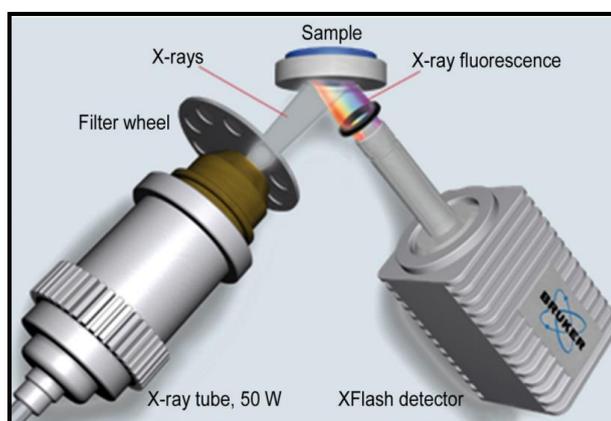
4.3.3.1 EDXRF

Para a determinação elementar em espectrometria de fluorescência por raios X por energia dispersiva (EDXRF), um equipamento da Bruker AXS foi utilizado (S2 RANGER com amostrador manual), com bomba de vácuo integrada, conforme

Figuras 11 e 12, pertencente ao Grupo de Investigação, Desenvolvimento e Inovação Analíticas da Universidade Federal da Bahia. Constituído por tubo de raios X com ânodo de Pd (Varian VF50), voltagem, corrente e potência máximas de 50 kV DC, 2 mA DC e 50 W, respectivamente, e trocador automático de filtros com 9 posições. Utiliza um detector de alta resolução, semiconductor de Si(Li) (SDD, *Silicone Drift Detector*), capaz de produzir pulsos elétricos proporcionais às energias dos raios X, com sistema de refrigeração Peltier, podendo utilizar atmosferas sob vácuo, ar ou He, a depender da amostra, que configuram diferentes características às análises.

O equipamento foi calibrado com um disco de cobre antes de cada aplicação a ser efetuada. Após esse procedimento, as amostras foram dispostas sobre a janela de amostragem, feito de um filme polimérico transparente à radiação (Mylar®), preso num copo de polietileno por anéis do mesmo material e apoiados em amostrador de aço de 40 mm de diâmetro.

Figura 11. Esquema do EDXRF S2 RANGER da Bruker AXS empregado para determinação elementar neste trabalho.



Fonte: Manual Bruker AXS (2003).

Figura 12. Fotos do equipamento, amostrador e disco de Cu para calibração da EDXRF S2 RANGER da Bruker AXS e amostras sobre filme Mylar® de poliéster.



4.3.3.2 LIBS

O equipamento utilizado para determinação por Espectroscopia de Emissão Óptica em Plasma Induzido por Laser foi o modelo LIBS J200 (Applied Spectra, EUA) pertencente ao Grupo de Análise Instrumental Aplicada da Universidade Federal de São Carlos. As condições operacionais estão apresentadas na Tabela 5. As amostras foram submetidas ao laser em quatro quadrantes. Para cada quadrante foi feita uma varredura com 66 pulsos de ablação, como pode ser observado na Figura 13.

Foram construídos modelos empíricos multivariados empregando a LIBS associada à calibração multivariada para determinação de macro-minerais nas amostras de macroalgas marinhas. Os dados espectrais foram tratados aplicando-se uma etapa de pré-processamento para remover informações físicas e/ou instrumentais não relacionadas às informações químicas estudadas, eliminando flutuações e garantindo uma melhor informação espectral, selecionando faixas espectrais de interesse, ou seja, aquelas de maior intensidade para os analitos. Para tanto, foi utilizado o programa computacional MATLAB (*Matrix Laboratory*) que possibilita o desenvolvimento e implementação de algoritmos numéricos e tratamento de matrizes. O desenvolvimento de modelos de calibração multivariada foi feito por decomposição espectral por Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS –

Partial Least Squares), utilizando o programa Pirouette® 4.5 (InfoMetrix, Inc.). Busca-se encontrar uma relação entre a matriz (**X**) contendo os espectros das amostras do conjunto de calibração e o vetor que armazena as respectivas concentrações (**Y**). O resultado é uma equação semelhante à Equação 1:

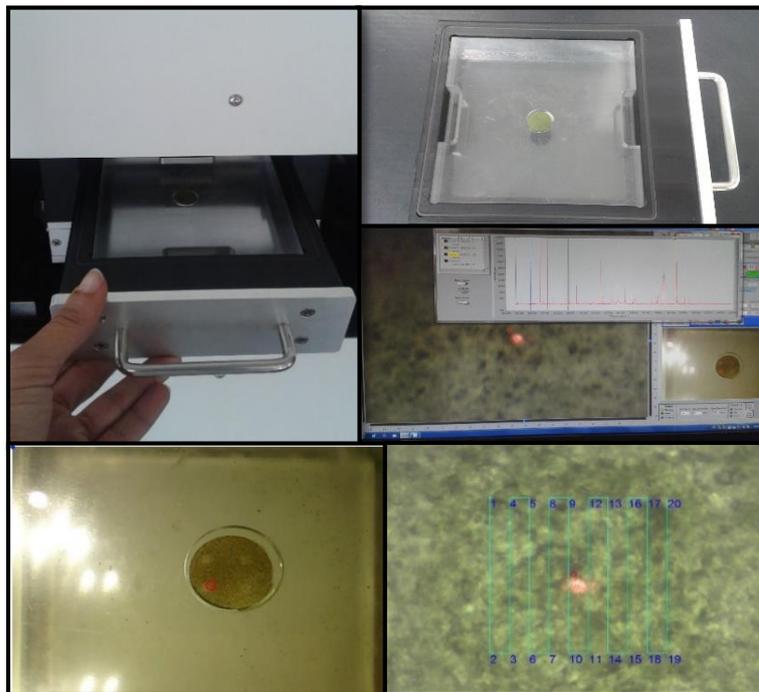
$$Y = Xb + e \quad (1)$$

onde **b** é o vetor de regressão e **e** o vetor que representa os erros do modelo.

Tabela 5. Parâmetros instrumentais e de medida do LIBS empregados para determinação elementar nas amostras de macroalgas marinhas.

Parâmetro	Condição
Potência Laser	75 mJ
Atmosfera	ar
Modo de ablação	Fire Pattern
Tempo de ablação	12,3 s
Área	75 µm
Tempo de espera	1 µs
Velocidade de varredura	1 mm/s
Frequência	5 Hz
Número de quadrantes	4
Área do quadrante	1 mm ²
Nº sinais/quadrante	66 pulsos

Figura 13. LIBS: fotos do amostrador, obtenção espectral, amostra de macroalga em pastilha dividida em quadrantes e padrão de ablação empregados.



5. Resultados e Discussão

5.1 ESTUDOS DA METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

Para o método de decomposição de amostras de algas via úmida por radiação micro-ondas em sistema fechado e determinação por ICP OES, validado por BRITO (2011), reproduzido aqui neste trabalho, foram verificados alguns parâmetros de desempenho para confirmação da confiabilidade do mesmo. Foram determinados 20 elementos para avaliação (Al, As, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Sn, Sr e Zn).

Os limites de detecção (LD ou LOD) e quantificação (LQ ou LOQ) foram avaliados conforme definido pela IUPAC (Tabela 6). O LOD foi calculado por:

$$LOD = k \cdot s / a, \quad (2)$$

onde s é o desvio padrão de uma série de replicatas de medidas do branco ($n=10$) e a é o coeficiente angular da curva analítica. A IUPAC recomenda que a constante k seja igual a 3. Esse valor fornece um nível de confiança de 99% na maioria dos casos, então:

$$LOD = 3 \cdot s / a \quad (3)$$

O LOQ foi calculado como 10 vezes o desvio-padrão de uma série de medidas de branco ($n=10$). Assim LOQ é:

$$LOQ = 10 \cdot s / a \quad (4)$$

Para avaliar a precisão do método, estimou-se a repetibilidade, através do cálculo do desvio padrão relativo (RSD) de dez réplicas verdadeiras. Foram digeridas 10 vezes de cada 3 diferentes amostras e feitas as medidas. Os valores de RSD de cada elemento para cada amostra apresentou valores inferiores a 10%.

Na avaliação da exatidão, foram analisados oito materiais de referência certificados (CRM) do NIST e IRMM: NIST 1515 (Apple Leaves), NIST 1547 (Peach Leaves), NIST 1570a (Trace Elements in Spinach Leaves), BCR[®] 060 (Lagarosiphon major – Aquatic plant), BCR[®] 279 (Ulva lactuca – Sea Lettuce), BCR[®] 414 (Plankton), BCR[®] 482 (Lichen), BCR[®] 670 (Lemna minor – Aquatic Plant “duck weed”). O

resultado em concentração e os respectivos desvios padrão (SD) podem ser observados nas Tabelas 7 a 15 (medidas para $n = 3$).

Tabela 6. Limites de detecção e quantificação dos analitos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, obtidos neste trabalho, por ICP OES.

Analito	LOD	LOQ	Analito	LOD	LOQ
Al	20,30	67,66	Mn	0,061	0,202
As	2,727	9,091	Mo	4,253	14,18
Ba	0,112	0,372	Na	4,597	15,32
Ca	51,67	172,3	Ni	0,333	1,110
Co	0,166	0,554	P	6,288	20,96
Cr	0,288	0,959	Pb	0,785	2,617
Cu	0,266	0,872	Sb	2,272	7,573
Fe	3,515	11,72	Sn	13,87	46,23
K	4,632	15,44	Sr	0,681	2,270
Mg	4,264	14,21	Zn	0,342	1,139

Tabela 7. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM NIST 1515 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
Ca*	1,526	0,015	1,320	0,031	86,5
Mg*	0,271	0,008	0,273	0,009	100,8
P*	0,159	0,011	0,157	0,008	98,7
K*	1,61	0,02	1,587	0,050	98,6
Al	286	9	248,9	13,2	87,0
As	0,038	0,007	<LQ	-	-
Ba	49	2	41,3	3,2	84,2
Cu	5,64	0,24	4,92	0,22	87,2
Fe	83	5	72,0	3,4	86,8
Pb	0,470	0,024	<LQ	-	-
Mn	54	3	50,1	2,5	92,8
Mo	0,094	0,013	<LQ	-	-
Ni	0,91	0,12	<LQ	-	-
Na	24,4	1,2	20,3	1,1	83,0
Sr	25	2	22,8	1,7	91,2
Zn	12,5	0,3	10,9	0,4	87,4

* Elementos com valores em percentual.

Tabela 8. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM NIST 1547 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
Ca*	1,56	0,02	1,225	0,033	78,5
Mg*	0,432	0,008	0,425	0,012	98,4
P*	0,137	0,007	0,132	0,007	96,9
K*	2,43	0,03	2,249	0,051	92,5
Al	249	8	205,1	11,1	82,4
As	0,060	0,018	<LQ	-	-
Ba	124	4	112,1	5,4	90,4
Cu	3,7	0,4	3,0	0,2	81,1
Fe	218	14	188	10	86,2
Pb	0,87	0,03	<LQ	-	-
Mn	98	3	88,6	4,2	90,4
Mo	0,060	0,008	<LQ	-	-
Ni	0,69	0,09	<LQ	-	-
Na	24	2	20,2	2,3	84,3
Sr	53	4	50	2	94,3
Zn	17,9	0,4	18,3	0,7	102,2

* Elementos com valores em percentual.

Tabela 9. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM NIST 1570a obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
Ca*	1,526	0,066	1,303	0,031	85,4
P*	0,5187	0,0067	0,508	0,020	97,9
K*	2,900	0,026	2,785	0,071	96,0
Na*	1,821	0,023	1,477	0,069	81,1
Al	310	15	291	16	93,9
As	0,068	0,012	<LQ	-	-
Co	0,393	0,030	<LQ	-	-
Cu	12,22	0,86	10,52	0,63	86,1
Mn	76,0	1,2	68,0	2,9	89,5
Ni	2,142	0,058	<LQ	-	-
Sr	55,54	0,50	48,4	2,1	87,1
Zn	82,3	3,9	80,79	3,3	98,2

* Elementos com valores em percentual.

Tabela 10. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 060 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
Al	4180	120	3975	183	95,1
Cu	51,2	1,9	46,42	2,0	90,7
Mn	1760	60	1509	71	85,7
Pb	64	4	<LQ	-	-
Zn	313	8	293	9	93,6

Tabela 11. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 482 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
Al	1103	24	887	37	80,4
As	0,85	0,07	<LQ	-	-
Cr	4,12	0,15	3,94	0,24	95,6
Cu	7,03	0,19	6,10	0,26	86,8
Ni	2,47	0,07	<LQ	-	-
Pb	40,9	1,4	<LQ	-	-
Zn	100,6	2,2	90,76	3,1	90,2

Tabela 12. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 670 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g kg}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g kg}^{-1}$	SD	%
As	(1980	190)	<LQ	-	-
Cr	(2050	100)	12760	263	(622)
Cu	(1820	300)	1140	49	(62,8)
Mo	(560	70)	<LQ	-	-
Pb	(2060	120)	<LQ	-	-
Zn	(24000	2100)	52800	709	(220)

(Valores estimados, não certificados).

Tabela 13. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 279 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
As	3,09	0,20	<LQ	-	-
Ca	(27x10 ³)	-	19942	597	(73,9)
Cr	(10,7)	-	14,0	0,8	(130)
Cu	13,14	0,37	11,19	0,47	85,2
Fe	(2,4x10 ³)	-	2149	109	(89,5)
K	(13x10 ³)	-	12960		(99,7)
Mg	(14x10 ³)	-	9979	305	(71,3)
Mn	(2,09x10 ³)	-	1875	95	(89,7)
P	(1,80x10 ³)	-	1559	77	(86,6)
Pb	13,48	0,36	<LQ	-	-
Zn	51,3	1,2	45,9	1,9	89,4

(Valores estimados, não certificados).

Tabela 14. Valores determinados por ICP OES, certificados e recuperação (em percentual) dos elementos para o CRM BCR 414 obtidos neste trabalho.

Elementos	Valor certificado		Valor encontrado		Recuperação
	$\mu\text{g g}^{-1}$	incerteza	$\mu\text{g g}^{-1}$	SD	%
As	6,82	0,28	<LQ	-	-
Co	(1,43	0,06)	<LQ	-	-
Cr	23,8	1,2	<LQ	-	-
Cu	29,5	1,3	24,72	1,33	83,8
Fe*	(1,85	0,19)	1,57	0,10	(84,7)
K	(7,55	0,17)	<LQ	-	-
Mn	299	13	264	12	88,3
Mo	(1,35	0,20)	<LQ	-	-
Ni	18,8	0,8	16,0	0,8	85,0
Pb	3,97	0,19	<LQ	-	-
Sr	(261	25)	224	9	(85,2)
Zn	111,6	2,5	105,4	3,2	94,4

* g kg⁻¹.

(Valores estimados, não certificados).

Tabela 15. Valores de recuperação (%) dos CRMs pela determinação por ICP OES, com destaque para os valores mínimos e máximos de recuperação dos elementos certificados, entre os analitos e os CRMs.

	NIST 1515	NIST 1547	NIST 1570a	BCR 060	BCR 279	BCR 414	BCR 482	BCR 670	Mín %	Máx %
Al	87,0	82,4	93,9	95,1	-	-	80,4	-	80,4	95,1
Ba	84,2	90,4	-	-	-	-	-	-	84,2	90,4
Ca	86,5	78,5	85,4	-	(73,9)	-	-	-	78,5	86,5
Cr	-	-	-	-	(130)	-	95,6	(622)	95,6	95,6
Cu	87,2	81,1	86,1	90,7	85,2	83,8	86,8	(62,8)	81,1	90,7
Fe	86,8	86,2	-	-	(89,5)	(84,7)	-	-	86,2	86,8
K	98,6	92,5	96,0	-	(99,7)	-	-	-	92,5	98,6
Mg	100,8	98,4	-	-	(71,3)	-	-	-	98,4	100,8
Mn	92,8	90,4	89,5	85,7	(89,7)	88,3	-	-	85,7	92,8
Mo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Na	83,0	84,3	81,1	-	-	-	-	-	81,1	84,3
Ni	-	-	-	-	-	85,0	-	-	85,0	85,0
P	98,7	96,9	97,9	-	(86,6)	-	-	-	96,9	98,7
Sr	91,2	94,3	87,1	-	-	(85,2)	-	-	87,1	94,3
Zn	87,4	102,2	98,2	93,6	89,4	94,4	90,2	(220)	87,4	102,2
Mín %	83,0	78,5	81,1	90,7	85,2	83,8	80,4	-	X	X
Máx %	100,8	102,2	98,2	95,1	89,4	94,4	95,6	-	X	X

Os resultados obtidos apresentaram boas recuperações quando comparados aos certificados, variando entre 80,4 e 102,2 %, salvo para Ca em NIST 1547.

5.2 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO POR EDXRF

Nesta etapa, foi proposta metodologia para determinação de elementos em algas por EDXRF, com calibração univariada. Um dos grandes problemas de interferência em análises com EDXRF é o efeito matriz que pode ocorrer a nível atômico ou devido à organização física da amostra. No efeito matriz atômico, a interferência é causada pelo fato de elementos com maior número atômico intensificarem elementos com menor número. Já elementos com menor número atômico provocam absorção nos de maior. Para uma precisão adequada das análises é necessário ou a disponibilidade de padrões de calibração que aproximam as amostras em propriedades químicas e físicas, ou métodos matemáticos satisfatórios

para lidar com efeitos interelementares. Neste trabalho foi otimizado o uso de amostras em pastilhas da própria matriz para ser empregada como curva de calibração da metodologia desenvolvida.

Para a determinação por EDXRF, devido ao diâmetro do copo de amostragem ser maior que o das amostras, algumas medidas foram tomadas para minimizar o efeito de espalhamento e perda da intensidade da radiação incidida. Foram criadas inicialmente 5 metodologias para verificar a eficiência das análises. Quinze amostras foram separadas para serem utilizadas como curva de calibração, escolhidas devido às concentrações apresentadas para os elementos a serem determinados. Os valores utilizados como parâmetros (de referência) foram determinados por ICP OES. Os diferentes métodos se basearam nos seguintes procedimentos para análise, sob atmosfera de He, dispondo a amostra sobre o filme polimérico:

- 1 – centralizando a pastilha no filme;
- 2 – colocando material de papel comum (ofício) no espaço descoberto sobre o filme;
- 3 – colocando material de papel filtro no espaço descoberto sobre o filme;
- 4 – colocando material de papelão comum no espaço descoberto sobre o filme;
- 5 – colocando material de poliestireno no espaço descoberto sobre o filme.

Após a montagem das curvas de calibração por analito de cada metodologia, foi feita avaliação das mesmas e verificação dos teores dos analitos de um conjunto de outras amostras, analisadas em cada aplicação. Por comparação com teores de referência, foi verificado que o método 3 apresentou melhores resultados de linearidade e exatidão. Posteriormente, este método de medida foi analisado sob atmosfera de vácuo e verificada diferença na linearidade e sensibilidade para os elementos estudados. Por último, foi avaliado o tempo de irradiação (100 e 200 s por região). Devido à sensibilidade da técnica e, com os resultados obtidos, foi criada aplicação no equipamento para determinação dos elementos Al, As, Ba, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Sn, Sr e Zn, conforme método de determinação de amostra com cobertura de papel de filtro (Boeco - Alemanha, grau 388, 84 g/m²) (ver Figura 14), sob vácuo, com 100 s de irradiação, tempo que apresentou maior sensibilidade. A configuração de análise para cada elemento pode ser observada na Tabela 16. As linhas utilizadas no estudo foram selecionadas com base na intensidade, acessibilidade do instrumento e na menor sobreposição de linhas.

Figura 14. Foto da montagem do copo de amostragem para análise por EDXRF das pastilhas de macroalgas, sobre filme polimérico, com cobertura de papel de filtro (com e sem amostra, respectivamente).



Tabela 16. Configurações de medida para os analitos empregados neste trabalho.

Atmosfera: vácuo			Tempo irradiação: 100 s/região		
Elementos	Energia (keV)	Linha transição	Voltagem (kV)	Corrente (mA)	Filtro
Na	1,041	K α 1	20	1,28	Nenhum
Mg	1,253	K α 1	20	1,28	Nenhum
Al	1,487	K α 1	20	1,28	Nenhum
P	2,014	K α 1	20	1,28	Nenhum
K	3,314	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Ca	3,692	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Cr	5,415	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Mn	5,899	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Fe	6,404	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Co	6,931	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Ni	7,478	K α 1	40	1,25	Nenhum
Cu	8,048	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Zn	8,639	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
As	10,54	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Sr	14,17	K α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Sn	25,27	K α 1	50	1	Cu 250 μ m
Ba	4,464	L α 1	40	1,25	Al 500 μ m
Pb	10,55	L α 1	40	1,25	Nenhum

Os filtros de feixe primário são utilizados para filtrar as linhas características do tubo de raios X, se o mesmo elemento está presente na amostra ou sobreposta.

As curvas de calibração para cada analito, com informações do coeficiente de determinação e equação de reta, podem ser observadas nas Figuras 15 a 18, a seguir, seguindo a ordem decrescente de concentração encontradas.

Figura 15. Curvas de regressão obtidas neste trabalho para K, Ca, Na e Mg por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) versus intensidade, nas análises de macroalgas.

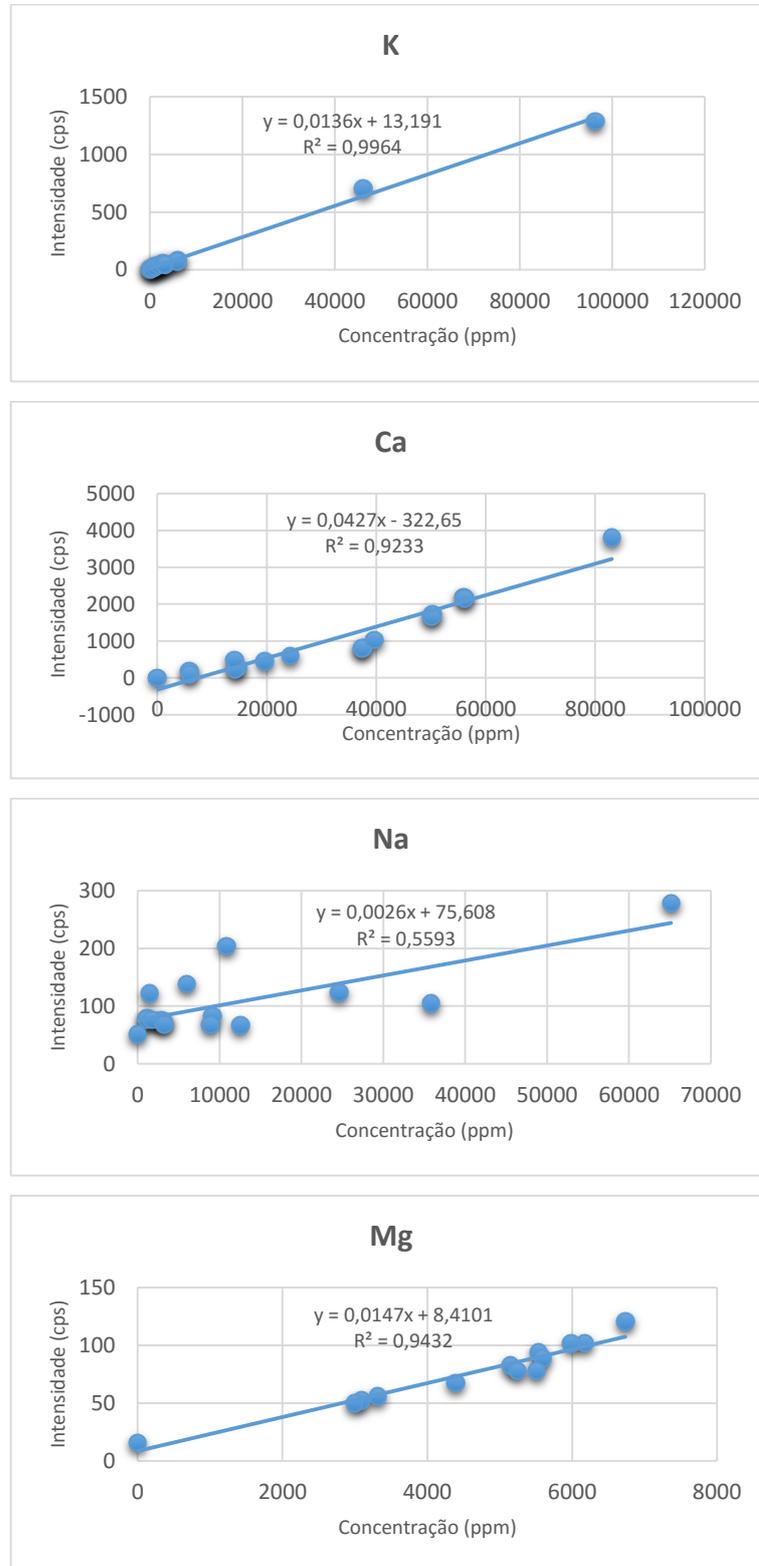


Figura 16. Curvas de regressão obtidas neste trabalho para macroalgas Al, Fe, Sr e P por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) versus intensidade, nas análises de.

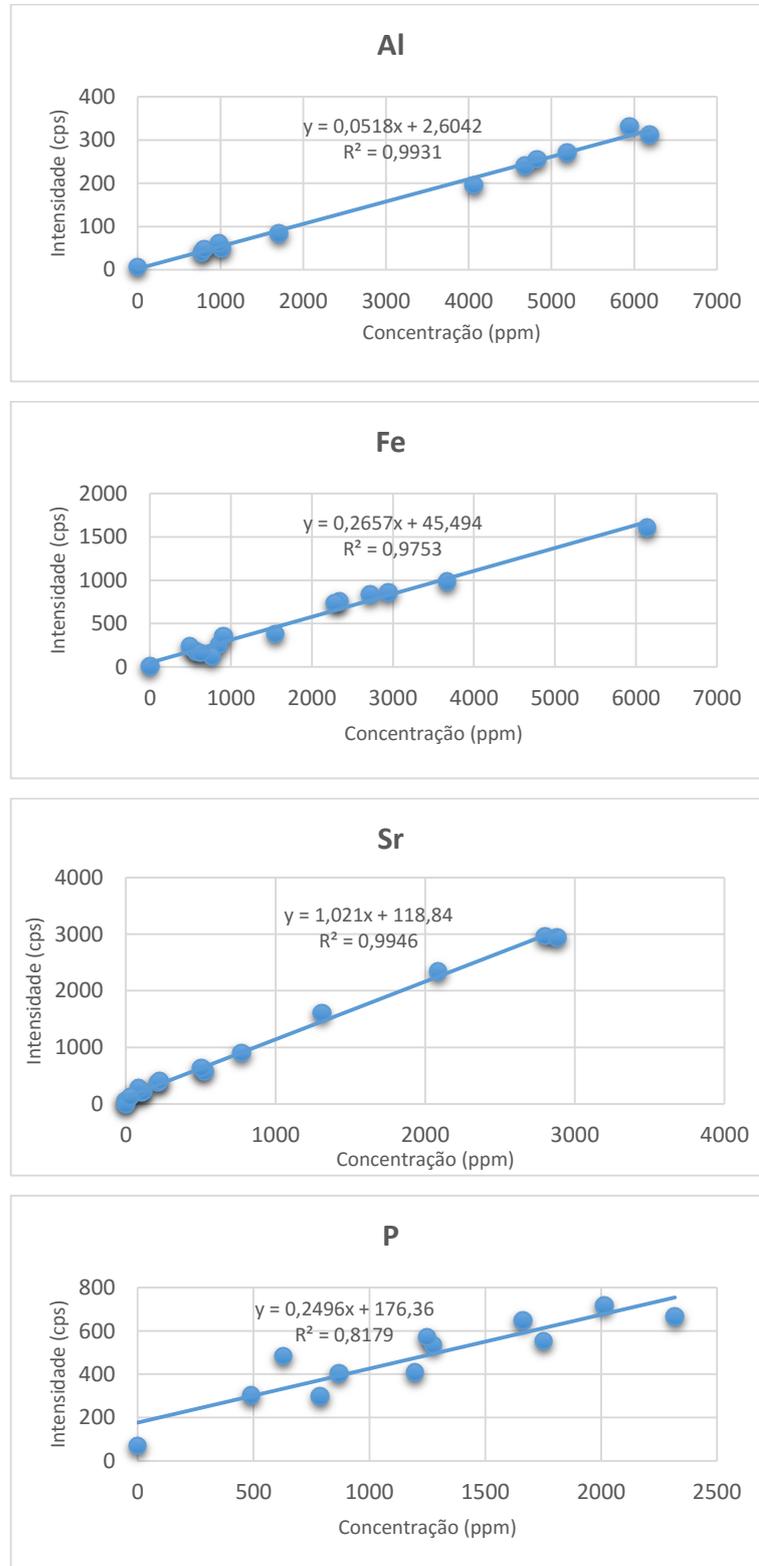


Figura 17. Curvas de regressão obtidas neste trabalho para Co, Mn, As e Zn por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) versus intensidade, nas análises de macroalgas.

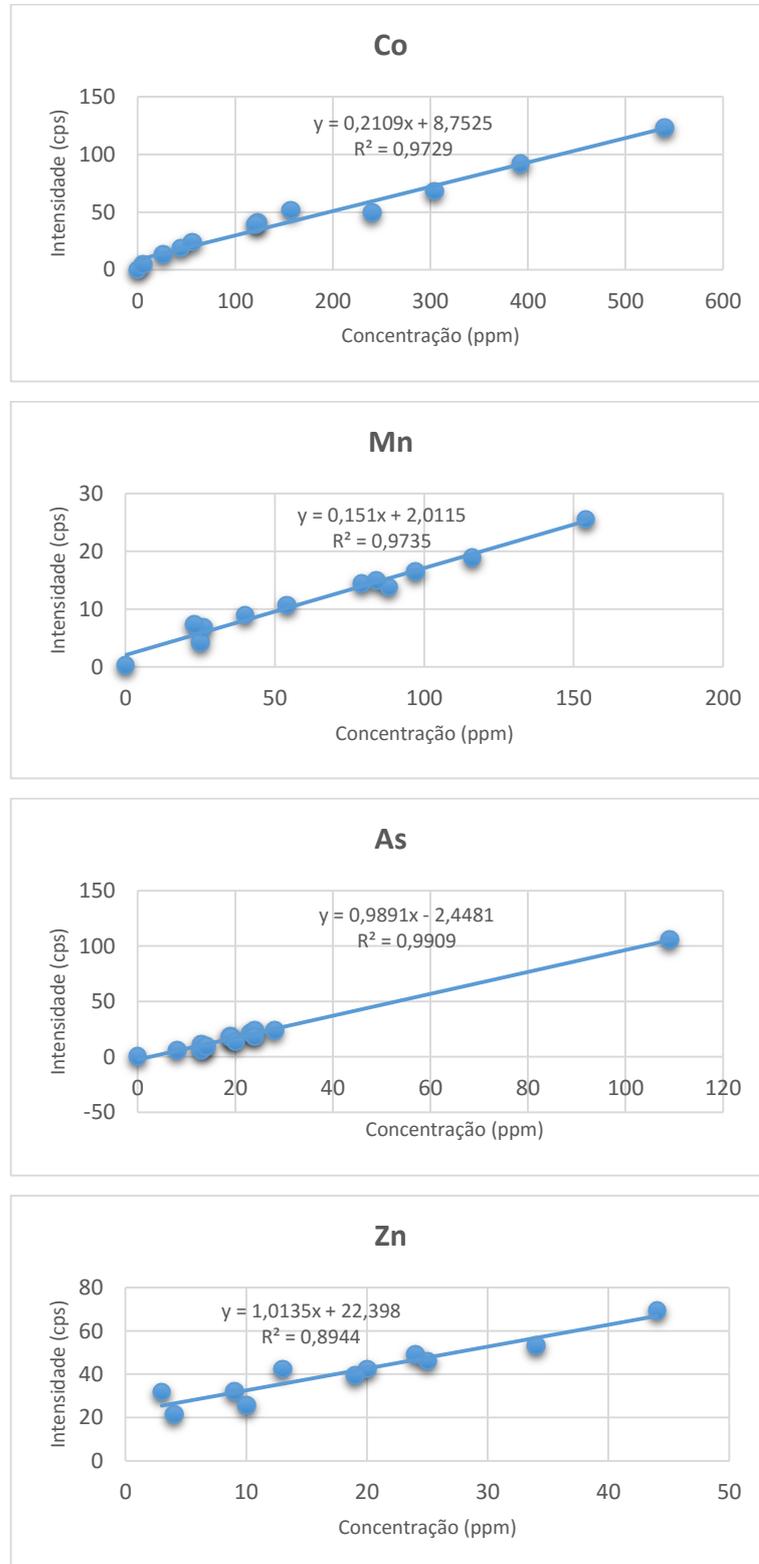
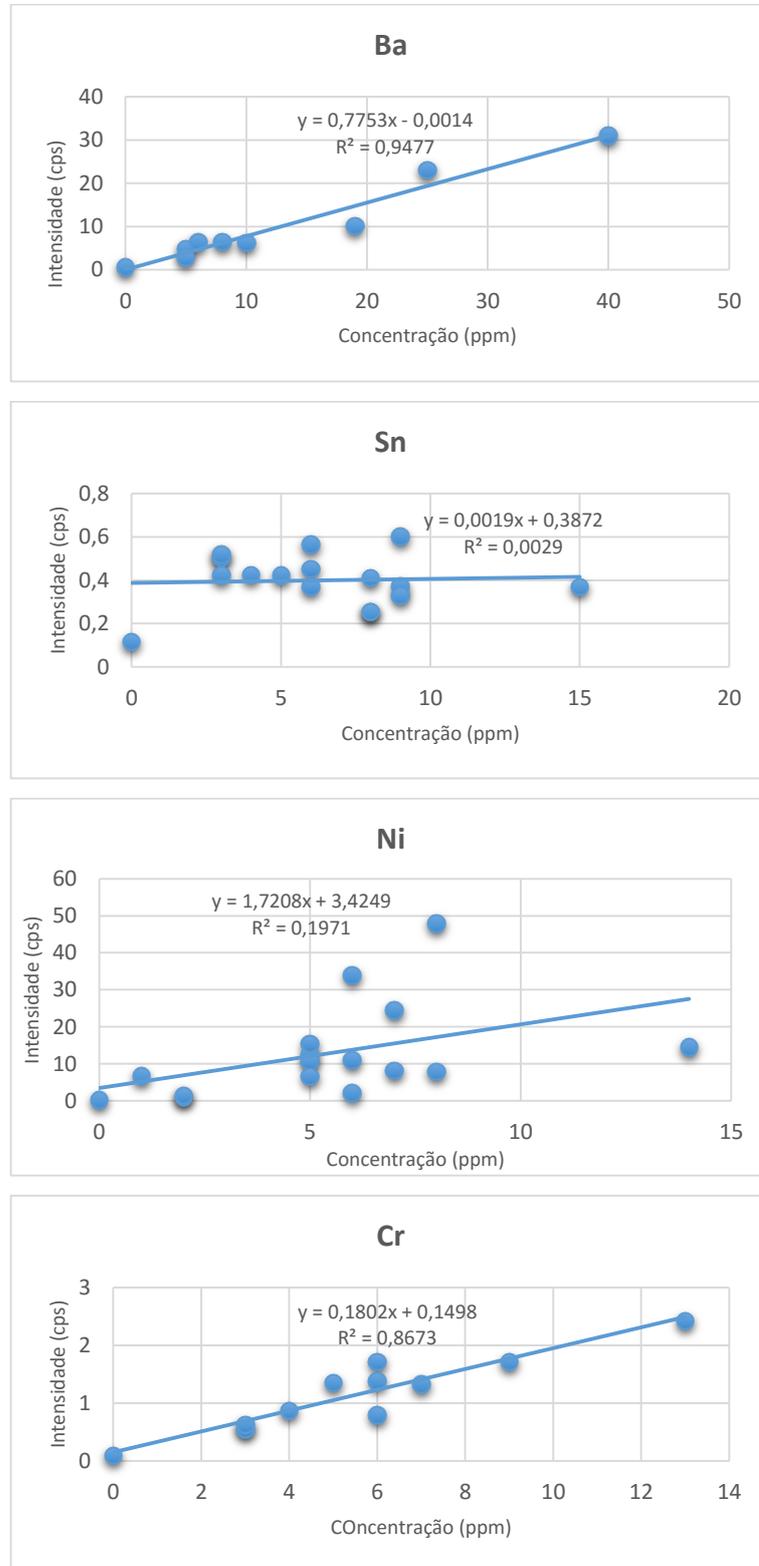


Figura 18. Curvas de regressão obtidas neste trabalho para Ba, Sn, Ni e Cr por EDXRF, concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$) versus intensidade, nas análises de macroalgas.



Para os elementos Cu e Pb, não foi possível gerar nenhum modelo, devido à baixa sensibilidade da técnica para detecção desses analitos, bem como os teores dos mesmos nas amostras utilizadas não se diferenciava significativamente a envolver uma faixa linear abrangente (valores muito próximos). Como pode ser observado, alguns elementos apresentaram curvas com bons coeficientes de determinação e outros não, apresentando elevada dispersão dos dados. Devido a este fato e à baixa correlação, não obtendo uma curva com boa linearidade, os elementos Na, Sn, Ni, Cu e Pb foram desconsiderados nas avaliações posteriores.

Considerando que essa técnica apresenta intensas interferências, principalmente de efeitos de matriz, prejudicando na correlação da concentração com intensidade analítica, a maioria dos modelos gerados de calibração apresentaram as variações dos y_s sendo explicadas acima de 92% pela relação com x . Normalmente as intensidades medidas por XRF não são proporcionais às concentrações dos analitos em uma amostra, mesmo em se tratando de amostras homogêneas. Isso afeta tanto as determinações nas medidas quanto à calibração do equipamento. Nesse caso, diferentes espécies de algas foram utilizadas como padrões nas curvas de calibração, ocasionando desvios proporcionados pelos efeitos de matriz. Estes surgem de interações de elementos da amostra que afetam a intensidade da radiação emitida de uma forma não linear. O grau na qual ocorre quando um elemento absorve radiação depende de seu coeficiente de absorção por massa e da energia da radiação. O coeficiente de absorção por massa de uma amostra complexa é uma média ponderada dos coeficientes de cada elemento presente na amostra. Se a composição dos elementos da matriz varia de amostra para amostra, a intensidade da emissão dos elementos presentes dependerá da variação do coeficiente de absorção, assim como da concentração do elemento determinado.

Um elemento que apresentou elevadas concentrações nas amostras analisadas foi o Na. Apesar de suas altas concentrações relativas e não sofrer significativas interferências interelementos, este não apresentou boa linearidade. Uma das justificativas para o fato é algo já conhecido em análises por XRF. Em elementos de baixo número atômico, mais significativo do Na para menores Z, há uma diminuição nas emissões de fluorescência. Esse efeito é substituído, em parte, pelo efeito Auger, onde a energia liberada pela emissão do fóton após a retirada do elétron é suficiente para ser absorvida dentro do próprio átomo durante o caminho de saída. Isso provoca novas vacâncias, gerando novas emissões com outras intensidades de energia.

Assim, há diminuição na emissão de raios X na raia estudada, causando erros nas determinações, devido ao baixo rendimento de fluorescência, sendo, então, a calibração e determinação desse elemento dificultada.

A determinação de elementos em concentrações mais baixas e vizinhos na Tabela Periódica por EDXRF, onde há maiores sobreposições espectrais significativas, pode ser possível com escolha de diferentes linhas. O uso de análise multivariada nesses casos auxilia também na minimização de ruídos e detecção de fontes de fluorescência secundárias, aplicando-se modelos no espectro completo e em regiões de interesse, com as principais linhas dos respectivos analitos.

Para avaliar possíveis interferências sobre a estrutura física da amostra provenientes do preparo da pastilha (superfície, granulometria, compactação, entre outros), e verificar a precisão do método, foi selecionada uma amostra (6C), por ter grande quantidade de material, e preparadas dez pastilhas da mesma para análise. Os desvios relativos de cada elemento obtidos a partir das medidas ($n = 10$) estão listados na Tabela 17. A possível falta de precisão ou mesmo exatidão em outras amostras pode estar relacionada, entre outros fatores, ao tempo entre o preparo da pastilha e sua medida. As determinações foram feitas meses após o pastilhamento e, devido ao transporte e medida inicial por LIBS em algumas pastilhas, podem ter provocado ranhuras ou mesmo desgastes provenientes da ablação que causasse espalhamento aleatório do sinal, como discutido por Brisola e Fernandes (2008).

Tabela 17. Desvios padrão relativos (RSD %) das intensidades medidas dos elementos em uma amostra por EDXRF ($n = 10$), obtidos neste trabalho.

Analito	RSD	Analito	RSD	Analito	RSD
Al	2,32	Cu	2,97	Ni	1,70
As	6,05	Fe	5,42	P	2,83
Ba	4,99	K	3,82	Pb	6,05
Ca	2,07	Mg	4,07	Sn	23,4
Co	2,76	Mn	4,85	Sr	3,63
Cr	91,0	Na	2,54	Zn	2,23

Com relação aos dados apresentados na Tabela 17, os desvios padrão relativos iguais ou menores que 5 % representam que o preparo da pastilha foi eficiente para realizar análises por EDXRF. Os elementos que apresentaram valores

superiores, como As, Cr, Pb e Sn, tiveram suas intensidades dentro da flutuação de região do background do equipamento, não sendo, portanto, elementos em níveis detectáveis. Esses valores também garantem a reprodutibilidade e precisão dos resultados no método proposto.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir da análise de 10 amostras em branco (papel de filtro sobre filme polimérico em copo de amostragem), e valores de intensidade obtidos aplicados nas equações das retas, conforme a IUPAC. Eles podem ser visualizados na Tabela 18, abaixo.

Tabela 18. Valores dos limites de detecção e quantificação obtidos por EDXRF, em $\mu\text{g g}^{-1}$, neste trabalho.

Analito	LOD	LOQ	Analito	LOD	LOQ
Al	43,59	145,3	K	62,09	207,0
As	0,392	1,308	Mg	58,67	195,6
Ba	0,464	1,547	Mn	1,179	3,931
Ca	32,86	109,5	P	14,38	47,94
Co	2,444	8,149	Sr	0,729	2,429
Cr	0,671	2,237	Zn	1,862	6,208
Fe	2,735	9,117	-	-	-

O método para determinação elementar em pastilhas de macroalgas marinhas por EDXRF apresentou sensibilidade maior para dois elementos (As e Ca) que o método por ICP OES. Para alguns outros elementos, os limites estão similares e, mesmo para Ba e P e, principalmente Co, K, Mn e Mg, os valores de limites obtidos por EDXRF estão bem inferiores às concentrações encontradas nas amostras. Sendo esta uma técnica de análise direta, em que não há decomposição de amostra que acarretaria em uma diluição dos analitos, os limites apresentaram-se eficientes para determinação desses elementos.

Para verificação do grau de interferência matricial sobre as análises do método proposto, materiais de referência certificados foram analisados, os mesmos utilizados no procedimento de decomposição de amostra, exceto o BCR 414 – Plankton (por falta de material). Esses também passaram pelo mesmo procedimento de prensagem e foram analisados sob condições da metodologia em estudo. Identificados pela letra inicial e código correspondente, os resultados podem ser observados na Tabela 19.

Tabela 19. Valores determinados neste trabalho ($\mu\text{g g}^{-1}$) de cada analito dos CRMs por EDXRF e os respectivos percentuais de recuperação, destacados em negro.

		N1547	B60	B482	B670	N1515	N1570a	B279
K	Certificado	24300	-	-	-	16100	29000	13000
	Encontrado	31492	26701	6718	28560	20377	37323	14665
	Recuperação	129,6	-	-	-	126,6	128,7	112,8
Mg	Certificado	4320	-	-	-	2710	-	14000
	Encontrado	4003	4288	1843	3791	3126	5448	10257
	Recuperação	92,7	-	-	-	115,4	-	73,3
Ca	Certificado	15600	-	-	-	15260	15260	27000
	Encontrado	13401	20364	2705	18289	13621	12964	12155
	Recuperação	85,9	-	-	-	89,3	85,0	45,0
Sr	Certificado	53	-	-	-	25	55,54	-
	Encontrado	63	288	21	269	32	70	281
	Recuperação	118,9	-	-	-	128,0	126,0	-
Ba	Certificado	124	-	-	-	49	-	-
	Encontrado	6	15	12	6	3	2	9
	Recuperação	4,84	-	-	-	6,12	-	-
Cr	Certificado	1	-	4,12	2,05	-	-	10,7
	Encontrado	<LQ	19	7	3	<LQ	3	7
	Recuperação	-	-	169,9	146,3	-	-	65,4
Mn	Certificado	98	1760	-	-	54	76	2090
	Encontrado	130	2346	75	1935	68	101	2185
	Recuperação	132,7	133,3	-	-	125,9	132,9	104,5
Fe	Certificado	218	-	-	-	83	-	2400
	Encontrado	373	2817	1800	1525	154	431	2441
	Recuperação	171,1	-	-	-	185,5	-	101,7
Co	Certificado	-	-	-	-	-	0,393	-
	Encontrado	67	107	69	53	<LQ	17	121
	Recuperação	-	-	-	-	-	4325	-
Zn	Certificado	17,9	313	100,6	24	12,5	82,3	51,3
	Encontrado	17	144	76	37	15	44	27
	Recuperação	95,0	46,0	75,5	154,2	120,0	53,5	52,6
Al	Certificado	249	4180	1103	-	286	310	-
	Encontrado	1193	2718	1026	1177	603	696	7463
	Recuperação	479,1	65,0	93,0	-	210,8	224,5	-
As	Certificado	0,06	-	0,85	1,98	0,038	0,068	3,09
	Encontrado	2	63	42	13	<LQ	<LQ	10
	Recuperação	3333	-	4941	657	-	-	324
P	Certificado	1370	-	-	-	1590	5187	1800
	Encontrado	1384	3934	670	4826	1512	3845	1475
	Recuperação	101,0	-	-	-	95,1	74,1	81,9

Apesar de EDXRF não ser uma técnica quantitativa tão consolidada em amostras sólidas como algumas outras técnicas (a exemplo do GF AAS), aliada à limitação de padrões de calibração, interferências matriciais intensas e analisador não ideal para as pastilhas preparadas, a recuperação para K, Mg, Ca, Sr, Mn e P em CRMs foi boa, considerando que os teores destacados em vermelho não são certificados. Esses elementos apresentaram em suas curvas de calibração explicação da variável y pela x entre 92 a mais de 99 %, com exceção do fósforo, com aproximadamente 82 % e, além disso, dentre eles, Sr apresentou coeficiente angular, a , da curva próximo de 1, demonstrando boa aplicabilidade desses elementos pelo método proposto.

Em relação às demais amostras de macroalgas, que não participaram da calibração, os resultados obtidos por EDXRF e por ICP OES foram comparados graficamente para avaliar a relação entre as duas técnicas e a capacidade de predição dos resultados pelo método proposto. Os gráficos comparativos estão representados nas Figuras 19 a 21.

Conforme as curvas que descrevem a relação das concentrações das amostras entre as técnicas ICP OES e EDXRF, os elementos Ca, K, Mg e Sr apresentam menores dispersões de correlação. Além disso, possuem ângulos de inclinação próximos a 45° (coeficientes angulares em torno 1), exceto para Sr. Isso representa que Ca, K e Mg apresentam boas previsões de resultados quando comparados com ICP OES.

Magnésio apresentou melhores correlações, salvo para 2 amostras. Sem elas, o resultado gráfico está plotado e pode ser visualizado na Figura 22. Em seguida está o elemento Ca que, desconsiderando amostras das espécies *Codium isthmocladum*, *Hypnea musciformis* e *Agardhiella* sp., que não apresentaram nenhuma delas boas previsões, foram obtidos resultados comparáveis entre as técnicas. Isso pode ser um indicativo que este elemento pode estar estruturado de maneira diferenciada nos talos ou na granulometria da amostra e por isso serem até mais difíceis de serem decompostas.

Figura 19. Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Al, Ba, Ca e Co, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES *versus* EDXRF.

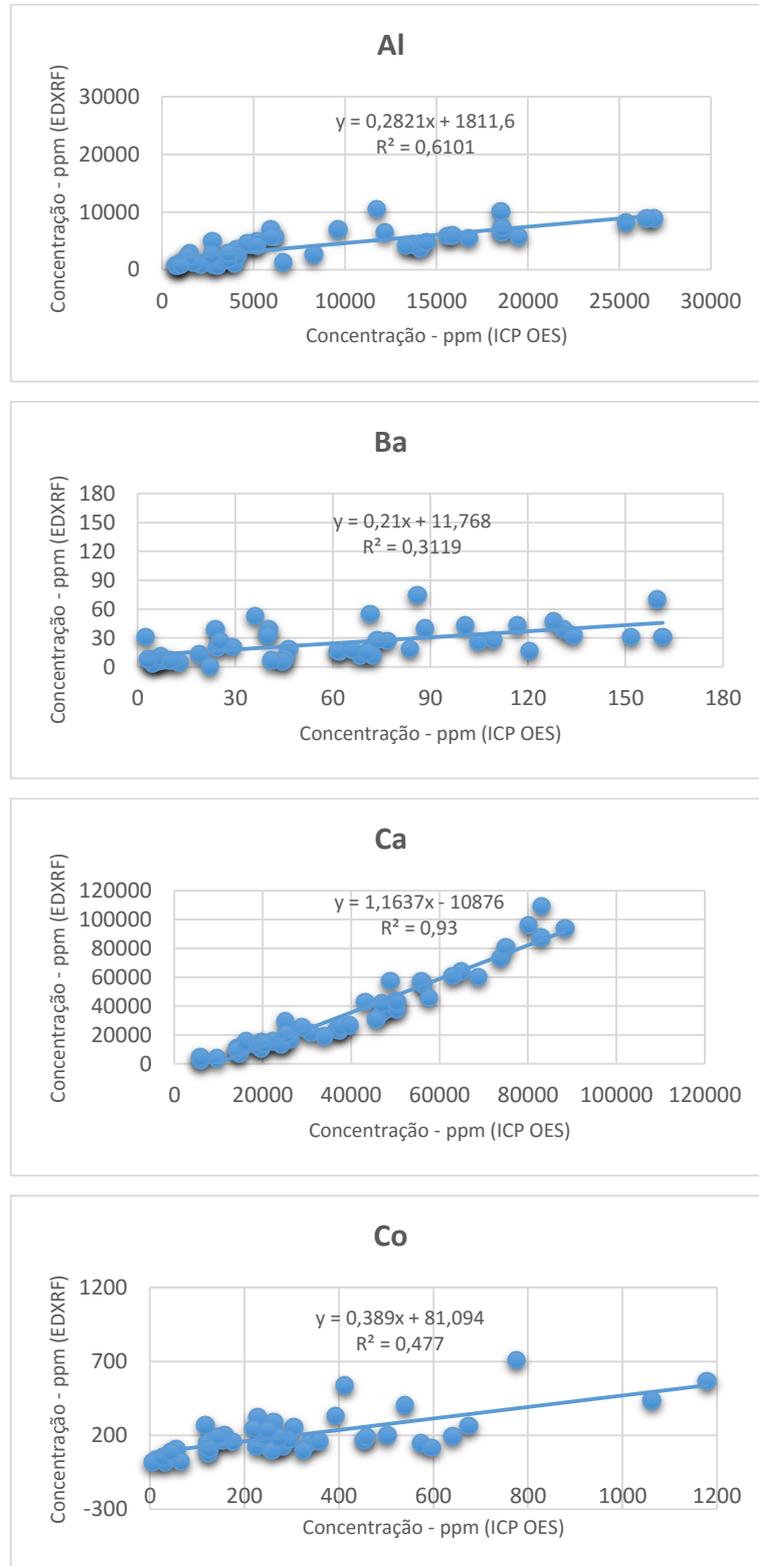


Figura 20. Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Cr, Fe, K e Mg, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES *versus* EDXRF.

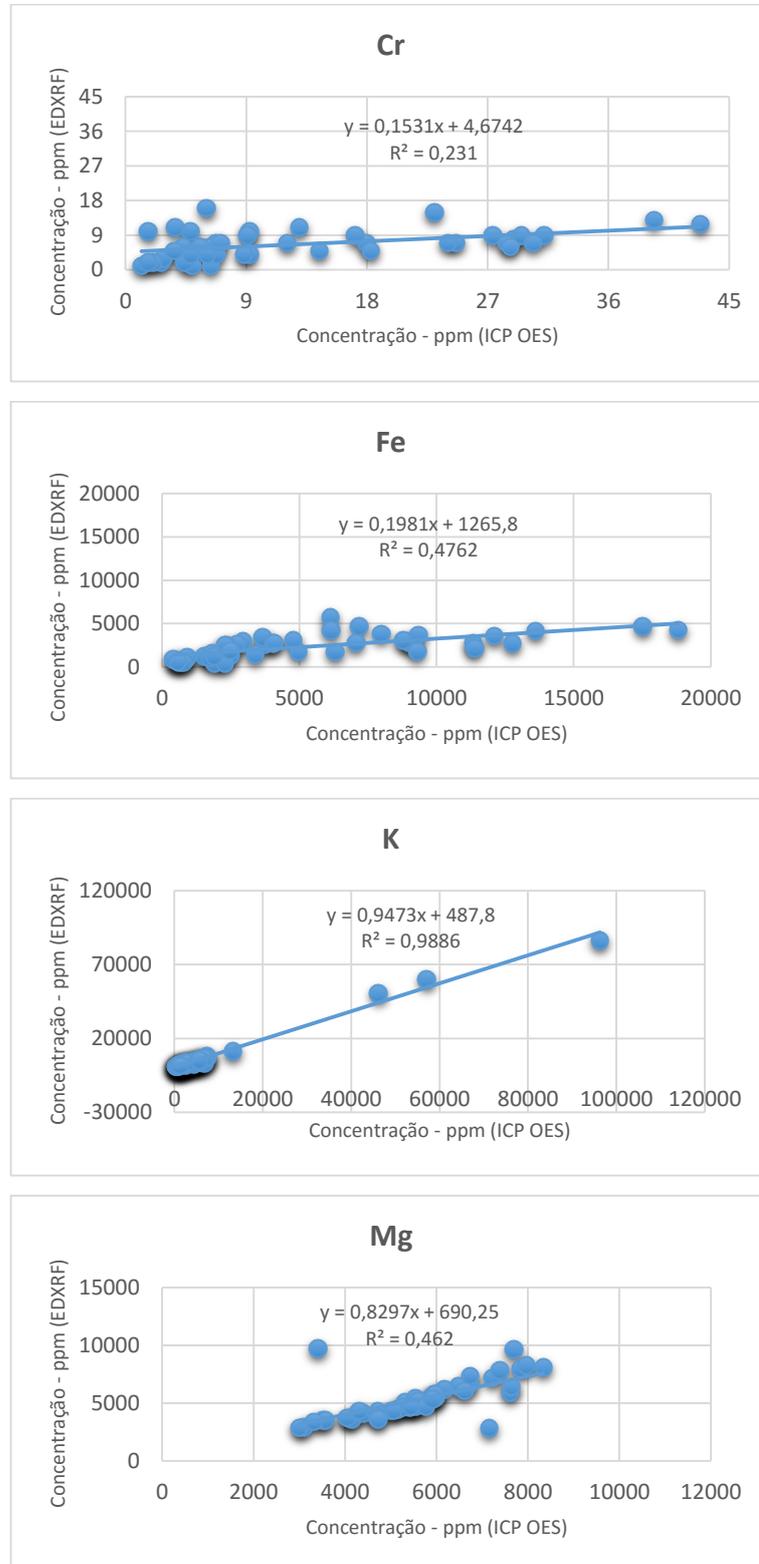


Figura 21. Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Mn, P, Sr e Zn, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES *versus* EDXRF.

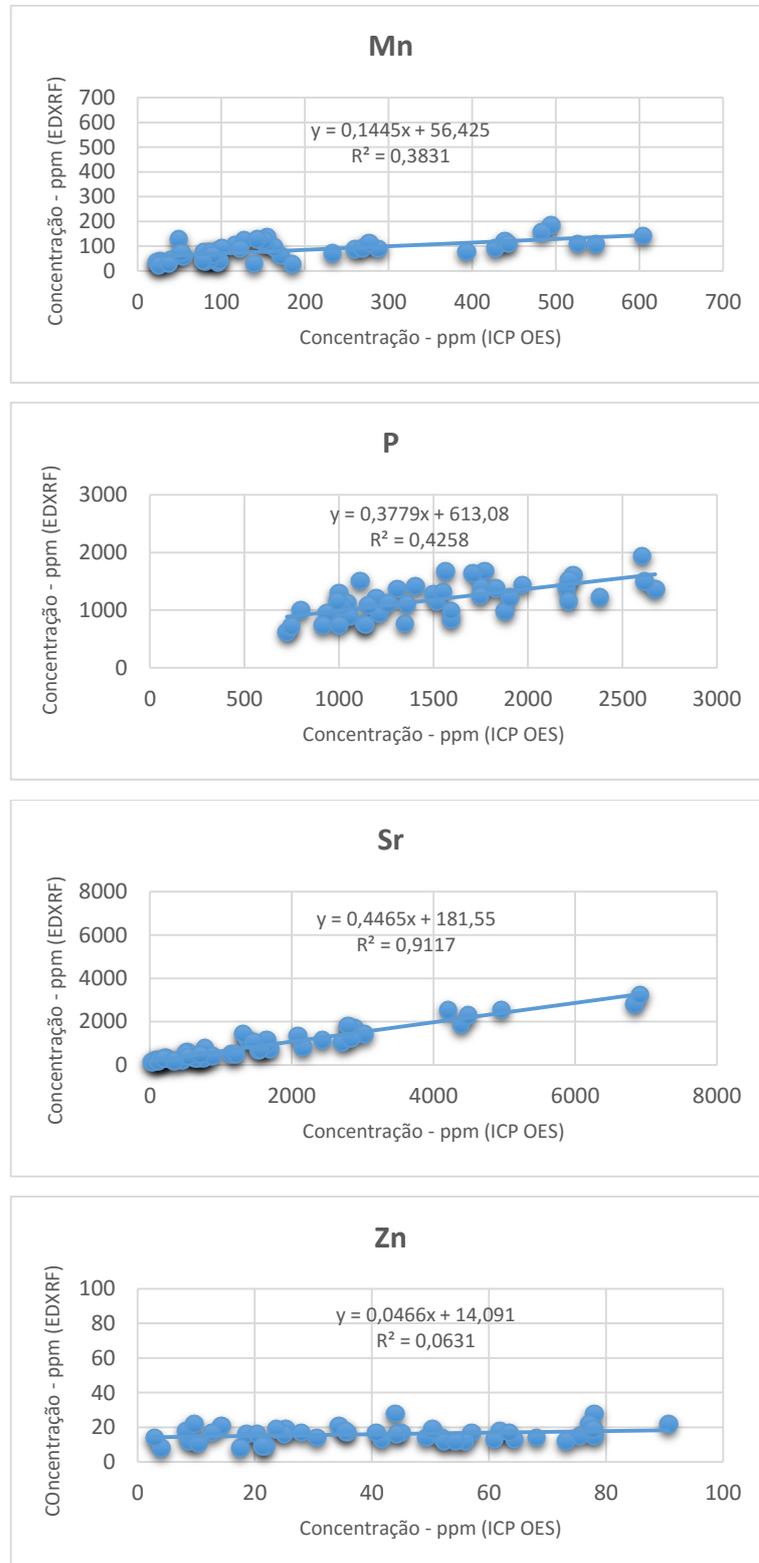
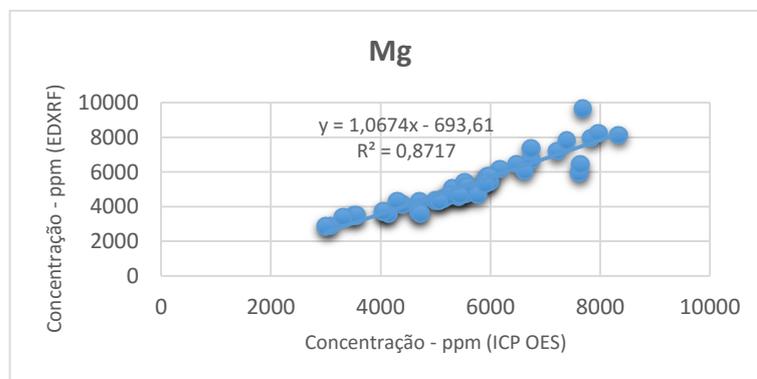


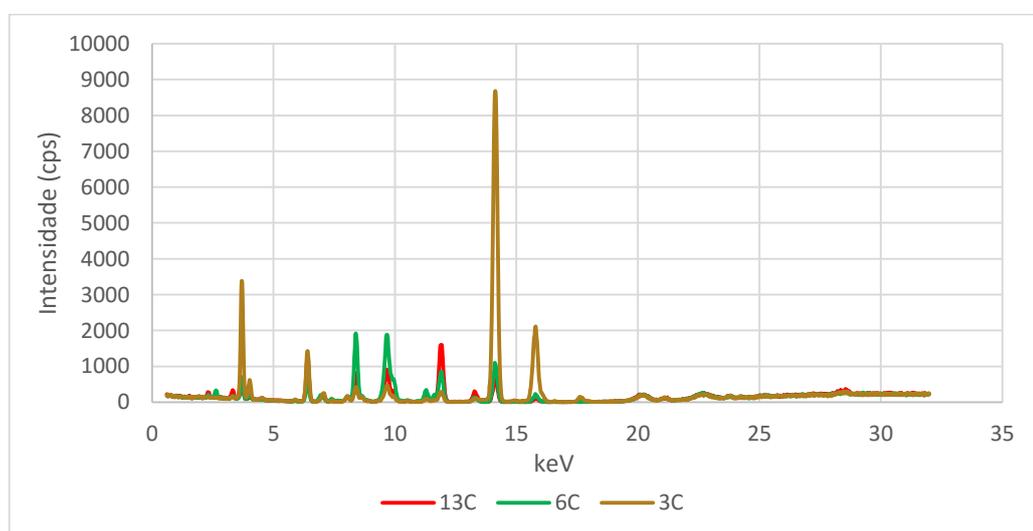
Figura 22. Curvas de regressão obtidas neste trabalho, em $\mu\text{g g}^{-1}$, para Mg, correlacionando resultados de macroalgas por ICP OES *versus* EDXRF, após retirada de 2 amostras.



Considerando-se que as diferentes espécies de macroalgas podem apresentar comportamentos característicos sobre sua composição química e, sendo o EDXRF conhecido como uma técnica não destrutiva que faz análises no reconhecimento de padrões espectrais, foram estudados os espectros das análises para fazer uma avaliação e verificação no reconhecimento de padrões que caracterizem diferentes algas.

Inicialmente, três amostras de diferentes filios (vermelha, parda e verde) foram selecionadas aleatoriamente para verificar diferenças espectrais. O gráfico que representa esta informação está plotado na Figura 23.

Figura 23. Gráfico keV *versus* cps de 3 amostras de algas estudadas neste trabalho de diferentes filios, obtidos por EDXRF (13C – vermelha, 6C – verde e 3C – parda).



A partir do gráfico, pode-se perceber algumas pequenas diferenças espectrais com raias em destaque para a alga parda nas regiões de aproximadamente 4 e 14 keV, podendo ser referentes ao Ca e Sr, respectivamente. Como alguns elementos com teores significativos presentes nas amostras não foram estudados, não há garantia dessa informação citada. Para a alga verde, a região entre 8 e 10 keV foi destacada.

Para verificar se esse comportamento ocorre com as demais algas, foram construídos 3 gráficos distintos, um para cada conjunto de algas dos diferentes filos, como plotados na Figura 24.

Como pode ser observado nos gráficos da Figura 24, as demais algas vermelhas e verdes não apresentam picos intensos nas raias próximas a 14 e 16 keV, como acontece com algas pardas. Para as amostras das algas verdes, a região entre 8 e 10 keV apresentam picos sempre mais pronunciados e, de uma forma geral, um espectro com baixas intensidades nas demais regiões, quando comparadas com as amostras de algas vermelhas e pardas.

Para analisar esse padrão, aplicações de técnicas quimiométricas baseadas em métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões por PCA e HCA foram feitas sobre o gráfico das energias, no intuito de obter uma verificação de similaridade e formação de grupamentos entre as amostras. Devido ao volume de informações contidas num espectro ser maior que a capacidade que é comportada para formação de uma matriz no programa utilizado (Statistica 8.0, Stat Soft Inc. 2007), regiões do gráfico de energia *versus* intensidade do sinal foram cortadas, mantendo-se as raias mais intensas. A Figura 25 mostra a região trabalhada.

Foi construída uma matriz de dados (46x254) na qual as amostras foram dispostas em linhas e as informações espectrais (raias energéticas), variáveis, em colunas. Os dados foram pré-processados centrados na média e por autoescalamento, sendo que não houve variação nos resultados dentre eles por PCA ou HCA. Na análise de componentes principais, o total de variância (%) que explicou significativamente a variabilidade dos dados abrange até a 8ª PC (>1). Porém, as 2 primeiras PCs descrevem 71,2% da variação total (Figura 26). A primeira componente é responsável por 42,58% e a segunda componente por 28,63% da informação acumulada. Uma tendência de grupamento foi visualizada quando os dados foram expostos com relação a essas componentes, como pode ser visualizado na Figura 27.

Figura 24. Gráficos espectrais keV versus cps das amostras de algas da 3ª coleta estudadas neste trabalho, obtidos por EDXRF.

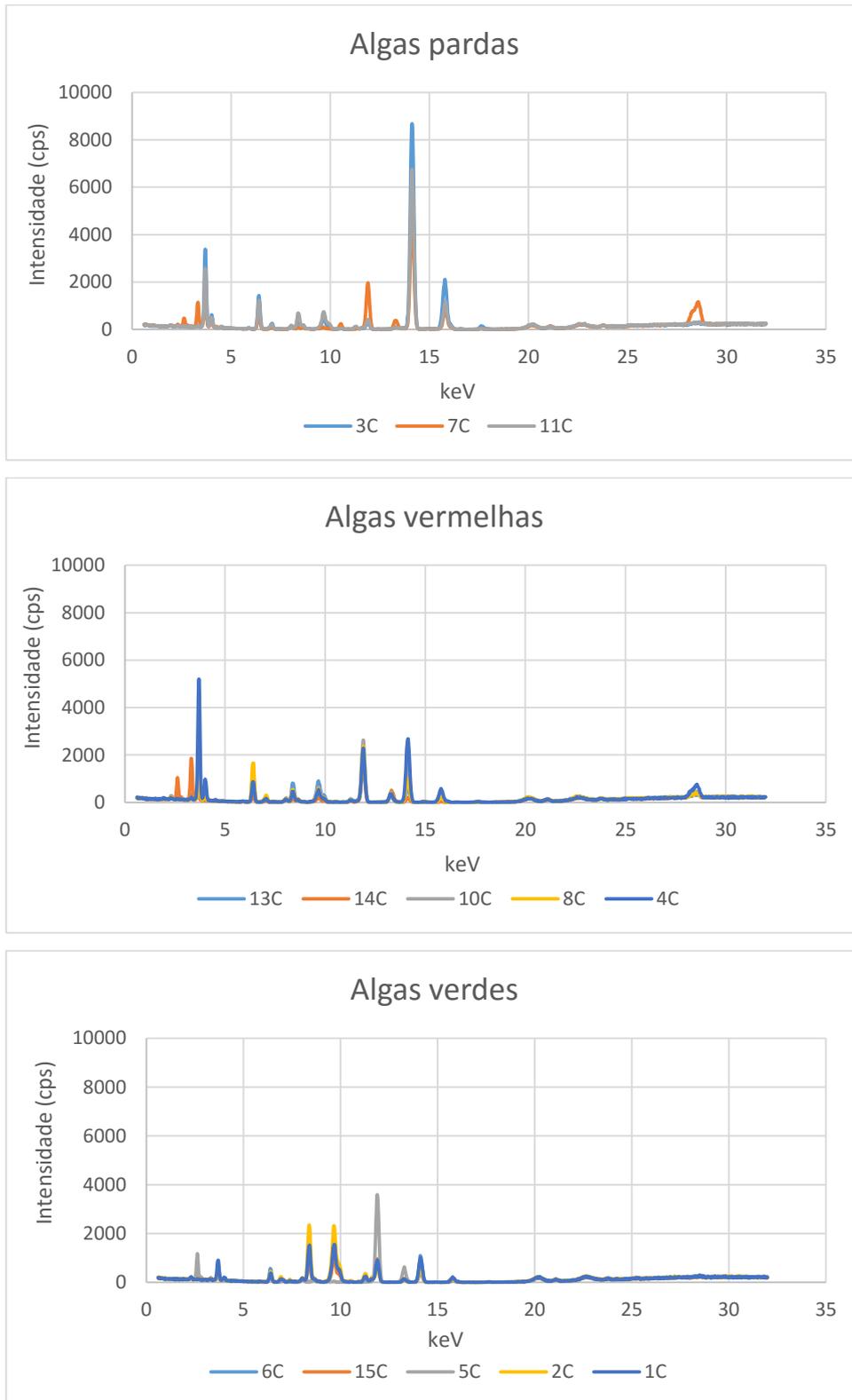


Figura 25. Espectro de emissão de fluorescência obtidos por EDXRF (keV versus cps) de 46 amostras analisadas neste trabalho, delimitadas nas regiões de sinais mais intensos.

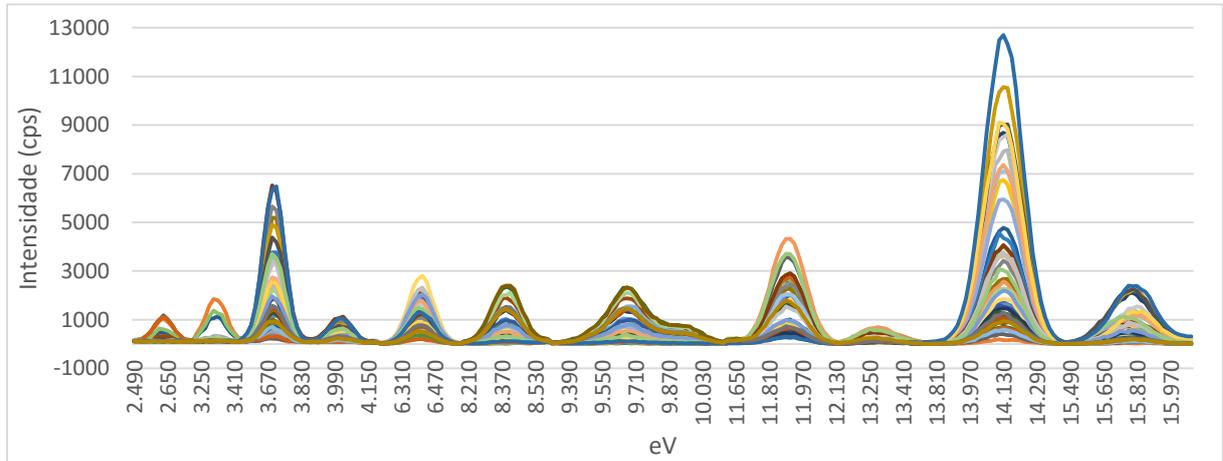
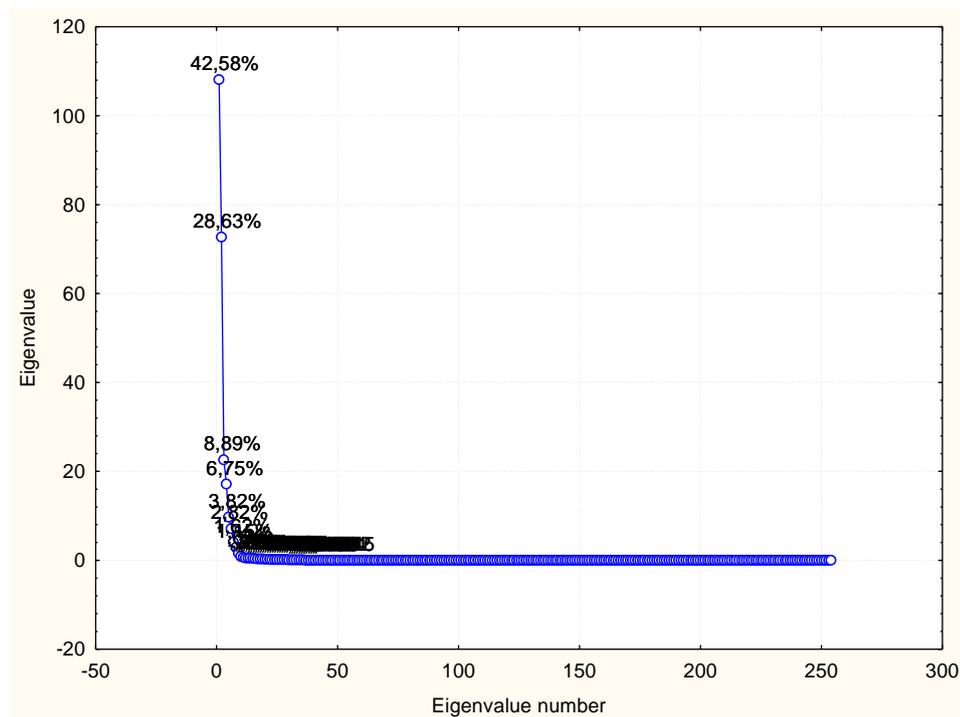


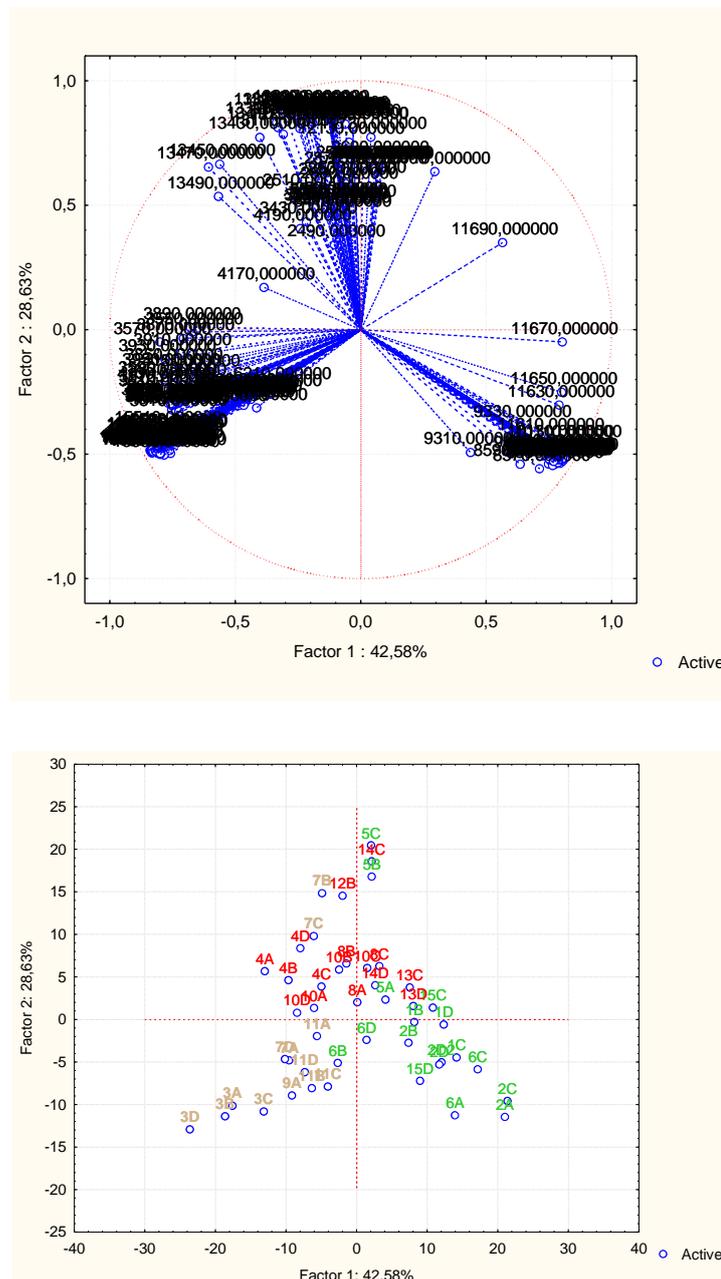
Figura 26. Importância das PCs sobre a explicação da variabilidade total dos dados obtidos nas análises de macroalgas por EDXRF.



O gráfico de *loadings*, por constarem 254 informações espectrais, formam aglomerados de difícil visualização e interpretação, com pesos em 3 regiões distintas do espaço. Porém, conforme exposto nos gráficos das Figuras 23 e 24, essa separação pode ser correspondente ao comportamento distinto de cada filo, principalmente com relação aos picos nas regiões próximas a 4, 8, 9 e 14 keV.

No gráfico de scores é possível perceber uma tendência a formação de 3 grupos, referentes às características de cada um dos 3 filios de macroalgas marinhas. Elas estão representadas pelas cores correspondentes de cada filo (parda, vermelha e verde). As amostras de algas vermelhas se concentram nos scores positivos em relação à PC2. Já as pardas e verdes localizam-se, prioritariamente, nos scores negativos dessa PC. Essas estão separadas pelos scores negativos e positivos, respectivamente, em relação à PC1.

Figura 27. Gráficos de PC1 versus PC2 para *loadings* (cima) e *scores* (baixo) dos dados espectrais obtidos por EDXRF das amostras de macroalgas estudadas.



A fim de avaliar o comportamento encontrado na PCA para as amostras estudadas, uma análise por HCA foi feita e os resultados estão mostrados nas Figuras 28 e 29.

Figura 28. Dendrograma das 254 variáveis das análises de macroalgas por EDXRF.

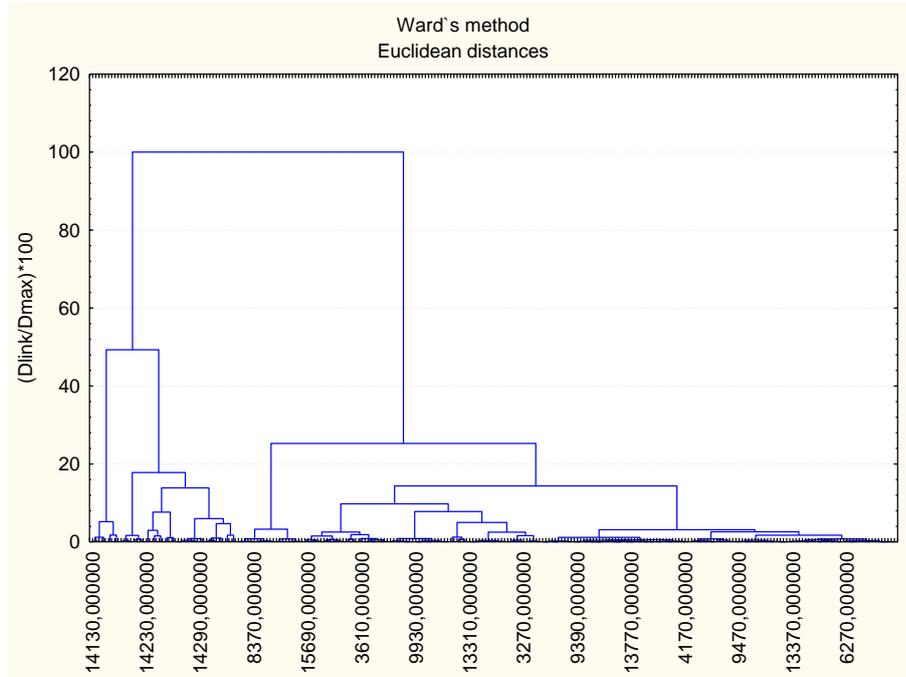
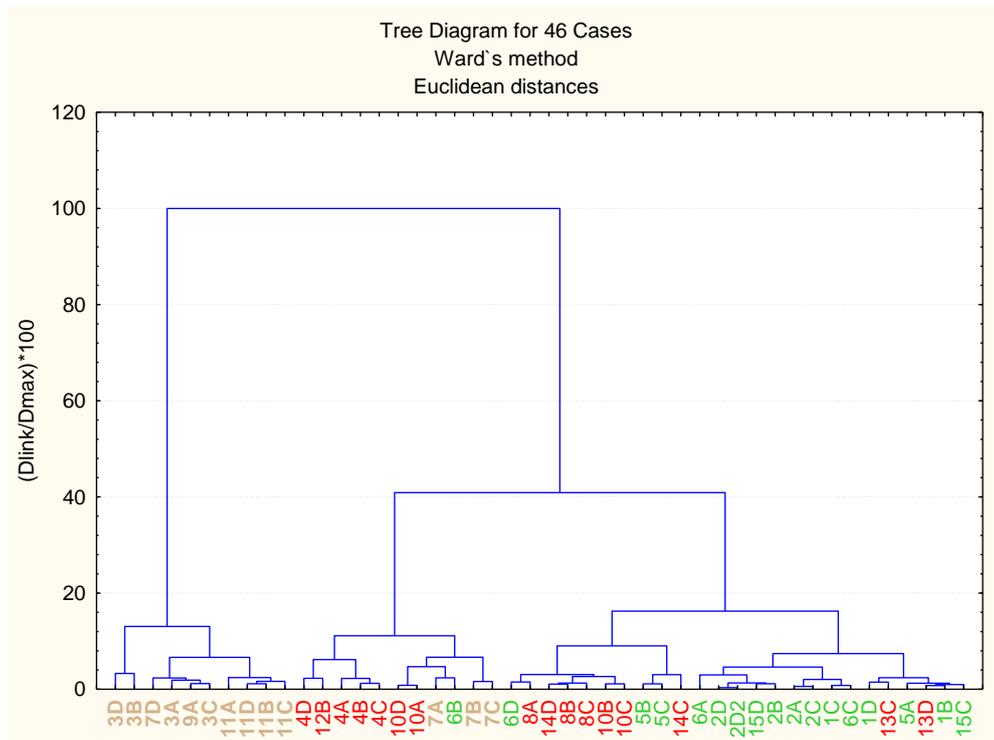


Figura 29. Dendrograma dos 46 casos das análises de macroalgas por EDXRF



Pelos dendogramas formados, é possível notar a separação inicial de dois grupos bem distintos, com elevada dissimilaridade. Um grupo é referente às algas pardas (com exceção de uma espécie, *Sargassum* sp., coletadas em 2 períodos) e o outro referente às amostras dos filios verde e vermelho.

As algas pardas apresentam quase 90% de similaridade entre si por sua composição. Comparando os dendogramas formados, essa similaridade é proveniente principalmente pela raia de 14 keV, notada anteriormente nos gráficos espectrais das algas pardas. Essa região corresponde às intensidades de Sr, que apresentaram elevadas concentrações nas amostras desse filo, diferentemente das demais amostras, conforme resultados obtidos. Entre vermelhas e verdes há em torno de 60% de similaridade, sendo que as verdes compõem um grupo mais distinto com aproximadamente 90% de similaridade entre si, salvo duas espécies que diferem das demais em torno de 20%.

O resultado por HCA demonstrado acima corrobora com as informações apresentadas em PCA. Esse comportamento demonstra uma característica distinta na composição elementar nas diferentes macroalgas de diferentes filios e a potencial capacidade de EDXRF fazer análise química para posterior diferenciação das amostras a partir da informação espectral. Os elementos determinados que mais contribuíram para essa diferenciação foram Sr (elemento de alto teor nas macroalgas pardas), Ca, K e Mn (elementos que se apresentaram em baixas concentrações nas algas verdes) e Na (elevados teores encontrados nas algas pardas e verdes). Além desses, há ainda os elementos não estudados que contribuem para uma diferenciação entre os perfis. De uma forma geral, as amostras de macroalgas do filo marrom apresentaram maiores capacidades de acumulação dos elementos em seus talos, diferentemente das do filo verde, que apresentaram as menores acumulações.

5.3 DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO POR LIBS

Esta etapa do trabalho está relacionada com o desenvolvimento de metodologia de análise de macroalgas em pastilhas por LIBS, sem uso de padrões de calibração. Para tanto, aplicação de ferramentas de análise multivariadas foi utilizada de forma a avaliar a metodologia na predição dos resultados.

Por não haver padrões de calibração compatíveis com a matriz, a curva de calibração e validação da metodologia proposta dessa etapa foram feitas analisando

a construção de modelos matemáticos com ferramentas quimiométricas. Foram propostos modelos de calibração por regressão multivariada empregando PLS (*Partial least squares*) e valores de referência obtidos após digestão ácida e determinação por ICP OES.

Além das amostras utilizadas para a metodologia por EDXRF, outras 17 amostras de dois táxons de macroalgas marinhas coletadas anteriormente ao desenvolvimento deste trabalho (12 representantes do gênero *Padina* sp. e 5 da espécie *Caulerpa racemosa*) foram utilizadas para aumentar o espaço amostral no desenvolvimento da metodologia proposta. Essas amostras passaram pelos mesmos procedimentos de decomposição ácida e determinação por ICP OES e prensadas para obtenção de pastilhas.

Os elementos de estudo selecionados inicialmente foram os que apresentaram maiores concentrações nas amostras de macroalgas marinhas (Ca, Na, K, Mg, Al, P, Fe e Sr). Foram feitas medidas nas amostras por LIBS e obtidos espectros de cada uma. Para uso em calibração multivariada, os dados espectrais foram tratados, selecionando regiões delimitadas por comprimentos de onda (λ) onde apresentaram sinais mais intensos referentes a cada analito, permitindo minimizar erros de previsão nos modelos a serem gerados. Na Tabela 20 e Figuras 30 e 31 constam as regiões do espectro delimitadas, com base de dados do NIST sobre sinais mais intensos dos elementos.

Tabela 20. Faixas de comprimentos de onda referentes aos analitos determinados por LIBS em macroalgas, delimitadas para construção de modelos de PLS.

Analito	Faixas de λ
Al	306,413-311,106 / 394,069-397,957
Ca	315,523-318,25 / 373,377-373,863 / 392,584-393,991 / 396,405-397,181
Fe	259,595-260,136 / 273,793-276,976
K	404,037-405,03 / 765,867-772,086
Mg	277,494-282,125 / 381,908-385,728 / 513,975-521,092
Na	329,153-330,97 / 587,687-591,097 / 818,52-822,028
P	213,47-213,668 / 253,168-255,361
Sr	337,766-338,194 / 346,194-346,617 / 407,39-408,073 / 415,965-416,858 /421,222-423,35 / 429,884-432,539

Figura 30. Regiões espectrais fragmentadas referentes a cada elemento (Ca, Fe, Na e K) para uso nos modelos de PLS nas amostras de macroalgas.

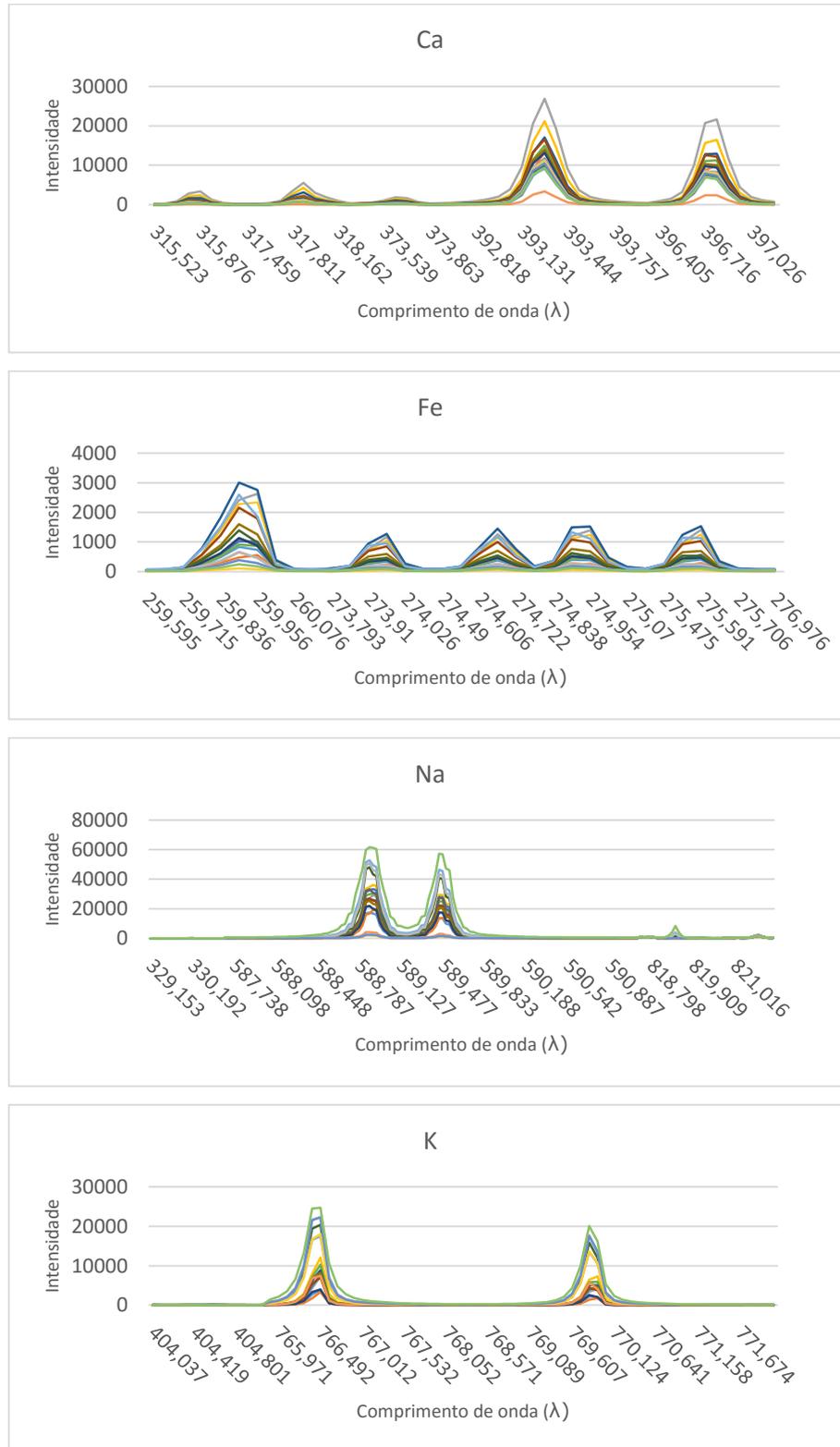
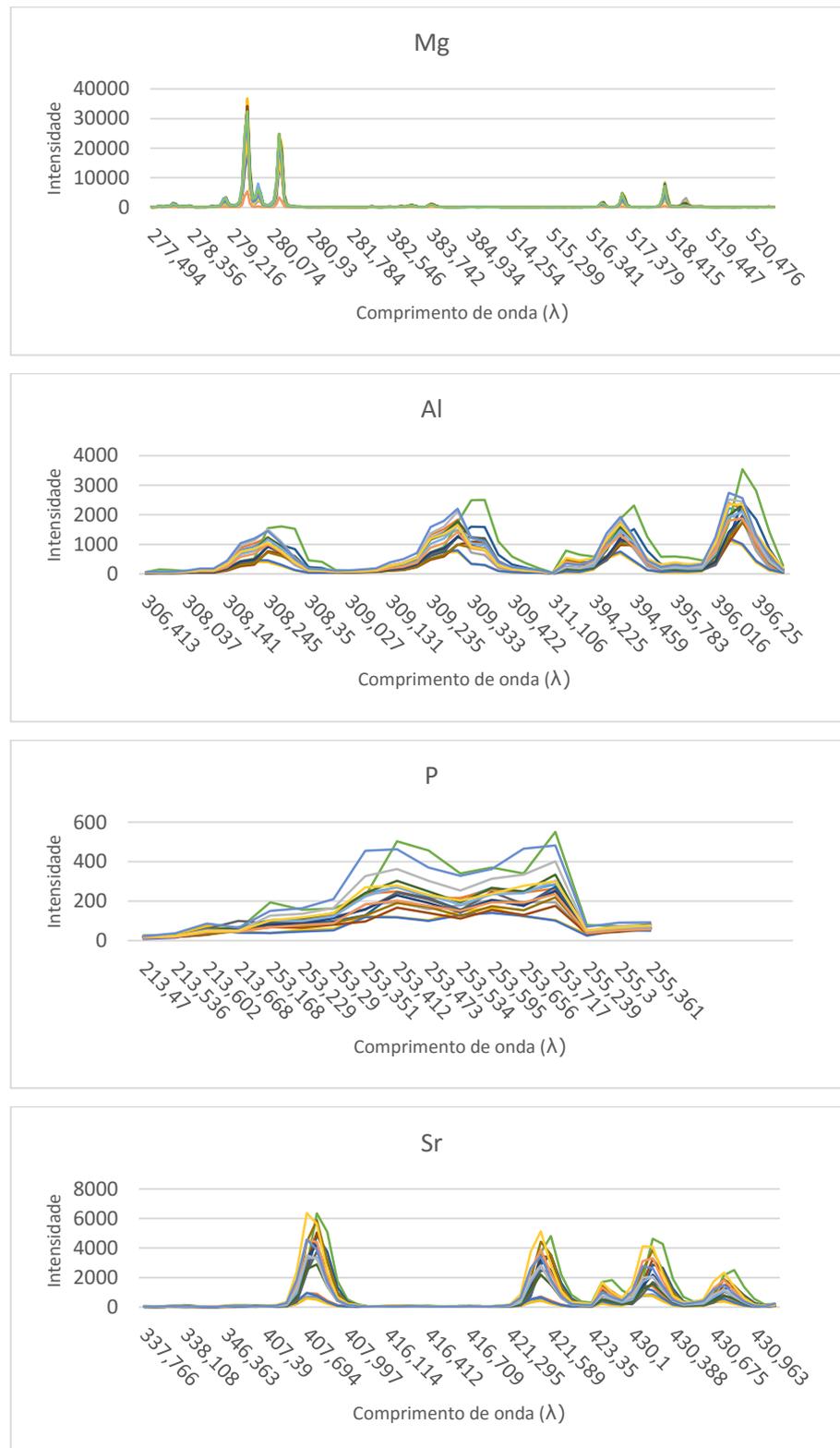


Figura 31. Regiões espectrais fragmentadas referentes a cada elemento (Mg, Al, P e Sr) para uso nos modelos de PLS nas amostras de macroalgas.



Foram feitos testes iniciais de modelagem para esses elementos e, devido à sensibilidade da técnica e à falta de ajuste dos modelos, Al, P e Sr foram

desconsiderados. Após a delimitação dos analitos (Ca, Na, K, Mg e Fe), ajustes para nova calibração foram feitas, como explicado a seguir.

Para modelagem de cada elemento, as amostras foram divididas em dois conjuntos: um composto por 52 macroalgas (de calibração) e outro para verificação dos resultados (de validação), este constituído de 7 CRMs de material vegetal e 11 amostras coletadas. Os teores determinados foram comparados com resultados certificados e obtidos em metodologia validada, respectivamente.

Foram estabelecidas duas matrizes na construção do modelo de regressão multivariada por PLS. A primeira – X ($n \times m$), de variáveis independentes – constituída a partir dos dados espectrais obtidos de quatro análises de cada amostra pastilhada, principalmente na região do ultravioleta e visível (200-800 nm). Nela, cada linha representava a amostra e as colunas as respostas medidas, ou seja, os comprimentos de onda (λ). A segunda matriz – Y ($n \times m$), de variáveis dependentes – constituída pelas amostras, em linhas, e suas propriedades (concentração do analito) em colunas. Foi utilizado o ambiente computacional MatLab aplicando pré-processamento de dados centrados na média, o qual calculou a média dos dados de cada coluna e fez subtrações de cada dado individual.

A partir das matrizes geradas, os modelos foram construídos utilizando-se o programa Pirouette 4.5. A modelagem foi feita matematicamente por relação linear das duas matrizes formadas. Para determinação das variáveis latentes, as quais descrevem a direção máxima de variância correlacionada com a concentração dos analitos, aplicou-se uma validação cruzada (validação interna) no conjunto de calibração: uma amostra do conjunto de calibração foi excluída, o modelo construído e, então, estimado sua concentração. Esse processo é repetido até que todas as amostras sejam previstas para “n” variáveis latentes (VL).

A determinação do número de VL é uma etapa importante para construção do modelo, pois quanto maior seu número no modelo, menor será o desvio da curva de calibração e maior o percentual de explicação do modelo. Entretanto, o aumento de VL também aumenta o ruído e os erros de modelagem (MACHADO; SILVA, 2013). Foram determinadas quantidades de VLs conforme menor variação no erro médio (RMSECV). Este é a raiz quadrada do somatório das diferenças dos valores estimados com os de referência, elevados ao quadrado, em relação ao número de amostras no modelo gerado (similar a uma variância). Dessa forma, os dados dos modelos estão listados na Tabela 21.

Tabela 21. Dados dos modelos de PLS gerados para cada analito, obtidos a partir das análises de macroalgas por LIBS.

	Ca	Fe	K	Mg	Na
Variáveis	55	35	75	235	180
VLs	3	1	1	1	2
%	99	58	94	34	94
RMSECV ($\mu\text{g g}^{-1}$)	9094	3471	4264	1315	2580
R² validação	0,9174	0,6284	0,9626	0,5299	0,9781

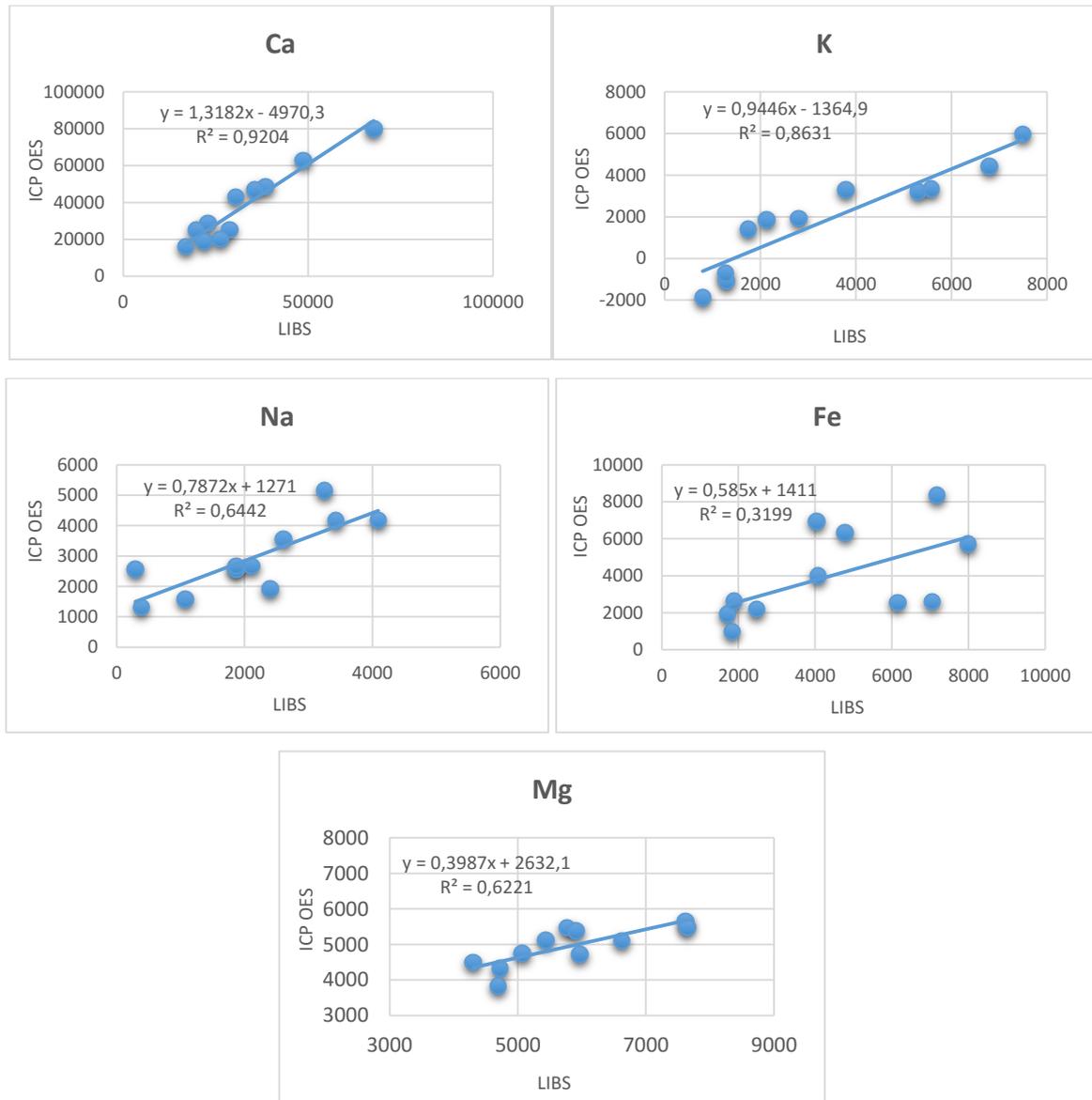
Os valores referentes à determinação da curva de calibração apresentaram resultados bons para os elementos Ca, K e Na. Para Fe e Mg verificou-se uma falta de ajuste para seus modelos, nos quais explicaram um baixo percentual da variância total entre as variáveis independentes e dependentes (<60%). Esse fato se reflete ao RMSECV, onde a média dos erros associados aos valores previstos em relação aos de referência foram mais elevados para os elementos Fe e Mg, proporcionalmente em relação ao valor médio das amostras usadas para a modelagem, bem como o coeficiente de determinação (r^2) do modelo foram baixos (<0,9).

Após a seleção do número de variáveis latentes, o modelo de regressão pode ser construído e deve ser validado empregando-se amostras que não participaram da calibração (validação externa). Essas amostras devem ter seus valores da propriedade de interesse previamente conhecidos, para avaliar a real capacidade de previsão do modelo. Para avaliação do conjunto de amostras de validação, os coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir da relação linear entre os valores das concentrações preditas pelo modelo, utilizando espectros, e os valores referência das amostras do conjunto de calibração e de validação foram verificados. Os valores previstos para essas amostras devem ser concordantes com os valores reais e, portanto, em um gráfico contendo essas duas grandezas, os valores das amostras devem estar próximos a uma reta com inclinação próxima a 1 unidade. Os gráficos podem ser visualizados na Figura 32.

O valor do erro médio de previsão (RMSEP), utilizado para avaliar o ajuste do modelo como parâmetro de exatidão – calculado similarmente ao RMSECV, mas aplicando-se nas amostras de validação – calculado para cada analito, foram bons apenas para Ca, Mg e K, sendo que para este último teve-se que desconsiderar dois valores que se apresentaram bem abaixo da linearidade da curva (sinais negativos),

fazendo elevar o RMSEP. As recuperações (em %) para os CRM variaram de: 124 a 134 (Ca), nd e 275 (Fe), 84 a 90,7 (K), 59,5 a 4953 (Mg), nd e 87,1 (Na).

Figura 32. Gráficos de relação de teores, em $\mu\text{g g}^{-1}$, dos elementos determinados em macroalgas do conjunto de validação por ICP OES versus LIBS.



Devido esta técnica apresentar interferências de matriz, bem como estar sendo aplicada a amostras que não se garanta a representatividade da área analisada ao todo, essas informações podem não refletir com segurança as potencialidades da técnica. Nesse caso, PLS em análises de macroalgas por LIBS apresentou boa capacidade preditiva para os elementos Ca e K em macroalgas. Os resultados

apresentados nos gráficos demonstram dados semelhantes sobre esses dois elementos, nos quais o coeficiente r^2 e a inclinação da reta estão concordantes com os dados encontrados na literatura, com futuras perspectivas para essa técnica em determinações de amostras sólidas sem padrões para calibração.

Para fazer uma melhor caracterização da metodologia em estudo, muitas informações e parâmetros necessitariam ser verificados a fim de se obter um método mais eficaz na predição dos resultados. Devido ao tempo destinado ao desenvolvimento deste projeto, não foi possível tê-los como objeto de estudo. Outras variáveis instrumentais devem ser testadas, de forma a serem otimizadas, garantindo maior confiabilidade do método. Podem ser citadas: potência do laser, comprimento de onda (que pode ocasionar blindagem do plasma), número de pulsos, duração do pulso e tempo de integração.

Outro fator que afeta significativamente a resposta em análises por essa técnica é o tempo de atraso (ou de espera). Este é o tempo decorrido entre a incidência do laser sobre a amostra e o início da integração do sinal. Um tempo pequeno, normalmente menor ou igual a 1 μ s, acarreta na obtenção de um elevado *background*, na detecção de intensidade do contínuo sobre a intensidade de emissão do analito. Tempos muito elevados podem proporcionar que a medida seja feita numa atmosfera com menos íons, quando há um decaimento desses e há um aumento da população dos átomos neutros, com plasma gerado menos intenso. Assim, há uma perda da sensibilidade nas medidas. Um tempo ótimo garantiria uma análise para determinação de elementos em níveis de concentração menor, com maior relação sinal/ruído.

Um estudo desenvolvido por Carvalho e colaboradores (2012) verificou a influência de dois parâmetros instrumentais em análises de plantas em pastilhas. Foram usadas as condições de Laser de Nd:YAG (1064 nm), 5 ns de pulso, 10 Hz de taxa de repetição, 2 μ s de tempo de atraso, 5 μ s de integração e 30 locais na superfície para análise, sendo 20 pulsos por local. Os autores observaram que quanto maior o valor das variáveis estudadas (fluência do laser e tamanho de área ablada), chegando a 50 J cm⁻² e 750 μ m, respectivamente, maior a intensidade de emissão e menor coeficiente de variação para analitos em concentração micro e macro.

Um trabalho baseado em análise de algas por LIBS foi publicado e desenvolvido por Garcimuño, Díaz Pace e Bertuccelli (2013). Eles determinaram Cu em algas para obter um método de diagnóstico ambiental. A quantificação de Cu por LIBS foi realizada em pastilhas de algas, previamente convertidas em meio líquido, e

misturadas com óxido de cálcio em pó, segundo metodologia descrita anteriormente por Díaz Pace e colaboradores (2006). A mistura foi seca antes da prensagem. Além disso, utilizou-se aglutinante para aumentar a resistência física, evitando desintegração após a ablação a laser. Assim, sua forma estrutural foi destruída, facilitando as análises, minimizando erros provindos de suas características físicas. Um tempo maior foi gasto no preparo de amostra e a calibração foi feita por adição de analito em amostras de algas tratadas, coletadas em região pouco impactada.

Quanto à instrumentação, uma fonte de Nd:YAG (λ 1064 nm) foi usada, trabalhando-se com uma potência de laser mais elevada que este trabalho (100 mJ), um tempo de atraso de 6 μ s com janela de 0,6 μ s e taxa de repetição de 2 Hz. A configuração instrumental, apesar de diferenciada quanto ao trabalho aqui desenvolvido, não pode ser considerada como condição mais eficiente em determinações desse elemento (Cu), quando a forma de amostragem para a análise foi bem diferenciada.

Em um trabalho desenvolvido por Trevizan e colaboradores (2008), P, Ca, K e Mg foram determinados em diferentes plantas na forma de pastilhas por LIBS. A metodologia foi desenvolvida utilizando-se CRMs como padrões de calibração em calibração univariada. Ainda nessa perspectiva, Trevizan e colaboradores (2009), determinaram B, Cu, Fe, Mn e Zn em pastilhas de plantas. A potência do laser utilizada foi de 200 mJ, com taxa de 10 Hz. Obtiveram limites de detecção adequados, apesar de relatarem dificuldades nas análises quanto à estrutura da matriz e quantidade de amostra, obtendo coeficientes de variação de até 30%.

Diante do exposto, um estudo sobre os fatores que podem interferir nas análises é de grande importância para obter um método analítico mais eficiente. Aliado a este fato, a aplicação de planejamento experimental multivariado serve como importante ferramenta que permite a variação simultânea dos fatores experimentais a serem investigados e avaliação da possível interação desses fatores, estimando seus efeitos em menos tempo e número de experimentos, aproveitando importantes informações do sistema.

5.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE EDXRF E LIBS

Por serem técnicas de análises comparativas, a exatidão por EDXRF e LIBS dependem de vários fatores, tais como: qualidade dos padrões, da calibração, do

preparo de amostra e da reprodutividade do ensaio. Nas análises para ambas as técnicas, a otimização de parâmetros instrumentais é de suma importância para garantir maior detectabilidade e confiabilidade dos resultados.

Além dos parâmetros instrumentais, o tamanho de partículas é um fator crítico em análises de plantas em pastilhas por análise direta, pois as mesmas apresentam-se de forma heterogênea em microescala. A estrutura da pastilha e a eficiência nas medidas dependem principalmente da distribuição no tamanho de partículas. Para a realização das análises, a incidência do laser e dos raios X devem compreender a maior área dentro da qual todas as partículas que compõem a amostra devem estar disponíveis para que a determinação seja precisa. Por isso, um estudo sobre efeitos de preparo da pastilha serviria como suporte na avaliação da eficiência analítica, uma vez que amostras de plantas apresentam microheterogeneidade, dificultando análises dessa natureza. Para tanto, fatores como tipo e tempo de moagem, homogeneização, escolha do tamanho de partículas, tempo e pressão aplicadas no pastilhamento devem ser investigados.

Em LIBS, estudos relataram que em medidas com esse tipo de matriz, o tamanho da cratera formada pelo pulso do laser apresenta uma forma mais heterogênea quanto maior for o tamanho de partículas amostradas para análise. Isso acarreta um coeficiente de variação elevado e falta de reprodutibilidade nos resultados. Esses desvios ficam menos significativos quando a granulometria apresentada é menor que 75 μm (CARVALHO et al., 2015). Acima disso, a presença de fibras vegetais interfere nas medidas, provocando dispersão nos resultados obtidos.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que uma das razões sobre as quais LIBS apresentou capacidades de predição inferiores em relação ao EDXRF pode ser devido ao fato da falta de estudos otimizados dos diferentes parâmetros que afetam significativamente as medidas para esse tipo de amostra por LIBS. Por outro lado, esta técnica demonstrou ter uma capacidade, ainda que precise ser ajustada, para predição e determinação de elementos que por EDXRF é dificultada, como é o caso de Na.

Apesar de possuírem características similares na forma de análises, fica difícil uma comparação entre as duas técnicas estudadas (EDXRF e LIBS), uma vez que os desenvolvimentos das metodologias de análise foram feitos de forma distinta, a partir de determinação por calibração univariada e multivariada, respectivamente.

6. Conclusão

É possível concluir que para as análises diretas em amostras de macroalgas marinhas por EDXRF, os elementos Ca, K e Mg apresentaram coeficientes de determinação satisfatórios e bons resultados previstos quando comparados aos obtidos por ICP OES. Apesar das intensas interferências de sobreposição espectral e de efeito de matriz a qual esta técnica é passível, o uso de amostras da mesma matriz na calibração do equipamento tornou viável a determinação desses elementos, obtendo bons limites de detecção e quantificação, considerando a baixa sensibilidade dessa técnica analítica quando comparada a outras multielementares.

Quanto às análises qualitativas, muito estudadas por EDXRF, as ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) aplicadas sobre os espectros obtidos por esta técnica viabilizou fazer uma identificação da tendência de formação de agrupamentos a partir padrões de comportamento por similaridade dos diferentes filamentos de macroalgas marinhas, que permitem auxiliar na identificação das amostras.

A metodologia de análise por LIBS apresentou um potencial analítico por ter determinações rápidas, não necessitando de preparo de amostra, porém nota-se uma necessidade de estudos mais aprofundados de otimização de parâmetros para que a metodologia se aplique a maior número de analitos em diferentes níveis de concentração. Dentre alguns dos fatores que podem ser investigados tem-se potência do laser, tempo de atraso, número de ablações e tempo de integração.

Para LIBS, a aplicação de calibração multivariada empregando PLS em modelagem na predição de resultados propiciou boas previsões para Ca e Mg, quando comparados com resultados obtidos por ICP OES. A análise multivariada resultou, para esses elementos, aceitáveis curvas de calibração, baixos valores de erros associados aos modelos gerados e boas taxas de recuperação dos CRMs.

Dessa forma, foi possível determinar a concentração dos elementos com economia de tempo e reagentes em relação às análises tradicionais, com o mínimo de resíduos gerados lançados ao meio ambiente, embora às vezes com erros analíticos um pouco maiores. De um modo geral, observou-se que ambas as técnicas necessitam de um suporte quimiométrico para aperfeiçoar as análises e tratamento de dados, minimizando possíveis efeitos de interferências sobre as mesmas, obtendo maiores sensibilidades para possível determinação de elementos micro ou até traço.

Referências

- ABDALLAH, A. M. A.; ABDALLAH, M. A.; BELTAGY, A. I. Contents of heavy metals in marine seaweeds from the Egyptian coast of the Red Sea. **Chemistry and Ecology** 21, 399-411, 2005.
- ABE, Y. et al. Transition in the Use of Cobalt-Blue Colorant in the New Kingdom of Egypt. **Journal of Archaeological Science** 39, 6, 1793-1808, 2012.
- AGUIRRE, M. A. et al. Analysis of waste electrical and electronic equipment (WEEE) using laser induced breakdown spectroscopy (LIBS) and multivariate analysis. **Talanta** 117, 419-424, 2013.
- AKCALI, I; KUCUKSEZGIN, F. A biomonitoring study: Heavy metals in macroalgae from eastern Aegean coastal areas. **Marine Pollution Bulletin** 62, 637-645, 2011.
- ALEXANDRE T. L.; BUENO, M. I. M. S. Classification of some species, genera and families of plants by x-ray spectrometry. **X-ray spectrometry** 35, 4, 257- 260, 2006.
- AMARAL, M. M. **Desenvolvimento de espectroscopia de plasma induzido por laser para aplicações em análise de patrimônio cultural: estudo de moedas de um cruzeiro de 1945 e mil réis de 1939.** Dissertação de mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.
- APPLIED PHOTONICS. Disponível em www.appliedphotonics.co.uk. Acesso dia 25 de maio de 2015.
- ARAGÓN, C.; AGUILERA, J. A. Characterization of laser induced plasmas by optical emission spectroscopy: A review of experiments and methods. **Spectrochimica Acta Part B** 63, 893-916, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS E877:2008: Standard Practice for Sampling and Sample Preparation of Iron Ores and Related Materials for Determination of Chemical Composition. Rio de Janeiro, 2008.
- BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M. F.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para Calibração em Química Analítica - Parte I. Fundamentos e Calibração com um Componente (Calibração Univariada). **Química Nova** 25, 5, 856-865, 2002.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos.** 3 ed, Campinas: Editora da Unicamp, 2007.
- BEDDOWNS, D. C. S.; TELLE, H. H. Prospects of real-time single-particle biological aerosol analysis: A comparison between laser-induced breakdown spectroscopy and aerosol time-of-flight mass spectrometry. **Spectrochimica Acta B** 60, 1040-1059, 2005.

- BICUDO, C. E. M.; BICUDO, R.M.T. **Algas de águas continentais brasileiras**. São Paulo: Fundação brasileira para o desenvolvimento do ensino de ciências (FUNBEC), 1970.
- CARIDADE, E. O.; CORREIA, M. M. F. Taxonomia das macroalgas dos manguezais da baía de Turiçu, estado do Maranhão, Brasil. Universidade Federal do Maranhão. ISSN-1982-6421 (on-line). **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia** 20, 1, 53-60, 2007.
- BONIZZONI, L. et al. Comparison between XRF, TXRF, and PXRF analyses for provenance classification of archaeological bricks. **X-Ray Spectrometry** 42, 262-267, 2013.
- BORJA, A.; FRANCO, J.; PÉREZ, V. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. **Marine Pollution Bulletin** 40, 1100–1114, 2000.
- BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Validação de Modelos de Calibração Multivariada: uma Aplicação na Determinação de Pureza Polimórfica de Carbamazepina por Espectroscopia no Infravermelho Próximo. **Química Nova** 27, 6, 1004-1011, 2004.
- BRAI, M. et al. Double pulse laser induced breakdown spectroscopy applied to natural and artificial materials from cultural heritages: A comparison with micro-X-ray fluorescence analysis. **Spectrochimica Acta Part B** 64, 1119-1127, 2009.
- BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. Axially and radially viewed inductively coupled plasmas — a critical review. **Spectrochimica Acta Part B** 55, 1195-1240, 2000.
- BRISOLA, D. F.; FERNANDES, T. L. A. P. Otimização no preparo de amostras para análise em espectrofotômetro de fluorescência de raios X. **XVI Jornada Científica**, Cetem, 2008.
- BRITO, G. B. **Distribuição de elementos essenciais e contaminantes em fanerógama *Halodule wrightii* e macroalgas marinhas da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil**. 2011. 134 f. Dissertação (mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- BRITO, G. B. et al. Levels and spatial distribution of trace elements in macroalgae species from the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Marine Pollution Bulletin** 64, 10, 2238-2244, 2012.
- BRUNS, R. E; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. **Química Nova** 8, 2, 84-99, 1985.
- BULAJIC, D. et al. A procedure for correcting self-absorption in calibration free-laser induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B** 57, 339-353, 2002.
- BUSTAMANTE, A. et al. Analysis of Pre-Columbian objects from Cupisnique, one of the oldest culture from Perú, using a portable X-ray fluorescence equipment. **Applied Physics A** 113, 1065-1067, 2013.

- CALLISTO, M.; GONÇALVES JÚNIOR, J. F. Bioindicadores Bentônicos. In: Roland, F.; Cesar, D.; Marinho, M. (Eds). **Lições de Limnologia**. São Carlos: Rima, 2005, 371-379.
- CARVALHO, E. Nordeste terá 1ª indústria do Brasil de combustível feito com algas. *Globo Natureza*, SP, 2012. Disponível em <http://g1.globo.com/natureza/noticia/2012/07/nordeste-tera-1-industria-do-brasil-de-combustivel-feito-com-algas-marinhas.html>, acesso dia 12.05.2015
- CARVALHO, G. G. A. et al. Effects of laser focusing and fluence on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B** 74-75, 162-168, 2012.
- CARVALHO, G. G. A. et al. Influence of particle size distribution on the analysis of pellets of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B** 105, 130-135, 2015.
- CAVALLI, R. O.; FERREIRA, J. F. O futuro da pesca da aquicultura marinha no Brasil: a maricultura. **Ciência e Cultura** 62, 3, 38-39, 2010.
- CESAREO, R. et al. Multilayered samples reconstructed by measuring $K\alpha/K\beta$ or $L\alpha/L\beta$ X-ray intensity ratios by EDXRF. **Nuclear instruments and Methods in Physics Research B** 312, 15-22, 2013.
- CHAUDHURI, A. et al. Heavy Metal Biomonitoring by Seaweeds on the Delmarva Peninsula, East Coast of the USA. **Botanica Marina** 50, 151–158, 2007.
- CID, A. et al. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: effects on photosynthesis and related parameters. **Aquatic Toxicology** 31, 165-174, 1995.
- COLE, K. M.; SHEATH, R. G. **Biology of the red algae**. New York: Cambridge University Press, 1990.
- CONTI, M. E.; CECCHETTI, G. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal áreas. **Environmental Research** 93, 99–112, 2003.
- CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos **Química Nova** 30, 481-487, 2007.
- COSTA, A. C. A. et al. Tratamento de efluentes para a remoção de metais pesados utilizando uma resina biológica. **Metalurgia e materiais** 51, 446, 872-877, 1995.
- CREMERS, D. A.; RADZIEMSKI, L. J. **Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy**. England: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- CRIST, R. H., et al. Nature of bonding between metallic-ions and algal cell-walls. **Environmental Science and Technology** 15, 1212-1217, 1981.

- CRIST, R. H. et al. Interaction of Metals and Protons with Algae. 4. Ion Exchange vs Adsorption Models and a Reassessment of Scatchard Plots; Ion-Exchange Rates and Equilibria Compared with Calcium Alginate. **Environmental Science & Technology** 28, 1859-1866, 1994.
- DELUCIA JÚNIOR, F. C. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS): a promising versatile chemical sensor technology for hazardous material detection. **IEEE Sensors Journal** 5, 4, 681-689, 2005.
- DÍAZ PACE et al. Analysis of heavy metals in liquids using Laser Induced Breakdown Spectroscopy by liquid-to-solid matrix conversion. **Spectrochimica Acta B** 61, 929-933, 2006.
- DÖNMEZ, G. C. et al. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. **Process Biochemistry** 34, 885-892, 1999.
- EMARA, E. M. et al. Biological application of laser induced breakdown spectroscopy technique for determination of trace elements in hair. **Talanta** 117, 176-183, 2013.
- FELÍCIO, R. DE; OLIVEIRA, A. L. L. DE; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura** 64, 3, São Paulo, 39-42, 2012.
- FERREIRA, E. C. et al. Exploratory analysis of inorganic constitution contents in grape juices and soft drinks. **Eclética Química** 27, no. especial, 2002.
- FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova** 22, 5, 724-731, 1999.
- FOUREST, E.; VOLESKY, B. Contribution of sulfonate groups and alginate to heavy metal biosorption by the dry biomass of sargassum fluitans. **Environmental Science & Technology** 30, 277-282, 1996.
- GARCIMUÑO, M.; DÍAZ PACE, D. M.; BERTUCCELLI, G. Laser-induced breakdown spectroscopy for quantitative analysis of copper in algae. **Optics & Laser Technology** 47, 26-30, 2013.
- GODOI, Q. **Avaliação da espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por laser (LIBS) para a determinação de Ba, Cd, Cr e Pb em brinquedos**. Tese de doutorado em Química. Universidade de São Carlos (UFSCar), SP, 2011, 141f.
- GOMES, M. S. et al. A novel strategy for preparing calibration standards for the analysis of plant materials by laser-induced breakdown spectroscopy: A case study with pellets of sugar cane leaves. **Spectrochimica Acta Part B** 86, 137-141, 2013.
- GOODALE, N. et al. pXRF: a study of inter-instrument performance. **Journal of Archaeological Science** 39, 4, 875-883, 2012.

- GRIETEN, E.; CASADIO, F. X-ray fluorescence portable systems for the rapid assessment of photographic techniques in notable art collections: the Alfred Stieglitz Collection. **X-ray spectrometry** 39, 3, 221-229, 2010.
- GUPTA, G. P. et al. Quantitative elemental analysis of nickel alloys using calibration-based laser-induced breakdown spectroscopy. **Journal of Alloys and Compounds** 509, 3740–3745, 2011.
- GUPTA, V. K.; SHRIVASTAVA, A. K.; JAIN, N. Biosorption of chromium(VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. **Water Research** 35, 4079-4085, 2001.
- HAHN, D. W.; OMENETTO, N. Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS), Part II: Review of Instrumental and Methodological Approaches to Material Analysis and Applications to Different Fields. **Applied Spectroscopy** 64, 12, 335A-364A, 2010.
- HAYASHI, A. M. **Remoção de cromo hexavalente através de processo de bioissorção em algas marinhas**. Tese de doutorado, Departamento de engenharia Química, UNICAMP, Campinas, SP-Brasil, 2001.
- HOCQUET, F. et al. Elemental 2D imaging of paintings with a mobile EDXRF system. **Analytical & Bioanalytica Chemistry**. 399, 9, 3109-3116, 2011.
- HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.
- IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Analytical Compendium**. Disponível em <http://www.iupac.org/>. Acesso em 15 de maio de 2015.
- JOHNSON, R. K.; WIEDERHOLM, T.; ROSENBERG, D. M. **Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates**. In: *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates* (D. M. Rosenberg & V. H. Resh, ed.), New York: Chapman & Hall, 40-158, 1993.
- KAISER, J. et al. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** 64, 67-73, 2009.
- KAISER J. et al. Trace elemental analysis by laser-induced breakdown spectroscopy—Biological applications. **Surface science Reports** 67, 233-243, 2012.
- KAJIYA, E. A. M. et al. Evaluation of the veracity of one work by the artist Di Cavalcanti through non-destructive techniques: XRF, imaging and brush stroke analysis. **Radiation Physics and Chemistry** 95, 373-377, 2014.
- KHATER, M. A. Laser-induced breakdown spectroscopy for light elements detection in steel: State of the art. **Spectrochimica Acta Part B** 81, 1-10, 2013.

- KINGSTON, P. F. et al. The impact of the Braer oil spill on the macrobenthic infauna of the sediments off the Shetland Islands. **Marine Pollution Bulletin** 30, 445-459, 1995.
- KOTZAGIANNI, M.; COURIS, S. Femtosecond laser induced breakdown spectroscopy of air–methane mixtures. **Chemical Physics Letters** 561-562, 36-41, 2013.
- LAPOINTE, B. E. The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera* V. *angustissima* (gigartinales rhodophyta) **Journal of Phycology**. 17, 90-95, 1981.
- LAVRADO, H. P.; IGNACIO, B. L. **Biodiversidade bentônica da região central da Zona Econômica Exclusiva brasileira**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2006.
- LIU, S. et al. Application of a portable XRF spectrometer for classification of potash glass beads unearthed from tombs of Han Dynasty in Guangxi, China. **X-Ray Spectrometry** 42, 470-479, 2013.
- LYRA, W. S. et al. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova** 33, 7, 1594-1597, 2010.
- MACHADO, A. L. S.; FERREIRA, A.G.; ZALMON, I. R. Metais Pesados em Macroalgas Marinhas na Costa Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Tropical Oceanography** 31, 1, 71–80, 2003.
- MACHADO, A. R. T.; SILVA, A. C. Regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) e espectroscopia no UV/Vis para quantificação de corantes: agilidade e eficiência para estações de tratamento de efluentes têxteis. **Revista eletrônica Produção & Engenharia** 4, 2, 427-432, 2013.
- MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z. A. Amostragem de Suspensões: Emprego da Técnica na Análise Direta de Amostras. **Química Nova** 21, 4, 459-466, 1998.
- MANUAL BRUKER AXS. Disponível em www.bruker.com, acesso em 18 de maio de 2015.
- MARRETO, P. D. **Determinação simultânea de íons metálicos utilizando voltametria de redissolução anódica e métodos de calibração multivariada**. 2010. 147f. Tese (Doutorado em Ciências, concentração Química Analítica) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2012.
- MOHAMED, W. T. Y. Improved LIBS limit of detection of Be, Mg, Si, Mn, Fe and Cu in aluminum alloy samples using a portable Echelle spectrometer with ICCD camera. **Optics & Laser Technology** 40, 30–38, 2008.
- MOITA NETO, J. M; MOITA, G. C. Uma Introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados. **Química Nova** 21, 4, 467-469, 1998.

MUKHONO P. M. et al. Laser induced breakdown spectroscopy and characterization of environmental matrices utilizing multivariate chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B** 87, 81-85, 2013.

NAES, B. E. et al. A comparison of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, micro X-ray fluorescence spectroscopy, and laser induced breakdown spectroscopy for the discrimination of automotive glass. **Spectrochimica Acta Part B** 63, 1145-1150, 2008.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos Matemáticos para Correção de Interferências Espectrais e Efeitos Interelementos na Análise Quantitativa por Fluorescência de Raios-X. **Química Nova** 24, 4, 531-539, 2001.

NALDI, M.; WHEELER, P. A. Changes in nitrogen pools in *Ulva fenestrata* (Chlorophyta) and *Gracilaria pacifica* (Rhodophyta) under nitrate and ammonium enrichment. **Journal of Phycology**. 35, 70-77, 1999.

NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF)**. Depto de Ciências Exatas/ESALQ Lab. de Instrumentação Nuclear/CENA julho/1999.

NEIVA, A. C. et al. Analysis of photographs and photo-paintings by energy-dispersive X-ray fluorescence spectroscopy. **Radiation Physics and Chemistry** 95, 378-380, 2014.

NIE, L. H. et al. In Vivo Quantification of Lead in Bone with a Portable X-ray Fluorescence (XRF) System – Methodology and Feasibility. **Physics in Medicine and Biology** 56, 3, n39-n51, 2011.

NOLL, R. et al. Laser-induced breakdown spectrometry — applications for production control and quality assurance in the steel industry **Spectrochimica Acta Part B** 56, 637-649, 2001.

NOMURA, C. S; SILVA, C. S.; OLIVEIRA, P. V. Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: uma revisão. **Química Nova** 31, 1, 104-113, 2008.

OLIVEIRA, M. M. F.; KLEINÜBING, S. J.; SILVA, M. G. C. **Bioadsorção de cádmio em banho finito utilizando alga marinha *Sargassum sp.*** VI CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, Campinas, 2005.

ORTIZ, J. et al. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea Antarctica*. **Food Chemistry** 99, 1, 98-104, 2006.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. (eds). **Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer**, Brasília, 276 p., 2008.

PAGÈS-CAMAGNA, S. et al. Non-destructive and in situ analysis of Egyptian wall paintings by X-ray diffraction and X-ray fluorescence portable systems. **Applied Physics A** 100, 3, 671-681, 2010.

PASQUINI, C. et al. Laser Induced Breakdown Spectroscopy. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 18, 3, 463-512, 2007.

PAUL, J. F. et al. Developing and applying a benthic index of estuarine condition for the Virginian Biogeographic Province. **Ecological Indicators** 1, 83–99, 2001.

PEREIRA, F. M. V. et al. Evaluation of the effects of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on inoculated citrus plants using laser-induced breakdown spectroscopy (LIBS) and chemometrics tools. **Talanta** 83, 351-356, 2010.

PÉREZ, A. A. et al. Levels of essential and toxic elements in *Porphyra columbina* and *Ulva* sp. from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina **Science of the Total Environment** 376, 51–59, 2007.

PIMENTEL, M. F.; GALVÃO, R. K. H.; ARAÚJO, M. C. U. Recomendações para calibração em Química Analítica. Parte 2. Calibração Multianalito. **Química Nova** 31, 2, 462-467, 2008.

PLAZA, J. et al. Biosorption of mercury by *Macrocystis pyrifera* and *Undaria pinnatifida*: Influence of zinc, cadmium and nickel. **Journal of Environmental Sciences** 23, 11, 1778–1786, 2011.

POMIN, V. H.; MOURÃO, P. A. S. Bioquímica dos carboidratos: de adoçantes a Medicamentos. **Ciência Hoje** 39, 233, 24-31, 2006.

PORÍZKA, P. et al. Application of laser-induced breakdown spectroscopy to the analysis of algal biomass for industrial biotechnology. **Spectrochimica Acta Part B** 74-75, 169-176, 2012.

PRIEGO-CAPOTE, F.; CASTRO M.D. L. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. **Trends in Analytical Chemistry** 23, 644-653, 2004.

RADZIEMSKI, L. J.; CREMERS, D. A. A brief history of laser-induced breakdown spectroscopy: From the concept of atoms to LIBS 2012. **Spectrochimica Acta Part B** 87, 3–10, 2013.

RANASINGHE, J. A. et al. Application of two indices of benthic community condition in Chesapeake Bay. **Environmetrics** 13, 499–511, 2002.

RAO, P. V. S.; MANTRI, V. A.; GANESAN, K. Mineral composition of edible seaweed *Porphyra vietnamensis*. **Food Chemistry** 102, 215-218, 2007.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 344 -369.

- RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 40, 4, out./dez., 495-503, 2004.
- RIVIERS, B. de. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- ROCHA, F. D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 17, 4, 631-639, Out/Dez, 2007.
- ROLDÁN, C. et al. Application of field portable EDXRF spectrometry to analysis of pigments of Levantine rock art. **X-ray spectrometry** 39, 243-250, 2010.
- SAMEK, O; TELLE, H. H.; BEDDOWNS, B. C. S. Laser-induced breakdown spectroscopy: a tool for real-time, in vitro and in vivo identification of carious teeth **BMC Oral Health** 1, 1, 2001.
- SANDAU, E. et al. Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products **Acta Biotechnologica** 16, 103-119, 1996.
- SANTOS, E. S. et al. Espectrometria de fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, 9, 17, 3413-3432, 2013.
- SANTOS JÚNIOR, D. et al. Espectrometria de emissão ótica com plasma induzido por laser (LIBS): fundamentos, aplicações e perspectivas. **Revista Analytica** ago/set, 24, 72-81, 2006.
- SANTOS JÚNIOR, D. et al. Laser-induced breakdown spectroscopy for analysis of plant materials: A review. **Spectrochimica Acta Part B** 71-72, 3-13, 2012.
- SARAIVA, R. A; TAVARES, C. R. G. Utilização de macroalgas como bioadsorventes no tratamento de efluentes de curtumes. In: **Anais Encontro brasileiro sobre adsorção**, I, Fortaleza, 1997, 232-238.
- SAWIDIS, T. et al. Trace metal concentrations in marine macroalgae from different biotopes in the Aegean Sea. **Environment International** 27, 43-47, 2001.
- SCHIMIDT, F.; BUENO, M. I. M. S.; POPPI, R. J. Aplicação de alguns Modelos Quimiométricos à Espectroscopia de Fluorescência de raios-X de Energia Dispersiva. **Química Nova** 25, 6, 949-956, 2002.
- SENA, M. M. et al. Avaliação do Uso de Métodos Quimiométricos em Análise de Solos. **Química Nova** 23, 4, 547-556 2000.
- SHEPPARD, P. J. et al. Characterization of New Zealand obsidian using PXRF. **Journal of Archaeological Science** 38, 1, 45-56, 2011.
- SIL, J. L. R et al. SANDRA: a portable XRF system for the study of Mexican cultural heritage. **X-ray spectrometry** 39, 5, 338-345, 2010.

SKOOG, Douglas A., et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2006, 999p.

SMITH, R. W. et al. Benthic Response Index for Assessing Infaunal Communities on the Southern California Mainland Shelf. **Ecological Applications** 11, 1073–1087, 2001.

SOUSA, M. B. et al. α -, β -caroteno e α -tocoferol em algas marinhas in natura **Ciência e Tecnologia de Alimentos** Campinas, 28, 4, 953-958, 2008.

SOUZA, A. M. et al. Experimento didático de quimiometria para calibração multivariada na determinação de paracetamol em comprimidos comerciais utilizando espectroscopia no infravermelho próximo: um tutorial, parte II. **Química Nova** 36, 7, 1057-1065, 2013.

STANGEL, D. B; CONNAN, S; POPPER, Z. A. Algal chemodiversity and bioactivity: Sources of natural variability and implications for commercial application. **Biotechnology Advances** 29, 483-501, 2011.

SUÁREZ-MAHECHA, H. et al. Importância de ácidos graxos poli-insaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca** São Paulo, 28, 1, 101-110, 2002.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Revista Virtual de Química** 5, 3, 343-362, 2013.

TOGONI, E. et al. Quantitative micro-analysis by laser-induced breakdown spectroscopy: a review of the experimental approaches. **Spectrochimica Acta Part B** 57, 1115-1130, 2002.

TREVIZAN, L. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of macronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B** 63, 1151-1158, 2008.

TREVIZAN, L. C. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectroscopy for the determination of micronutrients in plant materials. **Spectrochimica Acta Part B** 64, 369-377, 2009.

TUZEN, M. et al. Trace element content in marine algae species from the Black Sea, Turkey. **Environmental Monitoring Assessment** 151, 363–368, 2009.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova** 32, 5, 1278-1287, 2009.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da Economia nos Ambientes Aquáticos à Bioremediação e à Química Analítica. **Química Nova** 27, 1, 139-145, 2004.

VILLARES, R.; CARBALLEIRA, A. Nutrient Limitation in Macroalgae (Ulva and Enteromorpha) from the Rías Baixas (NW Spain). **Marine Ecology** 25, 225-243, 2004.

VOLESKY, B; PRASETYO, I. Cadmium removal in a biosorption column. **Biotechnology and Bioengineering** 43, 11, 1010-1015, 1994.

WANG, J.; CHEN, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. **Biotechnology Advance** 27, 195-226, 2009.

WASTOWAKI, A. D. et al. Caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, submetido a diferentes sistemas de uso e manejo, utilizando espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF). **Química Nova** 33, 7, 1449-1452, 2010.

WEISBERG, S. B. et al. An estuarine benthic index of biotic integrity (B-IBI) for Chesapeake Bay. **Estuaries** 20, 149–158, 1997.

WOLD, S; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems** 58, 109–130, 2001.

YESILLER, S. U.; YALCIN, S. Optimization of chemical and instrumental parameters in hydride generation laser-induced breakdown spectrometry for the determination of arsenic, antimony, lead and germanium in aqueous samples. **Analytica Chimica Acta** 770, 7-17, 2013.

YOKOYAMA, M. Y.; GUIMARÃES, O. Determinação dos teores de Na, K, P e proteínas em algumas algas marinhas. **Acta Biológica Paranaense** 4, 1/2, 19-24, 1975.