

## **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO TOTAL DE HALOGÊNIOS E ENXOFRE EM ALGAS NATIVAS DO AMBIENTE ANTÁRTICO**

**FILIPE S. RONDAN<sup>1</sup>; MARINA S. XAVIER<sup>2</sup>; CATARINA F. S. MORAES<sup>3</sup>;  
PRISCILA T. SCAGLIONI<sup>4</sup>; LARISSA C. A. COSTA<sup>5</sup>; MÁRCIA F. MESKO<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>*Universidade Federal de Pelotas – fsrondan@gmail.com*

<sup>2</sup>*Universidade Federal de Pelotas – marinaseyffert@outlook.com*

<sup>3</sup>*Universidade Federal de Pelotas – cj.ta@hotmail.com*

<sup>4</sup>*Universidade Federal do Rio Grande – priscilascaglioni@gmail.com*

<sup>5</sup>*Universidade Federal de Pelotas – cristine.andrade@gmail.com*

<sup>6</sup>*Universidade Federal de Pelotas – marciamesko@yahoo.com.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas, diversas mudanças climáticas têm sido observadas no continente Antártico, como o aumento da temperatura atmosférica e variações nas precipitações de neve (BRACEGIRDLE, 2012). Essas mudanças resultam no derretimento de geleiras e solos congelados e são refletidas para o resto do mundo, uma vez que a Antártica é o principal regulador térmico do planeta, principalmente no que diz respeito ao Hemisfério Sul (ABBATT et al., 2012). Apesar de atividades antropogênicas serem apontadas como as principais causas de tais variações, fontes naturais, como as algas, podem contribuir para as mudanças observadas. As macroalgas liberam para a atmosfera diversos compostos, como os halogenados e sulfurados que podem reagir com o ozônio, causando a depleção da camada de ozônio (SINGH; BHARGAWA, 2019). Tendo em vista que a destruição da camada de ozônio é principalmente observada nos polos, como a Antártica, maiores incidências da radiação ultravioleta são observadas nessas regiões, culminando em um ciclo de problemas ambientais (SINGH; BHARGAWA, 2019).

Os halogênios e o enxofre são elementos presentes nas algas marinhas, pois esses organismos absorvem nutrientes do ambiente onde se desenvolvem, e a água do mar apresenta elevadas concentrações desses elementos. Os halogênios, por exemplo, apresentam diversas funções no metabolismo das macroalgas, principalmente atuando em mecanismos de defesa (KUPPER et al., 2013). Por sua vez, o enxofre está presente em diferentes compostos nas macroalgas, como peptídeos, aminoácidos, proteínas, entre outras formas (BARAHONA et al., 2021).

Apesar da relevância desses elementos com relação a questões de importância global, como as mudanças climáticas, a maioria dos estudos reportados na literatura são voltados para a determinação de metais em algas (MESKO et al., 2015; PICOLOTO et al., 2017), enquanto os trabalhos realizados com algas da Antártica, visando a posterior determinação de não metais, são restritos à determinação de espécies halogenadas voláteis (LATURNUS, 2001). Nesse sentido, ressalta-se a importância do desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis que possibilitem a determinação de halogênios e enxofre em macroalgas da Antártica.

Geralmente, técnicas de determinação cromatográficas e espectrométricas são as mais utilizadas para a determinação desses analitos, como a cromatografia iônica e a espectrometria de massas, bem como a combinação dessas técnicas (MELLO et al., 2013). Contudo, para a análise por essas técnicas, é necessário que as amostras estejam na forma de uma solução contendo os analitos em uma forma química adequada para a determinação. Nesse sentido, a realização de uma etapa de preparo de amostra previamente às análises é imprescindível, a fim de converter

uma amostra sólida em uma solução adequada para posterior análise. Considerando que as algas da Antártica apresentam composição majoritariamente orgânica, a combustão iniciada por micro-ondas (MIC) apresenta-se como uma técnica adequada para o preparo dessas amostras (FLORES, 2014), uma vez que tem como principal vantagem o uso de oxigênio como agente oxidante da matéria orgânica, possibilitando o uso de soluções adequadas à absorção dos analitos e compatíveis com diversas técnicas de determinação (FLORES, 2014). Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um método analítico utilizando a MIC para o preparo das amostras e posterior análise por cromatografia de íons acoplada à espectrometria de massa (IC-MS) visando à determinação de halogênios e enxofre em algas da Antártica.

## 2. METODOLOGIA

As amostras utilizadas neste trabalho foram coletadas em diferentes regiões das ilhas Shetland do Sul, localizadas na Antártica, entre os meses de novembro e dezembro de 2018. Para tanto, foram utilizadas 10 espécies de macroalgas, sendo cinco pardas e cinco vermelhas. Adicionalmente, foi analisado um material de referência certificado (CRM) de planta aquática, que continha valores certificados para Br, Cl, F, e S, a fim de avaliar a exatidão do método. Tendo em vista a ausência de I no CRM, previamente ao preparo do CRM foram adicionados 50 µL de uma solução padrão contendo concentrações conhecidas de iodo.

Os parâmetros otimizados para o desenvolvimento do método foram a etapa de lavagem e secagem durante o pré-tratamento das amostras, e massa de amostra e solução absorvedora mais adequada aos analitos e à técnica de determinação. Para o pré-tratamento e secagem foram avaliadas diferentes proporções de água durante a lavagem (3, 5, e 10 mL para cada 1 g de amostra) e diferentes processos de secagem (lioofilização e estufa utilizando 50 e 100 °C). Com relação à massa de amostra, foram avaliadas massas de 100 a 1100 mg para a decomposição por MIC. Água ultrapura, concentrações variadas de hidróxido de amônio (50, 100, e 150 mmol L<sup>-1</sup>) e carbonato de amônio 150 mmol L<sup>-1</sup> foram estudadas como solução absorvedora.

Para o preparo das amostras, bem como do CRM, estas foram pesadas sobre filmes de polietileno, fechados por aquecimento para a obtenção de invólucros. Os invólucros foram dispostos na base de suportes de quartzo contendo um disco de papel filtro umedecido com 50 µL da solução ignitora (nitrato de amônio 6 mol L<sup>-1</sup>). Os suportes com as amostras foram inseridos em frascos de quartzo contendo 6 mL de solução absorvedora, os quais foram fechados, fixados ao rotor e pressurizados com 20 bar de O<sub>2</sub>. As amostras foram então submetidas ao programa de irradiação com micro-ondas de 5 min à 1400 W e 20 min de resfriamento. Posteriormente, os digeridos obtidos foram avolumados a 15 mL e analisados por IC-MS.

Os ensaios realizados para verificar a massa máxima de alga que poderia ser digerida por MIC ocorreram pela queima de incrementos de 100 mg de amostra a cada avaliação. Durante esta avaliação foram também monitoradas as pressões internas do sistema durante o processo de decomposição, bem como os tempos de ignição e de combustão.

Os ensaios de recuperação foram realizados a partir da adição de concentrações conhecidas dos analitos (Br, Cl, F, I, e S) às amostras previamente à decomposição por MIC, utilizando as diferentes soluções absorvedoras. As soluções padrão adicionadas representavam cerca de 50% da concentração dos analitos na

amostra, determinadas previamente utilizando as diferentes soluções absorvedoras.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, diferentes proporções de água ultrapura foram avaliadas para a lavagem das amostras, e foi observado que usando a proporção 3 mL : 1 g, as concentrações de cloro presentes superficialmente nas amostras não foram totalmente removidas. Provavelmente esse resultado esteja atrelado ao fato de a proporção de água ultrapura utilizada não ser suficiente para solubilizar e remover totalmente o cloreto de sódio adsorvido na superfície das amostras. Entretanto, quando utilizados 5 ou 10 mL, os resultados não apresentaram diferença estatística (Teste *t-Student*, nível de confiança de 95%) para todos os analitos avaliados. Dessa forma, 5 mL foram considerados como adequados para a lavagem das amostras. Posteriormente, diferentes processos de secagem foram estudados (liofilização e secagem com estufa utilizando 50 e 100 °C) e foi possível observar que todos os métodos foram igualmente eficientes. Assim, a secagem em estufa, utilizando 100 °C, foi selecionada, uma vez que utilizando essa condição a secagem ocorreu em menor tempo (total de 16 h) quando comparada aos demais métodos (24 h para a secagem a 50 °C e 24 h para a liofilização, considerando o tempo de congelamento prévio à etapa de liofilização).

Subsequentemente, a massa de 500 mg de amostra foi selecionada como adequada, uma vez que foi possível a detecção e quantificação de todos os analitos, com exceção de flúor, que não foi quantificado mesmo utilizando maiores massas de amostra. Adicionalmente, o tempo de ignição da combustão das amostras foi similar utilizando as massas de 500 e 1000 mg, enquanto a duração da combustão foi proporcional ao aumento de massa, sendo de  $23 \pm 3$  s para 500 mg e  $39 \pm 4$  s para 1000 mg. Além disso, as pressões atingidas nos frascos de decomposição foram proporcionais aos incrementos de massa, contudo, foram sempre inferiores à 50% da pressão máxima de operação do sistema (80 bar - recomendada pelo fabricante do equipamento), sendo considerada segura.

Posteriormente, a solução absorvedora foi avaliada de acordo com os ensaios de recuperação. Foi observado que utilizando água ultrapura ou soluções diluídas de NH<sub>4</sub>OH (50 e 100 mmol L<sup>-1</sup>), baixas recuperações para Br, Cl, e I foram obtidas (de 32 a 71%), enquanto que utilizando soluções mais concentradas [150 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH ou (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] foram observadas recuperações quantitativas (de 96 a 105%) para todos os analitos. Dessa forma, a solução de NH<sub>4</sub>OH 150 mmol L<sup>-1</sup> foi selecionada, uma vez que essa solução apresentou menores desvios padrão relativos e foi adequada para a absorção de todos os analitos avaliados.

A avaliação da exatidão do método foi realizada pela decomposição e posterior análise do CRM, sendo obtidas concordâncias variando de 97 a 104% para todos analitos, confirmando a adequabilidade do método proposto para a determinação de todos os halogênios e enxofre. Após a otimização de todos os parâmetros relacionados às etapas de pré-tratamento e preparo das amostras, o método desenvolvido foi aplicado a dez espécies de macroalgas da Antártica. Com base nos resultados obtidos, foi possível observar amplas variações nas concentrações para todos os analitos, de 13 a 614 mg kg<sup>-1</sup> para Br, de 630 a 11.353 mg kg<sup>-1</sup> para Cl, de 44 a 455 mg kg<sup>-1</sup> para I, e de 4.586 a 56.350 mg kg<sup>-1</sup> para S. Todavia, as concentrações de flúor em todas as amostras avaliadas foram sempre inferiores ao limite de quantificação (LOQ) do método (2 mg kg<sup>-1</sup>). Além disso, os LOQs obtidos para Br, Cl, F, I, e S foram, respectivamente, 0,1; 12; 2; 0,1; e 4 mg kg<sup>-1</sup>.

## 4. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, pode-se observar que o método proposto se mostrou adequado para o preparo de macroalgas da Antártica por MIC e posterior determinação das concentrações totais de halogênios e enxofre por IC-MS. O método desenvolvido apresentou diversas vantagens, dentre elas a obtenção de adequados limites de quantificação para todos os analitos e a possibilidade de determiná-los em única análise. Assim, o presente trabalho apresenta dados extremamente relevantes e inéditos na literatura acerca da composição das macroalgas da Antártica quanto a presença de halogênios e enxofre, abrindo caminho para o desenvolvimento de novos trabalhos visando estudos de especiação e descobertas de novas moléculas nesses organismos tão importantes para o monitoramento ambiental do planeta.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBATT, J. P. D. et al. Halogen activation via interactions with environmental ice and snow in the polar lower troposphere and other regions. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v.12, p.6237-6271, 2012.
- BARAHONA, T. et al. Characterization of polysaccharides from cystocarpic and tetrasporic stages of Sub-Antarctic *Iridaea cordata*. **Algal Research**, v.60, p.102503, 2021.
- BRACEGIRDLE, T. J. Detection and attribution of Antarctic climate change. **Anales del Instituto de la Patagonia**, v.40, p.51-56, 2012.
- FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. Amsterdam: Elsevier, 2014.
- KUPPER, F. C. et al. In vivo speciation studies and antioxidant properties of bromine in *Laminaria digitata* reinforce the significance of iodine accumulation for kelps. **Journal of Experimental Botany**, v.64, p.2653-2664, 2013.
- LATURNUS, F. Marine macroalgae in polar regions as natural sources for volatile organohalogens. **Environmental Science and Pollution Research**, v.8, p.103-108, 2001.
- MELLO, P. A. et al. Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.405, p.7615-7642, 2013.
- MESKO, M. F. et al. Ultraviolet radiation combined with microwave-assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v.30, p.260-266, 2015.
- PICOLOTO, R. S.; PEREIRA, R. M.; COSTA, V. C.; HARTWIG, C. A. et al. Investigating essential and toxic elements in Antarctic macroalgae using a green analytical method. **Journal of Applied Phycology**, v.29, p.741-749, 2017.
- SINGH, A. K.; BHARGAWA, A. Atmospheric burden of ozone depleting substances (ODSs) and forecasting ozone layer recovery. **Atmospheric Pollution Research**, v. 10, p.802-807, 2019.