



FURG

Dissertação de Mestrado

**Avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostra –
estudos com micro-ondas, radiação UV e mineralização por via
úmida na determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu em
macroalga por voltametria**

Leandro Silva de Almeida

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2016

I

**Avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostra –
estudos com micro-ondas, radiação UV e mineralização por via úmida
na determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu em macroalga por
voltametria**

por

Leandro Silva de Almeida

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

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2016

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

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Avaliação de diferentes procedimentos de preparo de amostra –
estudos com micro-ondas, radiação UV e mineralização por via úmida
na determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu em macroalga por
voltametria**

elaborada por

LEANDRO SILVA DE ALMEIDA

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento (UFSM- RS)

Prof(a). Dr(a). Adriane Medeiros Nunes (UFPeI- RS)

Prof(a). Dr(a). Daiane Dias (FURG - RS)

Rio Grande, 08 de abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu amigo incondicional, Deus, por me conceder a cada dia virtudes que renova em mim um coração sincero. Também pela família que me deu e pelos amigos que coloca em meu caminho.

À Patrícia, minha esposa, pela importância que tem em minha vida, dividindo comigo tanto os momentos de alegria, quanto os de angústia. À minha filha Sara e meu filho Misael por me inspirarem a não deixar de lutar.

À Prof^a. Dr^a. Daiane Dias pela oportunidade, dedicação que foi notória dispendo-se sempre como mediadora do conhecimento, sem medir esforços no acompanhamento e principalmente pela amizade.

Ao Prof. Dr. Rodolfo Carapelli, que junto com a Prof^a. Dr^a. Daiane Dias, não medem esforços para manter e administrar o Laboratório de Eletro Espectro Analítica.

Ao Prof. Dr. Carlos F. F. Andrade pelo acolhimento no laboratório de Hidroquímica e disponibilidade de equipamentos para a realização dos experimentos deste trabalho, além da disposição e acompanhamento em muitas atividades e contribuições dadas no exame de qualificação.

À Prof^a. Dr^a. Jaqueline G. Buffon pelas contribuições, sugestões e disponibilidade de equipamentos, como o bloco digestor.

Ao Prof. Dr. Claudio M. P. Pereira pelas contribuições e pela disponibilidade da biomassa de macroalga, assim como ao Prof. Dr. Pio Colepicolo.

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento pela disponibilidade do uso do equipamento de radiação UV e por aceitar participar da comissão examinadora.

Ao Prof. Dr. Márcio Raimundo Milani pela participação e contribuições no exame de qualificação.

Ao técnico Daniel Costa por não ter medido esforços em colaborar com os experimentos realizados nos laboratórios da Hidroquímica.

A técnica Maristela pelas colaborações no uso do bloco digestor do Laboratório de Micotoxinas.

A técnica Elisa R. Seus pelas valiosas contribuições com as análises de concentração de carbono em equipamento do Laboratório Instituto de Oceanografia.

A toda a equipe do Laboratório de Eletro Espectro Analítica. Em especial, aos colegas Juliana Villela Maciel, Nivia Maria Streit, Juliana Guilherme Rocha, João Batista dos Santos

Espinelli Júnior, Diana Gisela Velásquez Tinoco, Carolina Ceglinski, Lainide Oliveira, agradeço pela amizade e pelas palavras de estímulo nos momentos difíceis. A ajuda de vocês foi imprescindível para o êxito do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
□ 3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 Macroalgas	16
3.2 Metais	17
3.2.1 Cádmio	18
3.2.2 Cobre	19
3.2.3 Zinco	19
3.2.4 Chumbo	20
3.3 Preparo de amostras	20
3.3.1 Micro-ondas	21
3.3.2 Bloco digestor	24
3.3.3 Radiação UV	25
3.4 Técnicas de quantificação	26
3.4.1 Técnicas espectrométricas	26
3.4.2 Voltametria	28
4. MATERIAS E MÉTODOS	31
4.1. Instrumentação	31
4.2 Reagentes e soluções	32

4.3 Métodos de preparo de amostra	32
4.3.1 Micro-ondas	33
4.3.2 Bloco Digestor.....	33
4.3.3 Digestor UV	33
4.4 Procedimentos Analíticos	34
4.4.1 Determinação por GF AAS	34
4.4.2 Parâmetros avaliados na determinação voltamétrica	36
4.4.3 Determinação por Voltametria	37
4.5 Avaliação do efeito matriz	37
4.6 Determinações de carbono total e inorgânico.....	37
4.7 Validação do método voltamétrico	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1 Otimização dos métodos voltamétricos	39
5.1.1 Método de pulso diferencial	39
5.1.1.1 Avaliação do efeito do pH.....	39
5.1.1.2 Avaliação do efeito do potencial de deposição	41
5.1.1.3 Avaliação do efeito da velocidade de varredura.....	42
5.1.2 Método voltamétrico de onda quadrada	43
5.1.2.1 Avaliação do efeito da frequência	43
5.1.2.2 Avaliação do efeito da amplitude	45
5.1.3 Comparação entre pulso diferencial e onda quadrada.....	46
5.1.4 Avaliação do volume de eletrólito na determinação voltamétrica	49
5.3 Parâmetros de validação	54
5.4. Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu na amostra	58
6. CONCLUSÕES	62
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	63
8. BIBLIOGRAFIA	64

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Variação dos potenciais de oxidação em função do pH (0,2 mg L⁻¹ de Zn e Cu e 0,4 mg L⁻¹ de Cd e Pb). Condições experimentais: $t_{dep.} = 30$ s, $v = 20$ mV s⁻¹ 40
- FIGURA 2- Variação dos valores de correntes em função do pH (0,2 mg L⁻¹ de Zn e Cu e 0,4 mg L⁻¹ de Cd e Pb). Condições experimentais: $E_{inicial} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, $t_{dep.} = 30$ s, $v = 20$ mV s⁻¹41
- FIGURA 3- Valores de intensidade das correntes em função do potencial de deposição aplicado (0,12 mg L⁻¹ de Zn e Cu e 0,24 mg L⁻¹ de Cd e Pb em eletrólito pH 4). Condições experimentais: $t_{dep.} = 30$ s, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, $v = 20$ mV s⁻¹42
- FIGURA 4- Variação da corrente em função da velocidade de varredura (0,12 mg L⁻¹ de Zn e Cu e 0,24 mg L⁻¹ de Cd e Pb em eletrólito pH 4). Condições experimentais: $t_{dep.} = 30$ s, $E_{dep} = -1,2$ V, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, $v = 2$ a 40 mV s⁻¹.43
- FIGURA 5- Variação da intensidade de corrente frente à variação da frequência (1,2 mg L⁻¹ de Zn e Cu e 2,4 mg L⁻¹ de Cd e Pb em eletrólito pH 4). Condições experimentais: $E_{dep} = -1,2$ V, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, $t_{dep.} = 30$ s.44
- FIGURA 6- Variação da intensidade das correntes para os quatro elementos (0,12 mg L⁻¹ de Zn e Cu e 0,24 mg L⁻¹ de Cd e Pb em eletrólito pH 4) com diferentes valores de amplitude e frequência de 30 Hz (A) e 20 Hz (B). Condições experimentais: $E_{dep} = -1,2$ V, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, $t_{dep.} = 30$ s.45
- FIGURA 7- Voltamogramas obtidos com o método (A) DPV e (B) SWV. Condições experimentais: $E_{dep} = -1,2$ V, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, $t_{dep.} = 30$ s. Curvas = Zn e Cu: a- eletrólito (CH₃COOH 0,3 mol L⁻¹/ NH₄OH 0,09 mol L⁻¹), b-f de 20 a 100 µg L⁻¹, Cd e Pb: a- eletrólito (CH₃COOH 0,3 mol L⁻¹/ NH₄OH 0,09 mol L⁻¹), b-f de 40 a 200 µg L⁻¹47
- FIGURA 8 - Gráficos das curvas de regressão linear obtidas por DPV e SWV. Curvas (intensidade de corrente em µA versus concentração em µg L⁻¹) = Zn e Cu: de 20 a 100 µg L⁻¹, Cd e Pb: de 40 a 200 µg L⁻¹48
- FIGURA 9- Voltamogramas obtidos por SWV após os métodos de mineralização A e B. Condições experimentais: pH = 4, $E_{dep} = -1,2$ V, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, amplitude = 0,04 V, frequência = 30 Hz, $t_{dep.} = 420$ s. Curvas = Zn: a-amostra, b-d de 8 a 24 µg L⁻¹, Cd e Pb: a-amostra, b-d de 1 a 3 µg L⁻¹, Cu: a-amostra, b-d de 10 a 30 µg L⁻¹60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Programa de temperatura do forno de grafite para a análise do Zn.....	35
TABELA 2- Programa de temperatura do forno de grafite para a análise do Cd.	35
TABELA 3- Programa de temperatura do forno de grafite para a análise do Pb.....	36
TABELA 4 - Programa de temperatura do forno de grafite para a análise do Cu.....	36
TABELA 5 - Parâmetros utilizados para pulso diferencial e onda quadrada.	47
TABELA 6 - Coeficientes angulares obtidos a partir de curvas analíticas para diferentes volumes de eletrólito utilizados.	49
TABELA 7- Valores de efeito da matriz para Zn, Cd, Pb e Cu na macroalga e SRM após as mineralizações via bloco, radiação UV e micro-ondas.	51
TABELA 8- Valores de concentração (g L^{-1}) de carbono total, inorgânico e orgânico na macroalga e SRM após a as mineralizações por micro-ondas (métodos A e B), bloco (método C) e radiação UV (método D).	53
TABELA 9 - Valores determinados para limite de detecção, limite de quantificação e faixas lineares para Zn, Cd, Pb e Cu por SWV.	54
TABELA 10 - Recuperações obtidas por SWV para amostra certificada (Peach Leaves – NIST 1547) após mineralização pelos métodos A, B, C e D.	55
TABELA 11 - Recuperações obtidas por GF AAS para amostra certificada (Peach Leaves – NIST 1547) após mineralização pelos métodos A e B.....	57
TABELA 12 - Valores de concentrações médias de Zn, Cd, Pb e Cu (mg kg^{-1}) quantificadas por SWV e GF AAS na macroalga.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>)
ASV	Voltametria de Redissolução Anódica (do inglês <i>Anodic Stripping Voltammetry</i>)
DPV	Voltametria de Pulso Diferencial (do inglês <i>Differential Pulse Voltammetry</i>)
E_{dep}	Potencial de deposição
E_{amp}	Amplitude do potencial de pulso
EPA	Agência de Proteção Ambiental (do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>)
HMDE	Eletrodo de Mercúrio de Gota Pendente (do inglês <i>Hanging Mercury Drop Electrode</i>)
ICP-AES	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
SRM	Padrão de Referência Certificado (do inglês <i>Standard Reference Material</i>)
SWV	Voltametria de Onda Quadrada (do inglês <i>Square Wave Voltammetry</i>)
t_{dep}	Tempo de deposição
v	Velocidade de varredura

RESUMO

O preparo de amostras é uma etapa determinante no sucesso de um processo analítico. Sendo assim, neste trabalho foi avaliada a eficiência de quatro procedimentos de mineralização de macroalga, sendo dois métodos por sistema fechado (micro-ondas) e dois por sistema aberto (bloco digestor convencional e radiação UV). Para determinação da concentração de Zn, Cd, Pb e Cu foi feita a otimização de dois métodos voltamétricos (Voltametria de Pulso Diferencial e Voltametria de Onda Quadrada) utilizando-se o eletrodo de gota pendente de mercúrio. O método de Voltametria de Onda Quadrada foi escolhido para análise dos metais por ter se mostrado mais sensível (limites de quantificação de $1,38 \mu\text{g L}^{-1}$ para Zn, $0,051 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd, $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb e $0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cu) e as condições experimentais ideais para determinação simultânea dos quatro elementos foram: $\text{pH} = 4$, $E_{\text{dep}} = -1,2 \text{ V}$, $E_{\text{inicial}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, amplitude = $0,04 \text{ V}$, frequência = 30 Hz , $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$. Como técnica comparativa para as análises, foi usada a Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite. Adicionalmente, foram realizadas determinações da concentração de carbono total, orgânico e inorgânico e estudo do efeito matriz. Com isso, pode-se observar que, apesar das mineralizações realizadas por sistema aberto apresentarem menores teores de carbono total e menor efeito de matriz, as determinações dos compostos a partir do SRM não apresentaram recuperações aceitáveis. Os métodos de mineralização por micro-ondas (sistema fechado - métodos A e B) apresentaram recuperação dentro dos limites aceitáveis (78 a 115%) e após a análise estatística pode-se concluir que o método A é mais exato e preciso que o método B, sendo assim, o mais adequado para a mineralização de macroalga para determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu por voltametria.

ABSTRACT

The sample preparation is a crucial step in the success of an analytical process. Therefore, this study evaluated the effectiveness of four digestion procedures of macroalgae where two methods used a closed system (microwave) and two an open system (conventional heating and UV radiation). To determine the concentration of Zn, Cd, Pb and Cu two voltammetric methods were used (Differential Pulse Voltammetry and Square Wave Voltammetry) using mercury drop electrode. The Square Wave Voltammetry was chosen to metals analysis because it was more sensitive (quantification limit of $1.38 \mu\text{g L}^{-1}$ for Zn, $0.051 \mu\text{g L}^{-1}$ to Cd, $0.14 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb and $0.12 \mu\text{g L}^{-1}$ to Cu) and the ideal experimental conditions for simultaneous determination of the four elements were: $\text{pH} = 4$, $E_{\text{dep}} = -1.2 \text{ V}$, $E_{\text{initial}} = -1.1 \text{ V}$, $E_{\text{end}} = 0.3 \text{ V}$, amplitude = 0.04 V , frequency = 30 Hz , $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry was used as a comparative technique. In addition, determinations of total, inorganic and organic carbon as well as the study of matrix effect were performed. Thereby, it can be observed that although digestions accomplished with an open system presented lower levels of total carbon and lower matrix effect, the determinations of compounds from SRM showed acceptable recoveries. The mineralization microwave methods (closed system - methods A and B) showed recovery within the acceptable range (78 to 115%) and after statistical analysis can be concluded that the method A is more accurate than the method B, therefore, most suitable for the mineralization of macroalgae for simultaneous determination of Zn, Cd, Pb and Cu by voltammetry.

1. INTRODUÇÃO

Macroalgas são organismos aquáticos complexos devido à presença de vários grupamentos orgânicos e, muitas vezes, compostos inorgânicos em sua estrutura. Em sua maioria, estes grupamentos orgânicos possuem grande habilidade em complexar/adsorver metais, conferindo assim, a estes organismos, uma vasta aplicação no que se refere ao controle, monitoramento e bioremediação de diferentes ambientes aquáticos. Tendo em vista a complexidade desse tipo de matriz e conhecendo-se a importância desse tipo de organismos, é crescente a avaliação e utilização de diferentes tipos de mineralização da mesma para posterior determinação analítica. É conhecido que uma incompleta e/ou inadequada etapa de mineralização acarretará resultados analíticos muitas vezes errôneos, o que compromete a interpretação dos mesmos. Adicionalmente, a etapa de mineralização e determinação analítica devem ser compatíveis, e por isso, o efeito da matriz frente à determinação analítica deve ser levado em consideração. Dentre as técnicas de preparo, as mais utilizadas para este tipo de amostra são as mineralizações por radiação micro-ondas, bloco digestor e radiação UV. As mineralizações realizadas em micro-ondas mostram-se eficientes em um curto tempo de análise, fazendo uso de altas pressões e temperaturas, e por serem realizadas em sistema fechado, apresentam menor probabilidade de perda e/ou contaminação que as técnicas de sistemas abertos. Dentre as técnicas de sistema aberto, destacam-se o bloco digestor e radiação UV. Apesar dos métodos que usam bloco terem sido bastante utilizados (método recomendado pela EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*), blocos digestor de sistema aberto estão entrando em desuso por necessitar de grandes massas de amostra e grandes volumes de reagentes o que pode acarretar contaminação cruzada, e perdas por volatilização, além de serem necessários elevados tempos de mineralização. O método que faz uso de radiação UV é conhecido pela sua eficiência, pois a radiação incidente na amostra acelera a mineralização da mesma. Entretanto, por ser de sistema aberto, também pode haver perda de analitos de interesse e contaminação cruzada além das mineralizações serem demoradas. Dentre as técnicas de determinação de metais neste tipo de amostra, as técnicas espectrométricas são as mais utilizadas. Entretanto, as técnicas eletroanalíticas, como a voltametria, vêm se mostrando uma excelente alternativa por ser de sensibilidade muito semelhante (ou até algumas vezes melhor) de fácil instrumentação, além de menor custo. Sendo assim, o intuito deste trabalho foi avaliar a possibilidade da aplicação de um método

voltamétrico para a determinação de metais em macroalga após aplicação de diferentes métodos de preparo da mesma.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de procedimentos de mineralização por micro-ondas, bloco digestor e radiação UV na determinação voltamétrica simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu em macroalga.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar e comparar os métodos voltamétricos de pulso diferencial e onda quadrada na determinação de Zn, Cd, Pb e Cu.
- Validar a técnica com uso de SRM.
- Determinar a concentração de carbono total, inorgânico e orgânico na amostra e SRM digeridos por micro-ondas, bloco digestor e irradiação UV.
- Avaliar o efeito de procedimentos de mineralização da amostra e SRM por micro-ondas, bloco digestor e radiação UV.
- Avaliar o efeito matriz na análise voltamétrica da amostra e SRM digeridos por micro-ondas, bloco digestor e irradiação UV.
- Determinar a concentração de Zn, Cd, Pb e Cu em amostra de macroalga usando os procedimentos recomendados.
- Utilizar a GF AAS como técnica comparativa à voltamétrica.

➤ 3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Macroalgas

Macroalgas são organismos aquáticos amplamente utilizados para controle, monitoramento e bioremediação de contaminação ambiental. Macroalgas eucariontes do tipo Chlorofitas apresentam coloração verde e são responsáveis por boa parte da produção de oxigênio no planeta. São consideradas matrizes de alta complexidade, pois apresentam acúmulo de amido no interior das células e sua coloração é devido aos elevados teores de clorofila a e b, carotenos e xantofilas. (VIDOTTI e ROLEMBERG, 2004).

Esses organismos possuem diferentes grupos funcionais em suas células que permitem a captação de íons metálicos em toda a sua estrutura (MEERAVALI e KUMAR, 2000). Farías e colaboradores (2002) relatam que na estrutura das algas existem compostos como polissacarídeos, proteínas, ácidos carboxílicos, grupos fosfatos e sulfatos que contem sítios aniônicos que atraem cátions metálicos.

O uso da biomassa de macroalgas como biomonitores de metais contaminantes é vantajoso, devido ao fato de terem mobilidade limitada, o que torna possível afirmar que as concentrações determinadas neste tipo de amostra podem representar os níveis de poluentes em um determinado local (CHAKRABORTY e colaboradores, 2014). O uso da água também pode ser utilizado para o monitoramento das concentrações de metais livres no meio aquático, entretanto as diferenças de intensidades das marés influenciam diretamente nas coletas, sendo necessárias várias coletas, em diferentes épocas do ano, para obter respostas confiáveis (PHILLIPS, 1977; CONTI e CECCHETTI, 2003; CHAKRABORTY e colaboradores, 2014).

Com o crescente aumento na concentração de elementos tóxicos em ambientes aquáticos há a necessidade de desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos analíticos que possam determinar as concentrações de contaminantes na biota, a fim de evitar que estes níveis tornem-se irremediáveis (MEERAVALI e KUMAR, 2000). Entretanto, a marcha analítica utilizada para a determinação desses compostos deve ser a mais apropriada possível, uma vez que a matriz em questão é considerada complexa, devendo-se assim ter um cuidado especial em relação ao preparo da amostra e à técnica a ser utilizada para a determinação dos compostos de interesse.

3.2 Metais

Os metais são divididos em essenciais e não essenciais, sendo que os essenciais são aqueles que participam de algum processo biológico nos organismos, mas dependendo da concentração podem ser tóxicos. Os metais não essenciais são os elementos que não participam de nenhuma função biológica, sendo tóxicos em qualquer concentração (COBBINA e colaboradores, 2015).

Esses elementos são liberados para o meio ambiente por fontes antropogênicas e naturais e tendem a ter sua concentração aumentada por não serem biodegradáveis. Como exemplos de fontes antropogênicas, podem ser citadas atividades portuárias, de mineração, agricultura, fundição, entre outras. Metais como Cu, Cd, Hg, Pb, Zn e As são considerados contaminantes e, na natureza, podem estar ligados a outros compostos, ligados entre si ou disponíveis individualmente (COBBINA e colaboradores, 2015; ZENG e colaboradores, 2016).

Os metais, quando na forma iônica, podem se ligar reversivelmente a compostos orgânicos e elementos ou grupos de elementos que tenham pares de elétrons devido ao seu caráter eletrofílico (BIANCHI, 2007). Os organismos vivos possuem em sua estrutura moléculas com grupos funcionais que contemplam a presença de elementos como N, O e S, que podem agir como base de Lewis e tendem a formar ligações covalentes com metais, devido aos seus pares de elétrons disponíveis. Ligações covalentes são mais fortes que as forças eletrostáticas exercidas pelas moléculas de água que solvatam os metais em ambientes aquáticos (BIANCHI, 2007). Devido a essa característica eletrofílica, os metais apresentam tendência de serem bioacumulados e biomagnificados na cadeia alimentar. (BIANCHI, 2007; MOFFET e BRAND, 1996)

Alguns estudos tem mostrado que, elementos como Pb, Hg, As e Cd podem prejudicar os organismos, mesmo que em baixas concentrações, devido ao deslocamento de metais essenciais. (HUANG, 2015; COBBINA e colaboradores, 2015).

Um estudo realizado por Fu e colaboradores, (2013) aborda a tendência de pesquisadores de várias partes do mundo a procurar entender os efeitos toxicológicos de elementos que podem ser contaminantes no meio ambiente. Segundo esses autores os artigos que apresentam maior número de publicações são sobre arsênico, nitratos, flúor, chumbo e cádmio.

Com relação aos organismos de base da cadeia alimentar, como as algas, Baumann, Morrison e Stengel, (2009) relatam que metais podem diminuir a capacidade antioxidante desses organismos, podendo levar a inibição da produção de clorofila e fotossíntese.

3.2.1 Cádmio

O Cd é um elemento facilmente encontrado na natureza e, mesmo em baixas concentrações, é considerado um contaminante que pode agir nos organismos como desregulador endócrino (HUANG, 2015). Os principais usos do Cd são na indústria (por exemplo na galvanoplastia) e na agricultura (por exemplo, no uso de pesticidas), (JÄRUP e ÅKESSON, 2009).

Há décadas o Cd é considerado um perigo para a saúde pública. No Japão, em 1955, parte da população passou a sentir muitas dores e apresentar má formação dos ossos. Esse fato ocorreu devido a uma contaminação do solo por Cd e a intoxicação foi atribuída à ingestão de arroz contaminado com alta concentração deste elemento (JÄRUP e ÅKESSON, 2009).

Pesquisadores têm direcionado seus estudos para o aperfeiçoamento de técnicas analíticas para a determinação da concentração de Cd em algas, como por exemplo, o trabalho de Meepum, Siriket e Dejmanee, (2012) que, após a otimização de um método voltamétrico, determinaram concentrações de 0,223 a 0,388 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Cd em algas marinhas. TAMAYO e colaboradores, (2014) usando Voltametria de Onda Quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*), determinaram que a concentração de Cd em algas verdes situava-se entre 2,2 a 4,6 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Entretanto, esses valores de concentração podem variar dependendo do tipo de alga e do local de coleta. Papa, Casoria e Guida (2008) avaliaram os teores de Cd por Voltametria de Redissolução Anódica (ASV, do inglês *Anodic Stripping Voltammetry*) em alga verde coletada em dois diferentes locais da Itália. A amostra coletada próxima da cidade de Nápoles apresentou concentração de 14,82 $\mu\text{g g}^{-1}$, enquanto uma amostra coletada longe de Nápoles (da mesma espécie), e perto de uma ilha chamada Ischia a concentração de Cd foi de 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$. Com isso pode-se inferir que o nível de metal determinado tem relação direta com o local e com as atividades antropogênicas da região.

3.2.2 Cobre

O cobre é um elemento essencial por participar de funções vitais nos organismos. Uma das principais funções das moléculas contendo Cu é o transporte de elétrons e oxigênio. Entretanto, em concentrações elevadas o Cu pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (Crisponi e colaboradores, 2010), assim como acelerar a anemia devido a sua interferência no metabolismo do ferro (BARCELOS, 2008).

O aumento das concentrações de cobre no meio ambiente pode ser devido a processos industriais e atividades agrícolas. A introdução de Cu no ambiente pode ocorrer também devido ao uso de canos de cobre em instalações hidráulicas (GRIGOLETTO e colaboradores, 2012).

Girarde e colaboradores (2014) comentam que grupos funcionais sulfônicos presentes nas superfícies de macroalgas são responsáveis pela remoção de Cu^{2+} do meio aquoso. Em estudo ambiental realizado por Leal e colaboradores (1997) em macroalgas coletadas em três diferentes locais do litoral de Portugal, as concentrações encontradas para o Cu foram de 5,8 a $16,9 \mu\text{g g}^{-1}$.

3.2.3 Zinco

O Zn, segundo Mafra e Cozzolino (2004) é importante na saúde humana, pois é integrante de várias enzimas, agindo como cofator imprescindível para as atividades de algumas metaloenzimas e metaloproteínas.

A presença de concentração elevada de Zn em vegetais pode inibir a fotossíntese pela interferência no transporte de elétrons e diminuição da clorofila *a* e *b* (WANG e colaboradores, 2009). O excesso de Zn também pode gerar toxicidade parcial, perturbando a função de outros nutrientes e induzindo plantas que não são hiperacumuladoras ao stress oxidativo (WANG e colaboradores, 2009).

Stengel e colaboradores (2004) ao analisar espécies de algas verdes coletadas em regiões da Irlanda Ocidental, concluíram que estas apresentaram concentrações de Zn semelhantes, apesar de suas diferentes morfologias, a média das concentrações de Zn nas clorófitas analisadas foi de $25,61 \mu\text{g g}^{-1}$.

Akali e Kucukcezgin analisaram as concentrações de metais em macroalgas coletadas ao longo da costa do Mar Egeu e encontraram para Zn uma concentração de média de $47,35 \mu\text{g g}^{-1}$. A menor concentração encontrada foi de $8,9 \mu\text{g g}^{-1}$ e a maior foi de $73,6 \mu\text{g g}^{-1}$.

O Zn foi um dos metais analisados por Zbikowski, Szefer e Latala, (2007) em macroalgas verdes coletadas em locais do Sul do mar Báltico. Esses autores obtiveram diferentes concentrações de Zn para diferentes locais de coleta da macroalga verde *Clodophora sp* e essas concentrações variaram entre 21,7 a $146,4 \mu\text{g g}^{-1}$.

3.2.4 Chumbo

Dentre os elementos que não possuem funções essenciais nos organismos está o chumbo, que é encontrado na natureza como contaminante ambiental devido ao seu largo emprego industrial (indústrias mineradoras e manufaturas em geral) (IYER, SENGUPTA e VELUMANI, 2015).

Os sítios críticos de exposição ao chumbo são medula óssea, sistema nervoso e rins. Normalmente os níveis de Pb encontrados no sangue são os mesmos presentes no sistema nervoso (MOREIRA e MOREIRA, 2004).

Em um trabalho realizado por Brito e colaboradores, (2012) com macroalgas coletadas em diferentes pontos da Baía de Todos os Santos, determinaram para diferentes locais e diferentes macroalgas, concentrações de Pb que variaram de 0,72 a $8,27 \mu\text{g g}^{-1}$. Segundo esses autores, as amostras coletadas na localidade de Caboto indicaram que esta é uma das áreas mais afetadas por metais pesados como o Pb (BRITO e colaboradores 2012).

Em um estudo feito com 26 macroalgas coletadas no Golfo de Salônica, do Mar Egeu, as concentrações de Pb em clorófitas variaram de 0,5 a $17,7 \mu\text{g g}^{-1}$ (MALEA e KEVREKIDIS, 2014).

3.3 Preparo de amostras

Preparo de amostras é uma etapa importante de uma análise química, onde é necessário definir e/ou escolher um procedimento ideal para a mineralização das mesmas. Alguns aspectos importantes na escolha de um procedimento de abertura de amostra é que seja simples, utilize pequenos volumes de reagentes e resulte na dissolução completa da amostra (MEERAVALI e KUMAR, 2000). Sendo assim, é preciso levar em consideração a natureza

do elemento a ser determinado, sua concentração estimada, o método de análise e a precisão e exatidão desejadas (ARRUDA e SANTELLI, 1997).

Na etapa de preparo de amostras, podem ocorrer erros que comprometem toda a análise. Um deles pode ser a contaminação ou perda de analito. Segundo alguns autores, a etapa de preparo de amostras, como mineralização ou extração, não acompanhou o mesmo ritmo de desenvolvimento dos métodos analíticos de determinação. Isso criou obstáculos para o avanço de técnicas analíticas (SMITH e ARSENAULT, 1996), pois o preparo de amostras representa uma etapa fundamental, já que o tempo consumido pode equivaler de 60 a 90% do tempo total do processo analítico (KINGSTON e JASSIE 1988).

A determinação da concentração de oligoelementos em organismos como algas fornecem informações importantes quanto ao caminho, níveis e disponibilidade de poluentes transportados pelo ar ou ambientes aquáticos (MIRAVALI e KUMAR, 2000). Porém para a análise de amostras orgânicas é necessário que a escolha do procedimento de mineralização seja adequada à técnica usada para quantificação.

A maior parte das técnicas disponíveis atualmente para análise necessita que a amostra seja líquida. Normalmente para quantificar elementos, independente da forma de mineralização (bloco digestor, micro-ondas ou radiação UV), são usados ácidos ou misturas de ácidos (HNO_3 , H_2SO_4 e HCl) combinados (ou não) com outros oxidantes como o H_2O_2 (ARRUDA e SANTELLI, 1997).

Dentre os trabalhos reportados na literatura, a maioria realiza procedimentos de abertura em sistemas com bloco digestor, micro-ondas ou radiação UV. Sendo assim, a seguir será abordado um breve referencial sobre esses procedimentos.

3.3.1 Micro-ondas

A mineralização por micro-ondas ocorre pela ação de energias eletromagnéticas não ionizantes que promovem nas espécies em solução movimentos de migração iônica e/ou rotações de dipolo. Esses processos resultam em movimentos moleculares do material e isso ocorre devido a um sistema de alternância do campo magnético, provocando aquecimento. (ARRUDA e SANTELLI, 1997); (KRUG, 2010).

Os primeiros pesquisadores a usar a radiação micro-ondas foram Abu-samra, Morris e Koityohann, (1975). Eles improvisaram um forno micro-ondas caseiro com potência de 600 W para o preparo de amostras biológicas. A mistura mineralizadora foi constituída de ácido

nítrico e ácido perclórico na proporção de 4:1 (v/v) e, em algumas das mineralizações usaram peróxido de hidrogênio a 30% (v/v). Como vasos para a mineralização, os autores usaram um erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL da mistura ácida e 500 mg de amostra. Tendo em vista o uso de erlenmeyer, que é considerado um sistema aberto, esses pesquisadores construíram um sistema de limpeza de gases para não danificar o magnetron e os componentes eletrônicos.

Em 1984, Nadkarni publicou um artigo em que comenta sobre a árdua tarefa de quando se precisava mineralizar várias amostras usando uma técnica de mineralização úmida com sistema aberto, pois estes procedimentos demandavam uma constante supervisão por parte dos analistas, além de outros inconvenientes como a possível perda de oligoelementos e a contaminação da amostra (NADKARNI, 1984).

Em 1986 Kingston e Jassie publicam um artigo em que comentam sobre o crescente uso da radiação micro-ondas na época como fonte de calor em mineralizações ácidas, dando ênfase às limitações dos equipamentos usados pelos pesquisadores neste período. Segundo eles, no início dos experimentos com micro-ondas os frascos não eram fechados, proporcionando perda de analito por volatilização, além de oxidar os componentes do forno. Isso limitava a temperatura máxima, pois para evitar a volatilização dos analitos e a oxidação dos componentes eletrônicos era preciso que a temperatura do sistema não ultrapassasse a temperatura de ebulição do ácido.

Segundo Smith e Arsenault (1996), amostras biológicas são de certa forma complexas para sistemas que usam pressão ambiente, tendo em vista que estas amostras possuem como constituintes básicos carboidratos, proteínas e lipídeos, cujas temperaturas de decomposição são de aproximadamente 140 a 160 °C. Isso configura um problema frente à temperatura de ebulição, por exemplo, do ácido nítrico, que é de 120 °C à pressão ambiente. Se o ácido nítrico estiver em um ambiente em que a pressão seja elevada a 5 atm, em frasco fechado, o ponto de ebulição deste ácido passa para 176 °C, sendo esta uma vantagem proporcionada pelo forno de micro-ondas.

Segundo Agazzi e Pirola (2000), é crescente o uso de fornos micro-ondas nos laboratórios de Química Analítica em substituição a chapas de aquecimento e bloco digestor e essa substituição está relacionada às vantagens oferecidas pelo avanço da tecnologia que permitem uma melhor recuperação dos elementos e compostos voláteis, menor nível de contaminação e uso de menor volume de reagentes (AGAZZI e PIROLA, 2000).

É conhecido que o micro-ondas apresenta vantagens, como o uso de recipientes fechados que minimiza o risco de perda de analito e diminui as chances de contaminação,

garantindo uma completa mineralização em um breve intervalo de tempo (MESKO e colaboradores, 2015). Entretanto, há na literatura trabalhos atuais que fazem uso de bloco digestor para mineralização de algas (com base no método EPA 3050B) (TAMAYO e colaboradores, 2014).

Atualmente muitos pesquisadores realizam mineralizações de macroalgas e/ou algas usando o forno de micro-ondas. Em seus trabalhos normalmente citam diferentes proporções entre misturas de oxidantes e diferentes variações de tempo e potência.

Rocha e colaboradores, (2009) otimizaram um método de mineralização por micro-ondas em que usaram diferentes volumes de HNO_3 e H_2O_2 para avaliar a concentração de alguns metais em algas coletadas em diferentes países. Após a otimização do preparo de amostra, optaram por usar uma mistura de 4,5 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2O_2 . Esses autores apontaram como vantagens do uso do micro-ondas o pequeno volume de reagente usado e o curto tempo (20 minutos) para total mineralização da amostra (ROCHA e colaboradores 2009). Utilizando ICP-MS (do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), os autores relatam que para o Pb determinaram as seguintes concentrações para as macroalgas coletadas em cada país: França $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$, Espanha $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$, Coreia $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, Japão $0,85 \mu\text{g g}^{-1}$ (ROCHA e colaboradores 2009).

Calicete e colaboradores, (2002) determinaram Fe, Zn, Cu, Cd, Ni, Pb e Cr em sete diferentes algas de relevância comercial, em diferentes locais do Lago Veneza na Itália em que analisaram Fe e Zn usando Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (F AAS, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry*) e Pb, Cr, Cd, Cu, Ni usando Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GF AAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). Para mineralização usaram um micro-ondas processando uma mistura de 300 mg de biomassa de alga em uma mistura de 3 mL de água, 5 mL de HNO_3 e 1 mL de H_2O_2 30%. Segundo esses autores o procedimento de mineralização usado foi o suficiente para obterem extratos livres de resíduos não dissolvidos. Para a espécie *Ulva*, Caliceti e colaboradores, (2002) encontraram as seguintes variações de concentrações para diferentes locais de coleta: Zn variou de $25 \mu\text{g g}^{-1}$ a $179 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu de 4 a $29 \mu\text{g g}^{-1}$, Cd variou de concentrações inferiores a $0,1$ até $0,7 \mu\text{g g}^{-1}$, Pb variou de $0,7$ a $17,6 \mu\text{g g}^{-1}$. Ao analisar o material de referência, esses autores encontram recuperações de 100% para Cd e Pb, 109% para Cu. Porém para Zn, os pesquisadores comentam que pode ter havido contaminação do material de referência antes da análise, pois obtiveram uma recuperação de 193,7% (CALICETI e colaboradores, 2002).

Onze elementos foram analisados por Brito e colaboradores (2012) em dez diferentes espécies de macroalgas. Essas amostras foram digeridas em micro-ondas que operou com 900 W de potência e, para tal, foram pesadas 200 mg de amostras e colocadas em vasos de teflon e misturadas a 7 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂. Segundo os autores esse procedimento foi o suficiente para obter extratos livres de resíduos. Para a análise do material de referência, eles obtiveram as seguintes recuperações: Zn 86%, Pb 102%, Cu 92,1%, Cd 92%. As médias para a determinação de alguns metais da macroalga *Ulva lactuca* coletada na Baía de Todos os Santos foram as seguintes: Cd 0,232 µg g⁻¹, Pb 0,450 µg g⁻¹, Cu 2,59 µg g⁻¹, Zn 9,86 µg g⁻¹ (BRITO e colaboradores, 2012).

Meepun, Siriket e Dejmanee, (2012) usaram um método eletroquímico para análise de Cd em algas. Uma massa de 0,2 g foi pesada com precisão e transferida para frasco de Teflon de alta pressão como vaso de mineralização de um micro-ondas utilizando-se 5 mL de ácido nítrico a 65%. Na sequência, a solução foi transferida para um balão volumétrico e diluída até 25 mL com água deionizada. Os autores comentam que a mineralização foi completa. A análise foi feita por adsorção do íon Cd na presença de cupferrom em um eletrodo de nafion revestido com filme de bismuto. Segundo os autores, este método proposto eliminou o efeito matriz e o conteúdo de Cd encontrado por Voltametria de Redissolução Anódica Adsorptiva por Onda Quadrada foi de 0,223 a 0,388 µg g⁻¹. Como método de comparação foi usado GF AAS onde as concentrações de Cd variaram de 0,169 a 0,472 µg g⁻¹ (MEEPUN, SIRIKET, DEJMANEE, 2012).

3.3.2 Bloco digestor

Segundo Smith e Arsenault (1996), técnicas de mineralização ou extração tradicional, como as de bloco digestor e incineração, são lentas e envolvem o aquecimento de amostras com misturas de vários ácidos por longos períodos. Algumas técnicas tradicionais determinam que a solução seja levada à secura e, na sequência, seja adicionado mais ácido para redissolução. Entretanto, estas técnicas são suscetíveis a perdas de analitos e contaminação cruzada (CARVALHO e colaboradores, 2008).

Outros fatores que agregam dificuldades no uso de técnicas de aquecimento com sistema aberto são a necessidade de observação constante por parte do analista e o uso de grandes quantidades de reagentes (SMITH e ARSENAULT, 1996; CARVALHO e colaboradores, 2008).

O método de mineralização EPA 3050 B é um método padrão e foi usado por Tamayo e colaboradores, (2014) na mineralização de macroalgas e ovos de tartaruga para determinação da concentração de metais por voltametria. Para este procedimento foram utilizados 1 g da amostra, 10 mL de HNO₃ 65% e 3 mL de H₂O₂ 30 %. As amostras foram mantidas no sistema a 100 °C até não serem mais emitidos vapores nitrosos. Em seguida, os volumes das amostras digeridas foram aferidos a 50 mL com água ultra-pura, armazenadas em tubos tipo falcon e mantidas refrigeradas a 5 °C. As concentrações encontradas para a macroalga foram de 0,52; 1,49 e 6,7 µg g⁻¹ para Cd, Pb e Cu respectivamente e as recuperações foram de 94,3 %, 100 % e 100% respectivamente (TAMAYO e colaboradores, 2014)

3.3.3 Radiação UV

A radiação UV tem sido abordada como alternativa no preparo de amostras pela sua eficiência na quebra de complexos metálicos por radicais gerados pela foto-oxidação (GOLVÊA e colaboradores 2014). Como vantagens do uso de radiação UV alguns autores tem proposto a confecção de equipamentos de radiação UV com materiais de baixo custo, além de comentarem sobre a minimização de contaminação devido ao uso de pequenos volumes de reagentes (GOUVÊA e colaboradores, 2014; CAMPOS e colaboradores, 2001).

Normalmente a radiação UV tem sido usada na mineralização de amostras líquidas (VASCONCELOS e LEAL, 1997; GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996).

O uso da irradiação UV como forma de decomposição de matéria orgânica não é visto na literatura para todos os tipos de matrizes. Normalmente este tipo de irradiação não é usada para mineralização de amostras com elevado teor de compostos orgânicos, devido à necessidade de longos períodos de irradiação (CAVICCHIOLI e GUTZ, 2003; GOLIMOWSKI e GOLIMOWSKA, 1996).

Na literatura foram encontrados dois artigos onde o uso da radiação UV foi relatado como uma etapa complementar à mineralização por micro-ondas de amostra sólida. (GOLIMOWSKI e GUSTAVSSON, 1983; GOLIMOWSKI e DMOWSKI, 1995).

A mineralização de amostras complexas por radiação UV, como por exemplo, águas residuais e efluentes de indústrias petrolíferas tem sido apontada por alguns pesquisadores como uma boa alternativa para a eliminação de matéria orgânica, tendo em vista que estes compostos orgânicos podem interferir nos resultados, diminuindo a razão entre o sinal analítico e o ruído (LEJBT e colaboradores, 2016; DOMINGOS e colaboradores, 2016).

Domingos e colaboradores, (2016) otimizaram um método para análise de Zn, Cd, Pb e Cu em efluentes de uma indústria petroquímica usando a técnica ASV. Através de um estudo fatorial de dois níveis, avaliaram parâmetros voltamétricos, configuração da mistura dos reagentes oxidantes e tempo de exposição a irradiação UV. Optaram pelo uso de 50 µL de HNO₃, 25 µL de H₂O₂ e 75 minutos de irradiação. As recuperações obtidas foram de 80 a 117 % para Zn, 86 a 105 % para Cd, 80 a 118 % para Pb e de 80 a 120 % para Cu. Os valores de concentração encontrados foram concordantes com os obtidos pela análise por ICP OES.

3.4 Técnicas de quantificação

Hoje as técnicas usadas com frequência para determinar baixas concentrações de metais em amostras ambientais são as de absorção e emissão atômica, além de técnicas eletroanalíticas (voltametria).

3.4.1 Técnicas espectrométricas

Dentre as técnicas de quantificação a Espectrometria de Absorção Atômica é muito usada na determinação de metais em amostras ambientais. Dentre os tipos de atomizadores para essa forma de análise tem-se: chama, forno de grafite, geração de hidretos e vapor frio (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002). O atomizador por chama oferece uma boa reprodutibilidade nas análises, no entanto não oferece uma boa sensibilidade devido ao breve tempo de permanência dos átomos no caminho óptico. Já a atomização realizada por forno de grafite (GF AAS) oferece uma boa sensibilidade, pois o tempo de permanência dos átomos no caminho óptico é maior.

Caliceti e colaboradores, (2002) na análise de metais pesados em macroalgas utilizaram a técnica de atomização por chama (F AAS) para a análise de elementos normalmente presentes nas amostras em maior concentração, como Fe e Zn. Para a quantificação da concentração de elementos como Pb, Cr, Cd, Cu, Ni e As, por serem elementos presentes em menor concentração, utilizaram a técnica de atomização por forno de grafite, por esta ser a que apresenta melhor sensibilidade.

O uso da absorção com atomizador de chama para a determinação de elementos traço, como o Pb e Cd também é realizado por alguns pesquisadores, como por exemplo Leal e

colaboradores, (1997) onde conseguiram limites de detecção para Cd $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu $0,07 \mu\text{g g}^{-1}$, Pb $0,13 \mu\text{g g}^{-1}$.

Para análise da concentração de metais em amostras ambientais também são usadas para quantificação às técnicas de Espectrometria de Emissão Atômica e Espectrometria de Massas.

A Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado, ICP-AES (do inglês *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) se caracteriza pelas linhas de emissão geradas pela influencia de um plasma indutivo de argônio com temperatura capaz de promover a excitação de uma gama de elementos químicos. Para uma determinada proporção de átomos excitados, tem-se um equivalente de intensidade de uma determinada linha de emissão (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

A Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, ICP-MS (do inglês *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) é um equipamento que pode realizar análises multielementares. Possui também como fonte de ionização um plasma de argônio de alta energia. O detector pode ser um espectrômetro de massa de alta ou baixa resolução (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Entretanto, apesar das vantagens da determinação da concentração de oligoelementos por ICP-MS, matrizes com alto teor de sódio são inconvenientes para este tipo de técnica. Como, por exemplo, as amostras de algas coletadas na Antártica, no trabalho de (MESKO e colaboradores, 2015) para a possível determinação foi preciso uma elevada diluição da amostra após a mineralização. Para uma determinação eficiente esta técnica requer uma baixa concentração de carbono residual e para isso é preciso que a amostra seja completamente decomposta.

Brito e colaboradores, (2012) analisaram a concentração de 12 elementos em diferentes macroalgas coletadas em diferentes locais da Bahia de Todos os Santos. Dentre estes elementos analisaram a concentração de Cd, Cu, Pb e Zn na *cloróphita Ulva lactuca*. Na análise do material de referência, que também foi uma *cloróphita* (alface do mar), após mineralização por micro-ondas e usando uma técnica de emissão atômica, ICP-MS, encontraram as seguintes recuperações: Cd 106%, Cu 92,1%, Pb 102% e para Zn 86,1%. As concentrações dos elementos encontradas na *cloróphita Ulva lactuca* foram as seguintes: Cu $3,13 \mu\text{g g}^{-1}$, Cd $0,26 \mu\text{g g}^{-1}$, Zn $10,2 \mu\text{g g}^{-1}$ e Pb $0,729 \mu\text{g g}^{-1}$.

Machado, Ferreira e Zalmom, (2003) analisaram, dentre outros metais, Zn e Cu na *cloróphita Ulva Fasciata*, coletada na costa Norte do Estado do Rio de Janeiro. A determinação analítica foi feita por ICP-AES, onde na análise da concentração de Zn e Cu no material de

referência encontraram as seguintes recuperações: Zn 88% e Cu 99%. As concentrações na macroalga *Ulva Fasciata* foram as seguintes: Cu $2,9 \mu\text{g g}^{-1}$ e Zn $6,4 \mu\text{g g}^{-1}$.

3.4.2 Voltametria

O termo técnicas eletroanalíticas abrange um conjunto de técnicas, dentre elas as voltamétricas que são atualmente usadas em várias áreas do conhecimento, como Físico-química, Bioquímica, Medicina e outras com a finalidade de se obter propriedades específicas de determinadas substâncias (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

As técnicas voltamétricas possibilitam uma relação direta da concentração do analito com propriedades elétricas como, corrente, potencial, condutividade ou carga (SOUZA, MACHADO e AVACA, 2003).

A voltametria se originou a partir da polarografia, que foi introduzida por um químico tchecoslovaco chamado Jaroslav Heyrovsky, em meados de 1920. Na voltametria são usados diferentes tipos de eletrodos, como eletrodo de gota de mercúrio pendente (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*), eletrodo de filme de mercúrio (TMFE, do inglês *Thin Mercury Film Electrode*), eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*), eletrodo de pasta de carbono (CPE, do inglês *Carbon Past Electrode*), eletrodos de metais nobres, como ouro e platina, dentre outros.

O eletrodo ainda mais usado em voltametria é o microeletrodo de mercúrio no modo HMDE e existem algumas razões para isso, dentre as quais merecem destaque a reprodutibilidade e ampla faixa de potencial negativo, comparado a outros eletrodos polarizados. O limite da faixa útil de potencial é fortemente dependente do pH do meio sendo que para a região catódica é em torno de -2 V e para a região anódica é em torno de $0,2 \text{ V}$ devido a redução de hidrogênio e oxidação de mercúrio, respectivamente (BRETT, 1996). A região de potencial abordado no parágrafo acima é onde ocorrem as reações de oxirredução da maioria dos íons metálicos e de muitos compostos orgânicos, corroborando assim com a sua importância (ALEIXO, 2003).

Segundo Skoog, Holler e Nieman, (2002) outra vantagem do uso de HMDE é que a cada leitura uma nova gota é formada com ausência de impurezas e irregularidades evitando efeitos de memória. Isso é uma vantagem, pois correntes medidas em voltametria são muito sensíveis à limpeza. Adicionalmente, a calibração normalmente utilizada é a adição do padrão

e sendo assim, o efeito de matriz é compensado garantindo maior confiabilidade dos resultados.

Quanto à segurança ambiental, os mecanismos de formação da gota de mercúrio dos modernos equipamentos, como por exemplo, o Stand 663 da Metrohn, produz na hora da análise uma gota com área de $0,52\text{mm}^2$, permitindo um armazenamento seguro para futura reciclagem do Hg, gerando um risco ambiental mínimo (ACHTERBERG e BRAUNGARDT, 1999).

Na janela de potencial útil do eletrodo de mercúrio, o O_2 possui dois potenciais de oxidação, aproximadamente entre 0,05 e -0,9 V. Sendo assim, a presença do oxigênio interfere nas medidas voltamétricas (BRETT, 1996), por isso é fundamental a remoção do O_2 e isso normalmente é realizado através do desaeramento (borbulhamento) da solução com um gás inerte, como por exemplo, o N_2 (99 % de pureza).

A Voltametria de Redissolução Anódica (ASV, do inglês *Anodic Stripping Voltammetry*) tem sido amplamente utilizada na determinação da concentração de metais traço, devido à etapa de deposição onde convecção e difusão auxiliam no deslocamento dos íons do seio da solução para a superfície do eletrodo. No caso do micro-eletrodo de Hg, estes íons se deslocam, formando um amalgama (ACHTERBERG e BRAUNGARDT, 1999). A variação do tempo de deposição dos elementos na superfície do eletrodo é o que caracteriza a sensibilidade da técnica (PALCHETTI e colaboradores, 2005).

Após o intervalo de tempo de deposição o sistema entra em repouso e ocorre uma varredura de potenciais no sentido anódico. Dependendo do potencial de oxidação cada íon metálico oxidará em uma determinada região da janela de potenciais. No momento da oxidação uma corrente proporcional à concentração do elemento presente na solução é produzida, resultando em um pico de oxidação que caracteriza o voltamograma (ACHTERBERG e BRAUNGARDT, 1999). Dentre as técnicas voltamétricas mais utilizadas para a análise traço, destacam-se a Voltametria de Pulso Diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) e a Voltametria de Onda Quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*).

A Voltametria de Redissolução Adsorptiva (AdSV, do inglês *Adsorptive Stripping Voltammetry*) foi usada por Papa, Casoria e Guida, (2008) no monitoramento ambiental do Golfo de Nápoles no Sul da Itália. Foram coletadas algas verdes enteromórfhas sp, para serem usadas como biomonitores de Cd, Cu e Pb. As análises foram feitas em triplicata, tendo os autores conseguido recuperações de 97,5 % para Cd, 95,5 % para Cu e 94,25 para Pb. Para amostras coletadas próximas a Nápoles, que é considerada uma região impactada por metais

contaminantes, encontraram as seguintes concentrações: Cd 14,82; Cu 23,08 e Pb 44,76 $\mu\text{g g}^{-1}$. Já para as macroalgas coletadas nas proximidades da Ilha Ischia que é considerada uma região não impactada por metais pesados encontraram as seguintes concentrações: Cd 0,02; Cu 0,98 e Pb 2,05 , $\mu\text{g g}^{-1}$ (PAPA, CASORIA e GUIDA, 2008).

Tamayo e colaboradores, (2014) usando a técnica de SWV analisaram Cd, Cu e Pb na alga Sargasun Natan, obtiveram as seguintes recuperações: Cd 94,3 % , Cu 100%, e Pb 100%. As concentrações encontradas na alga foram as seguintes: Cd 0,528 $\mu\text{g g}^{-1}$, Cu 6,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ e para Pb 1,49 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Martin, Huang e yoom, (1994), usando a DPV avaliaram a concentração de metais em Lago de Veneza, usando uma macroalga verde como biomonitor, encontraram as seguintes concentrações: Cu 0,14 a 0,25 $\mu\text{mol g}^{-1}$, Pb 0,017 a 0,072 $\mu\text{mol g}^{-1}$, Cd 0,00053 a 0,0445 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

Steppler e Nurnberg, (1979) analisaram a concentração de metais em diferentes tipos de organismos, dentre estes, analisaram a concentração em macroalga verde Ulva Lactuca usando DPV em que encontraram as seguintes concentrações: Cd 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$, Pb 4,89 $\mu\text{g g}^{-1}$ e Cu 8,16 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Sendo assim, ficam evidentes as vantagens da utilização da voltametria, principalmente em relação à alta sensibilidade, baixos custos e possibilidade de determinação simultânea de analitos.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Instrumentação

No preparo de soluções e lavagem das vidrarias, foi utilizada água ultrapura, obtida a partir de um sistema de purificação (Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q UV3®, Alemanha), com resistividade $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Todos os procedimentos de pesagem efetuados durante este trabalho foram feitos em uma balança analítica (OHAUS, MOD HS300294, Brasil). Para pipetagem das soluções, foram utilizados micropipetadores automáticos, com capacidade variável de 10 a 1000 μL (LABMAT Polônia).

Para a secagem de vidrarias e utensílios foi usada uma capela de fluxo laminar vertical (Filterflux, Brasil).

As medidas de pH foram feitas utilizando um pHmetro digital (Digimed modelo MM-22, Brasil), com eletrodo de vidro combinado, sensor de temperatura e resolução de 0,01 unidades de pH.

As mineralizações foram realizadas por forno micro-ondas modelo MARSXpress (CEM, USA), bloco digestor (Oxylab, Brasil) e digestor UV modelo UV 705 (Metrohm, Suíça).

As determinações de carbono total, inorgânico e orgânico foram realizadas utilizando-se um equipamento modelo TOC - VCPH, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM – 5000A, marca SHIMADZU com detector de combustão.

Para as medidas voltamétricas foi utilizado um Potenciostato/Galvanostato Autolab PGSTAT 101, Interface Autolab IME663, Stand Metrohm 663 VA. O eletrodo de trabalho utilizado foi uma gota de Hg pendente na superfície de um capilar que está conectado a um reservatório de mercúrio. O eletrodo auxiliar é de carbono vítreo com forma de bastão e o eletrodo de referência foi o de Ag/AgCl/KCl 3 mol L^{-1} . A célula utilizada para as análises foi de quartzo.

Para comparação entre técnicas de determinação, foi utilizado um equipamento de absorção atômica, modelo Analyst 600 (Perkin Elmer USA) e o sistema de atomização foi o forno de grafite com aquecimento transversal.

4.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, tais como: HNO₃ 65% destilado (Synth, Brasil), H₂SO₄ concentrado (Merck, Alemanha), HCl 37 % (Merck, Alemanha), H₂O₂ 30 % (Synth, Brasil), ácido acético glacial 99,7% (Synth, Brasil), NH₄OH 30% (Synth, Brasil), biftalato de potássio (Synth, Brasil), bicarbonato de sódio (Synth, Brasil), carbonato de sódio (Synth, Brasil). Todas as soluções aquosas intermediárias foram preparadas a partir de padrões dos metais Zn, Cd, Pb e Cu (1 g L⁻¹) (ASSURANCE SprexCertiprex - EUA).

Para a construção da curva de calibração das amostras foi preparada solução mista com os quatro elementos de interesse com concentrações de 1,6 mg L⁻¹ para Cu, 2 mg L⁻¹ para Zn e 0,2 mg L⁻¹ para Cd e Pb. Além destas, no desenvolvimento da otimização foram preparadas soluções mistas, com diferentes concentrações.

O material de referência certificado Peach Leaves (SRM 1547) foi obtido comercialmente do National Institute of Standards and Technology (NIST, EUA, SpecSol).

A descontaminação das células voltamétricas foi realizada em solução de HNO₃ 20%. Antes de cada análise elas eram retiradas do banho ácido e lavadas com um excesso de água ultrapura. Todos os utensílios e vidrarias foram mantidos em solução ácida de HNO₃ 10% e enxaguados com água ultrapura antes do uso. O eletrólito foi preparado pela mistura de 55,5 mL de ácido acético glacial 99,7% e 37 mL de hidróxido de amônio 30% em 300 mL de água ultra-pura.

A amostra de macroalga verde (*Porphyra endiviifolia*) utilizada neste trabalho foi fornecida pelo Laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção (LAHBBio) do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas.

4.3 Métodos de preparo de amostra

Foram testadas três formas de preparo de amostra: micro-ondas, bloco digestor e radiação UV. Cabe salientar que todos os procedimentos foram executados em triplicata e estão descritos a seguir.

4.3.1 Micro-ondas

Para as mineralizações das amostras por micro-ondas, foram escolhidos dois métodos: (método A) indicado pelo fabricante do equipamento e (método B) publicado na literatura (MEEPUN, SIRIKET e DEJMANEE, 2012).

No método A, foram utilizados 500 mg de biomassa, 8 mL de HNO₃ 65% e 2 mL de HCl 37 %. O programa de aquecimento utilizado foi: rampa de 15 minutos, para chegar a 200 °C, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos, numa pressão de 800 psi e potência de 1600 W. No método B foram utilizadas 200 mg de amostra e 5 mL de HNO₃ 65%. O programa de aquecimento foi feito com 1 min a 250 W, 2 min a 0 W, 5 min a 250 W, 5 min a 400 W e por fim 5 min a 600 W. Após as mineralizações, os volumes das amostras digeridas foram aferidos a 10 mL e as amostras armazenadas em tubos tipo falcon e mantidas refrigeradas a 5 °C.

4.3.2 Bloco Digestor

O método de mineralização via bloco digestor utilizado neste trabalho e classificado como método C foi o EPA 3050 B (TAMAYO e colaboradores, 2014). Para este procedimento foram utilizados 1 g da amostra, 10 mL de HNO₃ 65% e 3 mL de H₂O₂ 30 %. As amostras foram mantidas no sistema a 100 °C por um tempo aproximado de 13 horas, até não serem mais emitidos vapores nitrosos. Em seguida, os volumes das amostras digeridas foram aferidos a 50 mL, armazenadas em tubos tipo falcon e mantidas refrigeradas a 5 °C.

4.3.3 Digestor UV

Para o método de mineralização por radiação UV classificado como método D, foram utilizados 0,1 g da amostra, 10 mL de água ultra-pura, 100 µL de H₂SO₄ concentrado e 100 µL de H₂O₂ 30 %. As amostras foram mantidas no sistema a 80 °C durante um tempo aproximado de 10 horas para completa remoção de matéria orgânica, a cada hora foram adicionados 50 µL de H₂O₂. Em seguida, os volumes das amostras digeridas foram aferidos a 20 mL, armazenadas em tubos tipo falcon e mantidas refrigeradas a 5 °C (WIETHAN, 2014).

4.4 Procedimentos Analíticos

4.4.1 Determinação por GF AAS

O método de absorção atômica com forno de grafite foi utilizado como comparativo ao método voltamétrico otimizado nesse trabalho. Os elementos foram determinados por atomização eletrotérmica em forno de grafite com modo de aquecimento transversal, utilizando argônio como gás de fluxo interno (argônio 99,0% v v⁻¹, White Martins, Brasil), em comprimentos de onda de 213,9; 228,8; 244,8 e 324,7 nm para Zn, Cr, Pb e Cu, respectivamente.

Para obtenção da curva de regressão linear, foram feitas análises de soluções padrão em gradiente de concentração por padronização externa. Com o intuito de minimizar os erros esses padrões foram preparados diariamente. As concentrações da curva de calibração foram para Zn de 0,2 a 2,0 µg L⁻¹, Cd de 0,6 a 4,0 µg L⁻¹, para Pb de 3,0 a 20 µg L⁻¹ e para Cu de 5 a 30 µg L⁻¹. Para todas as análises foram pipetados 20 µL de amostra e para as análises de Pb foram adicionalmente pipetados 2 µL do modificador de matriz universal Mg(NO₃)₂ + Pd(NO₃)₂ (1:1).

Os programas de temperatura utilizados para as análises estão especificados nas Tabelas de 1 a 4.

TABELA 1- Programa de tempo e temperatura do forno de grafite para a análise do Zn

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)
Secagem 1	85	5	5
Secagem 2	90	7	10
Secagem 3	120	7	20
Pirólise	700	100	10
Atomização	1900	2000	3
Limpeza	2000	500	3

TABELA 2- Programa de tempo e temperatura do forno de grafite para a análise do Cd

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)
Secagem 1	90	5	7
Secagem 2	110	5	7
Secagem 3	130	5	10
Pirólise	550	6	10
Atomização	1500	0	4
Limpeza	1600	1	3

TABELA 3- Programa de tempo e temperatura do forno de grafite para a análise do Pb, utilizando modificador universal

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)
Secagem 1	100	10	30
Secagem 2	130	5	10
Pirólise	400	5	10
Atomização	1900	0	5
Limpeza	2500	1	3

TABELA 4- Programa de tempo e temperatura do forno de grafite para a análise do Cu

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Patamar (s)
Secagem 1	90	10	5
Secagem 2	110	5	5
Secagem 3	130	5	5
Pirólise	1200	20	10
Atomização	2100	0	5
Limpeza	2450	1	4

4.4.2 Parâmetros avaliados na determinação voltamétrica

Foram avaliados diferentes parâmetros em dois métodos voltamétricos. Para o método de DPV foram avaliados frente às respostas voltamétricas: os efeitos do eletrólito (HNO₃ e eletrólito), pH (de 2 a 12), potencial de deposição (de -1 a -1,4 V) e velocidade de varredura (de 2 a 40 mV s⁻¹). Para o método de SWV foram avaliadas a frequência (de 1 a 30 Hz) e a amplitude (de 0,01 a 0,06 V). Em ambos casos, a integração se deu pela área dos picos.

4.4.3 Determinação por Voltametria

Após as células terem sido tiradas do banho ácido foram lavadas com excesso de água ultra-pura. Foram pipetados para a célula 7 mL de água ultrapura, 3 mL do eletrólito (pH 4) e 100 µL de amostra. Essa mistura foi desaerada com gás N₂ de alta pureza (99,8 %) por 300 s e a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu foi realizada por SWV.

Os parâmetros voltamétricos utilizados foram: E_{deposição} = -1,2 V, E_{inicial} = -1,1 V, E_{step} = 0,005 V, E_{final} = 0,3 V, t_{dep} = 420 s, amplitude = 0,04 V e frequência = 30 Hz. Para a calibração por adição do padrão foram realizadas adições sucessivas de 50µL de uma solução trabalho mista dos quatro elementos de interesse com concentrações de 0,2 mg L⁻¹ para Cd e Pb, 2 mg L⁻¹ para Cu e 1,6 mg L⁻¹ para Zn. Cabe salientar que as faixas lineares de concentração dos compostos na célula voltamétrica eram de 1 a 3 µg L⁻¹ de Cd e Pb, 10 a 30 µg L⁻¹ de Cu e 8 a 24 µg L⁻¹ de Zn.

4.5 Avaliação do efeito matriz

Para avaliação do efeito matriz foi usada a seguinte equação (1):

$$EM = \frac{\textit{inclinação X1} - \textit{inclinação X2}}{\textit{inclinação X2}} \times 100 \quad (\textit{equação 1})$$

Onde:

EM= efeito matriz

x₁= inclinação obtida da equação da faixa linear da amostra ou do SRM.

x₂= inclinação obtida da equação da faixa linear do branco.

4.6 Determinações de carbono total e inorgânico

O equipamento utilizado neste trabalho foi modelo TOC - VCPH, acoplado ao módulo de amostras sólidas, modelo SSM – 5000A, marca SHIMADZU com detector de combustão. O CO₂ produzido, tanto na oxidação catalítica como proveniente de carbono inorgânico, é quantificado por absorção no infravermelho não dispersivo.

A determinação Carbono Orgânico Total (COT) foi realizada pelo método indireto, combinando reações de acidificação e de oxidação química para análise de Carbono Inorgânico (CI) e Carbono Total (CT), respectivamente. O CT foi determinado pela oxidação do carbono orgânico e inorgânico da amostra a CO_2 , quando a amostra injetada é carreada para um tubo de combustão a 680°C contendo um catalisador misto de cobalto e platina que garante a completa conversão para CO_2 . Em uma segunda etapa, a determinação do CI foi realizada pela acidificação, com ácido fosfórico, e aquecimento da amostra a 200°C , levando a liberação de CO_2 proveniente do carbono inorgânico – carbonatos e carbonatos hidrogenados – que é levado ao detector. Por diferença do CT e CI calcula-se o valor do COT das amostras. A concentração de CT e CI são obtidas por interpolação utilizando curvas analíticas (área do pico x concentração) feitas previamente por injeção de padrões.

Carbono Total: para a determinação das quantidades de carbono total, utilizou-se como solução estoque o biftalato de potássio (1000 mg C L^{-1}). A partir da solução estoque, foi realizada uma solução trabalho de 100 mg C L^{-1} e, a partir desta, uma curva de calibração $0,5$ a 20 mg L^{-1} . Carbono Inorgânico: para a determinação das quantidades de carbono total, utilizou-se como solução estoque a mistura de bicarbonato de sódio e carbonato de sódio (1000 mg C L^{-1}). A partir da solução estoque, foi realizada uma solução trabalho de 50 mg C L^{-1} e, a partir desta, uma curva de calibração de $0,1$ a 5 mg L^{-1} .

4.7 Validação do método voltamétrico

Para avaliação do desempenho dos procedimentos de análise foram verificados parâmetros analíticos como LD, LQ, exatidão, precisão e faixa linear. O LD e LQ foram calculados usando as equações 2 e 3, respectivamente (Skoog , Holler e Nieman, 2002).

$$\text{LD} = \frac{3s}{S} \quad (\text{equação 2})$$

$$\text{LQ} = \frac{10s}{S} \quad (\text{equação 3})$$

Onde:

s = Desvio padrão referente a 10 leituras do branco.

S = Inclinação das respectivas retas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Otimização dos métodos voltamétricos

Com a finalidade de se obter as melhores condições no que se refere à sensibilidade na determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu por ASV na macroalga em estudo, foram otimizados dois métodos voltamétricos : pulso diferencial e onda quadrada.

No primeiro método, utilizou-se a DPV. Os parâmetros avaliados para este método foram: influência do pH no deslocamento dos potenciais, influência do potencial de deposição e efeito da velocidade de varredura. O segundo método utilizado foi à SWV e, neste caso, os parâmetros avaliados foram amplitude, frequência e faixa linear.

5.1.1 Método de pulso diferencial

5.1.1.1 Avaliação do efeito do pH

A ASV é usada para determinar baixas concentrações de Zn, Cu, Pb e Cd simultaneamente, porém o pH é um dos parâmetros importantes para se obter boa intensidade e resolução dos sinais.

Usando eletrólito com pH de 2 a 6, Mahezar e colaboradores (2010) determinaram Zn, Cd, Pb e Cu em ração de frango por ASV. Neste trabalho, os autores observaram que a intensidade dos sinais para os quatro elementos aumentou até pH 5 e acima deste valor as intensidades diminuíram. Entretanto, os pesquisadores não relatam se realizaram testes com pH acima de 6.

Shahbazi e colaboradores (2016) afirmam que na determinação dos mesmos compostos em tampão fosfato, as melhores intensidades de corrente foram obtidas em pH 6, sendo que, para o Cu, esses autores relatam que as correntes continuaram aumentando até pH 9,5.

Levando-se em consideração essas informações, neste trabalho foram realizadas avaliações de deslocamento de potencial e aumento de corrente para os referidos compostos, utilizando-se eletrólito, com valores de pH entre 2 e 12 (com incrementos de 2).

Para valores de pH entre 2 e 8, foi utilizada uma janela de potencial de -1,1 a 0,2 V e potencial de deposição de -1,1 V. Para o experimento com pH 10, a janela de potencial foi

ampliada no sentido mais catódico, ficando com intervalo de -1,3 a 0,2 V (potencial de deposição de -1,3 V). Para pH 12 foi preciso ampliar mais catodicamente a janela de potencial, ficando com um intervalo de -1,5 a 0,2 V (potencial de deposição de -1,5 V).

Essas alterações da janela útil de trabalho foram necessárias, tendo em vista que em regiões mais negativas de potencial, ocorre a redução de H_2 (BRET, 1996). Como pode ser observado na Figura 1, com o aumento do pH, os potenciais de oxidação dos quatro elementos deslocaram em sentido catódico de potencial, sendo este deslocamento mais pronunciado em valores de pH acima de 6 para Cu, acima de 8 para Cd e Zn e acima de 10 para Pb.

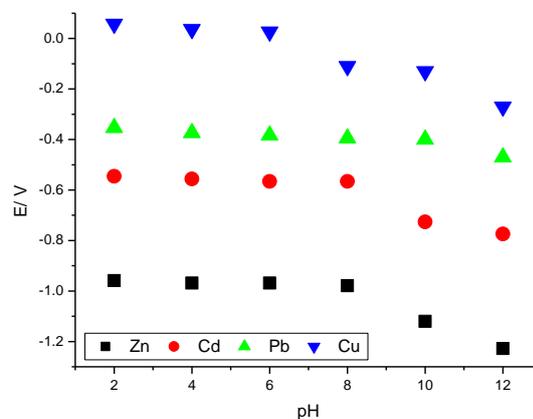


FIGURA 1- Variação dos potenciais de oxidação em função do pH ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e Pb). Condições experimentais: $t_{\text{dep.}} = 30 \text{ s}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Pode-se também observar que à medida que o meio tornava-se mais alcalino, ocorreu a diminuição das intensidades de correntes dos analitos, corroborando assim, com o descrito na literatura (MAHEZAR e colaboradores, 2010).

Uma vez que as mesmas condições de potencial de deposição foram utilizadas para as análises entre valores de pH 2 a 8, na Figura 2 estão demonstradas as variações da intensidade das correntes para os analitos, nestes valores de pH.

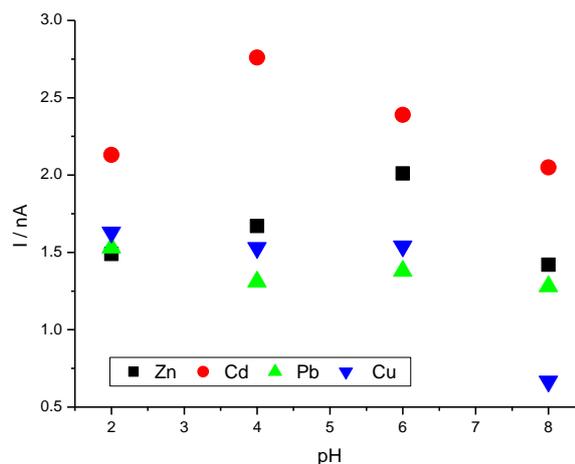


FIGURA 2- Variação dos valores de correntes em função do pH ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e Pb). Condições experimentais: $E_{\text{inicial}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, $t_{\text{dep}}: 30 \text{ s}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Tendo em vista o que está demonstrado nas Figuras 1 e 2, e sabendo que o pH irá afetar na separação entre os analitos de interesse (boa resolução) e na intensidade dos sinais (o que irá afetar diretamente na sensibilidade do método), neste trabalho, definiu-se que o pH 4 será utilizado para todos os experimentos, pois apresentou melhor resposta para a maioria dos compostos estudados. Sendo assim, a partir daqui a janela de potenciais utilizada foi de $-1,1 \text{ V}$ a $0,2 \text{ V}$.

5.1.1.2 Avaliação do efeito do potencial de deposição

Um dos fatores que influencia na intensidade das correntes para a quantificação de analitos é o potencial de deposição, pois com diferentes potenciais de deposição aplicados em determinado intervalo de tempo, obtêm-se diferentes valores de correntes de pico. Para a avaliação da influência do potencial de deposição na intensidade das correntes dos quatro elementos em estudo, foram utilizados potenciais de -1 , $-1,1$, $-1,2$, $-1,3$ e $-1,4 \text{ V}$ e os resultados estão demonstrados na Figura 3.

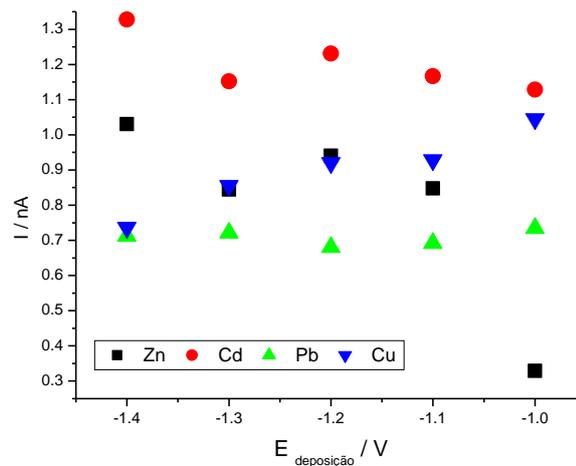


FIGURA 3- Valores de intensidade das correntes em função do potencial de deposição aplicado ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu e $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e Pb em eletrólito pH 4). Condições experimentais: $t_{\text{dep}}: 30 \text{ s}$, $E_{\text{inicial}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

Como pode ser observado, com potencial de deposição de $-1,4 \text{ V}$, os sinais são mais intensos para Zn e Cd, porém para o Cu foi o potencial que apresentou a menor intensidade de corrente. Quando potenciais mais anódicos foram aplicados, as intensidades de corrente do Cu aumentaram. Com potencial de $-1,3 \text{ V}$ a intensidade das correntes para Zn e Cd diminuíram e ocorreu um aumento de intensidade para Cu. O potencial de $-1,2 \text{ V}$ apresentou, entre os potenciais estudados, uma boa intensidade de correntes de pico entre os quatro elementos, embora, para Zn e Cd, as intensidades de correntes tenham sido menores que em potencial de $-1,4 \text{ V}$. Já o potencial de $-1,1 \text{ V}$ apresentou correntes inferiores que $-1,2 \text{ V}$ para Zn e Cd. De todos os potenciais estudados, o de $-1,0$ foi o que apresentou a menor intensidade de corrente para Zn, pois esse potencial é muito próximo do potencial de oxidação do Zn. Sendo assim o potencial utilizado para os demais experimentos foi $-1,2 \text{ V}$.

5.1.1.3 Avaliação do efeito da velocidade de varredura

A velocidade de varredura é um dos parâmetros importantes a ser estudado, uma vez que tem relação direta, tanto com a resolução, quanto com as intensidades de correntes (ALEIXO, 2003).

Neste trabalho, foram realizados experimentos com variação da velocidade de varredura entre 2 a 20 mV s^{-1} (com incrementos de 2 mV s^{-1}), e nas velocidades de 30 e 40 mV s^{-1} . Na

Figura 4 estão demonstradas as variações de intensidades de correntes para a variação de velocidade de 2 a 20 mV s^{-1} e em 30 e 40 mV s^{-1} .

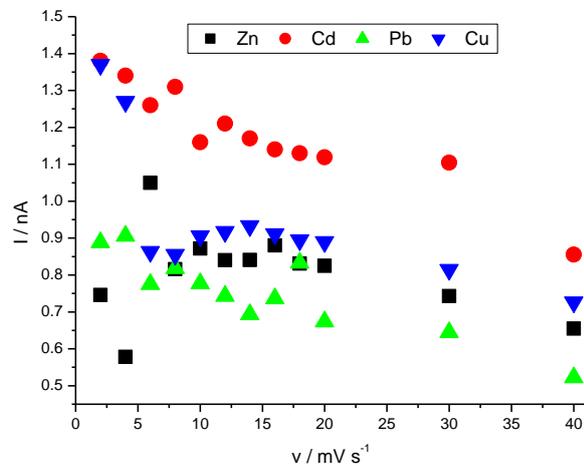


FIGURA 4- Variação da corrente em função da velocidade de varredura ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu e $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e Pb em eletrólito pH 4). Condições experimentais: t_{dep} : 30 s, $E_{\text{dep}} = -1,2 \text{ V}$, $E_{\text{inicial}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, $v = 2$ a 40 mV s^{-1} .

Com estes experimentos pode-se observar que velocidades menores que 20 mV s^{-1} apresentaram maiores valores de intensidade de corrente para os quatro elementos de interesse. Entretanto, a resolução entre os sinais ficou comprometida.

Quando foi utilizada a velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} , tanto a intensidade dos sinais quanto as resoluções foram boas. Acima desta velocidade, foi testado com 30 e 40 mV s^{-1} , como mostrado na Figura 4, porém a intensidade das correntes foi menor do que com 20 mV s^{-1} . Assim, a velocidade de varredura utilizada a partir daqui foi de 20 mV s^{-1} .

5.1.2 Método voltamétrico de onda quadrada

5.1.2.1 Avaliação do efeito da frequência

Com o intuito de melhorar a intensidade dos sinais e, conseqüentemente a sensibilidade do método, foram realizados experimentos variando a frequências de 1 a 30 Hz (com incrementos de 5 Hz). Esses resultados estão demonstrados na Figura 5.

Neste experimento, foi fixado o valor de amplitude em 0,02 V. Uma vez que a alteração da frequência e amplitude ocasionam variação na velocidade de varredura. Cabe salientar que, para as frequências de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 Hz, as varreduras ocorreram em velocidades de 5, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mV s^{-1} , respectivamente.

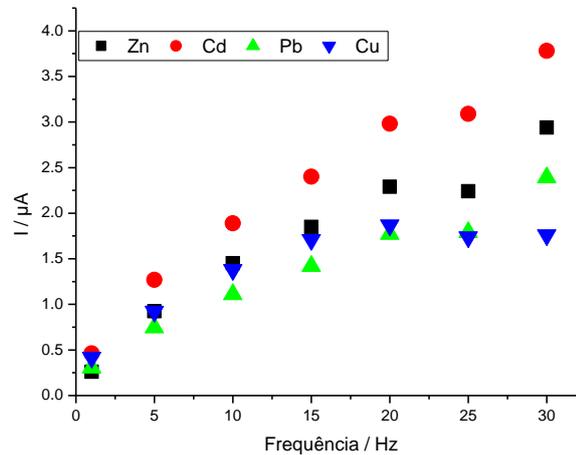


FIGURA 5- Variação da intensidade de corrente frente à variação da frequência ($1,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu e $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e Pb em eletrólito pH 4). Condições experimentais: $E_{\text{dep}} = -1,2 \text{ V}$, $E_{\text{inicial}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$.

Como pode ser observado na Figura 5, as intensidades dos sinais aumentam com o aumento da frequência. Quando foi utilizada a frequência de 30 Hz, foram obtidos os maiores valores de corrente com exceção para Cu, que a partir de 25 Hz, começou a oxidar em potenciais mais positivos, sobrepondo parcialmente no Hg, dificultando assim a integração do pico referente ao Cu. Devido a este deslocamento de potencial do Cu, no sentido anódico, não foram feitos experimentos com frequências maiores que 30 Hz.

Considerando estas condições e tendo fixado o valor de amplitude em 0,02 V, foi possível afirmar que a frequência de 20 Hz foi a melhor, pois apresentou boa resolução e alta intensidade dos sinais para os quatro elementos. Entretanto, tendo em vista os contínuos aumentos nos valores de corrente para Zn, Cd e Pb, quando foi utilizada a frequência de 30 Hz, nos estudos seguintes foram avaliadas as influências do efeito da amplitude com ambas frequências (20 e 30 Hz).

5.1.2.2 Avaliação do efeito da amplitude

Elevados valores de amplitude de pulso proporcionam um aumento na intensidade das correntes de pico, porém este aumento da amplitude pode ocasionar alargamento dos picos, prejudicando a resolução dos sinais (ALEIXO, 2003).

Neste trabalho, foram realizados experimentos utilizando-se frequência de 20 e 30 Hz, com variações de amplitude de 0,01 a 0,06 V (com incrementos de 0,01 V). Os resultados destes experimentos podem ser observados na Figura 6.

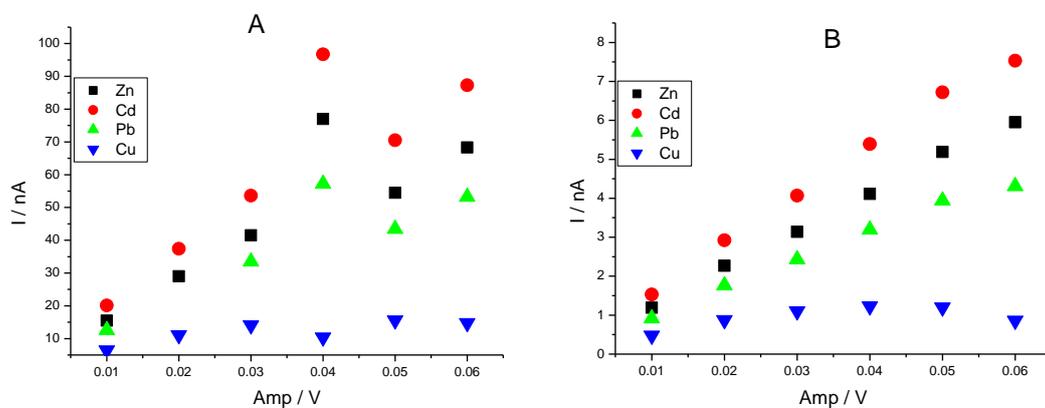


FIGURA 6- Variação da intensidade das correntes para os quatro elementos ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e Cu e $0,24 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd e Pb em eletrólito pH 4) com diferentes valores de amplitude e frequência de 30 Hz (A) e 20 Hz (B). Condições experimentais: $E_{\text{dep}} = -1,2 \text{ V}$, $E_{\text{inicial.}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, $t_{\text{dep.}} = 30 \text{ s}$.

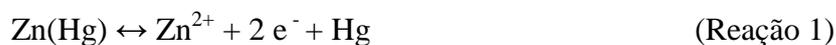
Com essas alterações entre frequência e amplitude, foi possível perceber variações interessantes entre os valores de correntes e a resolução entre os picos. Como pode ser observado na figura 7A, fixando-se a frequência em 30 Hz e variando as amplitudes de 0,01 a 0,04 V, houve um incremento na intensidade das correntes e boa resolução entre os sinais (não mostrada aqui) para os quatro elementos (com exceção do Cu que em amplitude 0,04 V apresentou uma diminuição dos valores de corrente). Para o Cu, a maior intensidade de corrente foi obtida com 0,03 V.

No experimento em que a frequência foi fixada em 20 Hz Figura (6B), houve aumento na intensidade das correntes com os incrementos da amplitude estudados (com exceção do Cu). Entretanto, todos os valores de correntes deste foram inferiores às correntes do experimento com 30 Hz. Esse foi o motivo pelo qual não se usou a frequência de 20 Hz nos experimentos seguintes.

As alterações de intensidade das correntes obtidas nestes experimentos podem ter ocorrido devido à diferença de velocidade de varredura entre as duas configurações, pois com a frequência de 30 Hz, tem-se uma velocidade de 150 mV s^{-1} , enquanto com a frequência de 20 Hz, tem-se uma velocidade de 100 mV s^{-1} . Sendo assim, para dar continuidade na otimização, foi escolhida a amplitude de 0,04 V e frequência de 30 Hz.

Adicionalmente, nos dois experimentos, houve sobreposição parcial dos sinais de Cd e Pb a partir da amplitude de 0,05 V e o potencial de oxidação do Cu deslocou-se em sentido anódico, sobrepondo parcialmente o pico de oxidação do Hg.

Diferentes valores de amplitude de pulso são utilizados para análises voltamétricas por onda quadrada. Segundo Aleixo (2003), amplitudes próximas de 0,025 V são ideais para sistemas com transferência de um elétron e, amplitudes próximas de 0,05 V são ideais para sistemas com transferência de dois elétrons (ALEIXO, 2003). Dentre os valores de amplitudes avaliadas em nossos experimentos, a de 0,04 V foi a que demonstrou os melhores resultados e isso corrobora a relação descrita por Aleixo, pois as reações entre Zn, Cd, Pb e Cu com Hg (demonstradas as seguir como Reações 1, 2, 3 e 4, respectivamente) mostram que nesses casos há a transferência de 2 elétrons.



5.1.3 Comparação entre pulso diferencial e onda quadrada

Tendo em vista a otimização descrita até o presente momento e objetivando comparar os métodos de DPV e SWV, foram aplicados à mesma composição de célula nas condições voltamétricas que estão descritas na Tabela 5.

TABELA 5- Parâmetros utilizados para pulso diferencial e onda quadrada

Parâmetros	DPV	SWV
$E_{\text{deposição}} / \text{V}$	-1,2	-1,2
$t_{\text{deposição}} / \text{s}$	30	30
$E_{\text{inicial}} / \text{V}$	-1,1	-1,1
$E_{\text{final}} / \text{V}$	0,3	0,3
$E_{\text{step}} / \text{V}$	0,01	0,005
Amplitude / V	0,005	0,04
Intervalo de tempo / s	0,5	0,0333
Velocidade / mV s^{-1}	20	150
Frequência / Hz	-	30

Na Figura 7 estão demonstrados os voltamogramas obtidos através dos dois métodos utilizados e na Figura 8 estão demonstrados pelos gráficos das curvas de regressão linear as diferenças de sensibilidade com base na comparação entre os coeficientes de inclinação para cada elemento entre os métodos DPV e SWV.

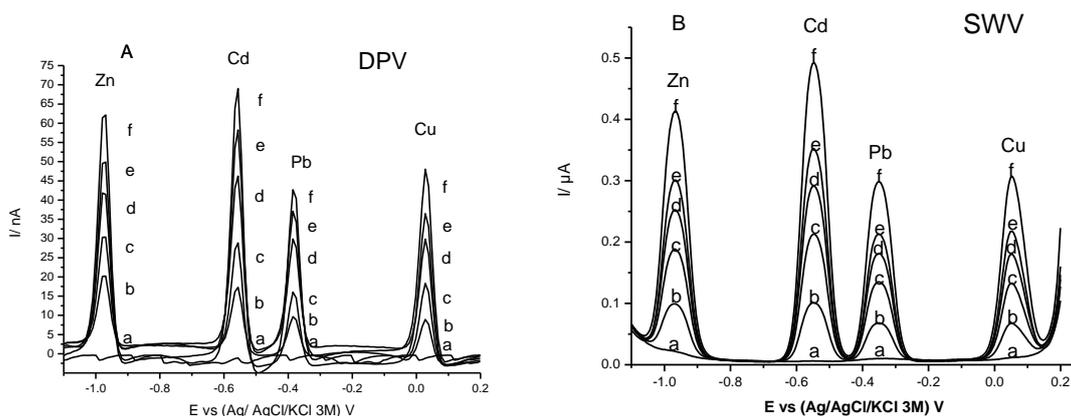


FIGURA 7- Voltamogramas obtidos com o método (A) DPV e (B) SWV. Condições experimentais: $E_{\text{dep}} = -1,2 \text{ V}$, $E_{\text{inicial}} = -1,1 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = 0,3 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 30 \text{ s}$. Curvas = Zn e Cu: a- eletrólito ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,3 \text{ mol L}^{-1} / \text{NH}_4\text{OH } 0,09 \text{ mol L}^{-1}$), b-f de 20 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, Cd e Pb: a- eletrólito ($\text{CH}_3\text{COOH } 0,3 \text{ mol L}^{-1} / \text{NH}_4\text{OH } 0,09 \text{ mol L}^{-1}$), b-f de 40 a $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

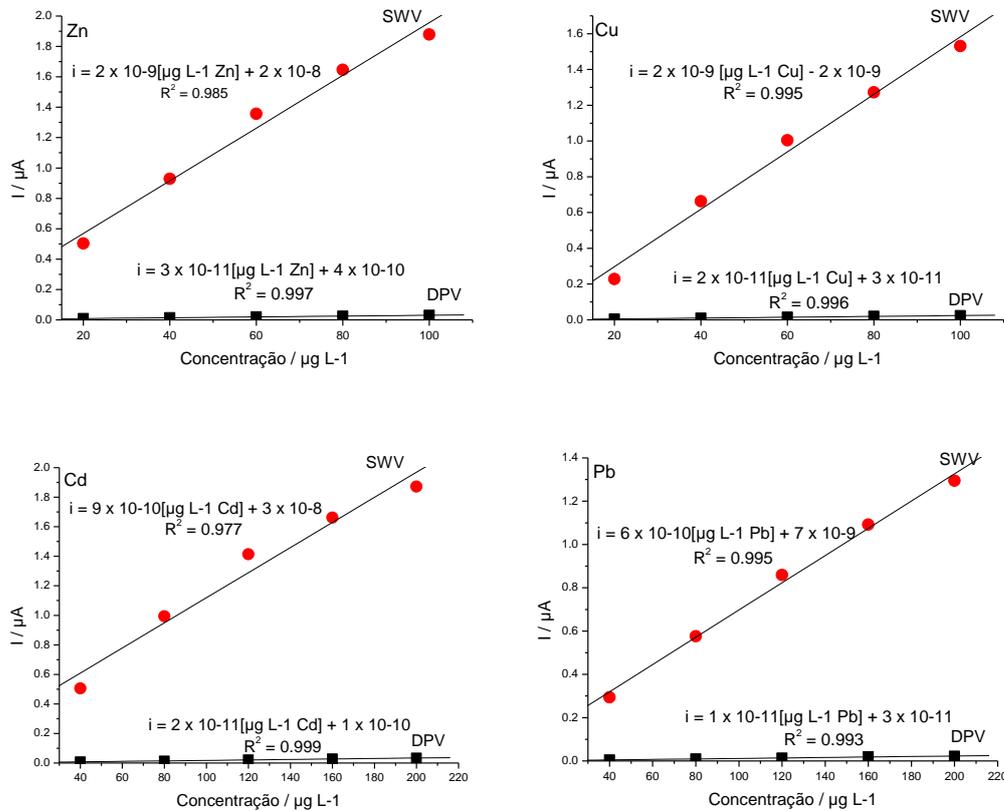


FIGURA 8 - Gráficos das curvas de regressão linear obtidas por DPV e SWV. Curvas (intensidade de corrente *versus* concentração= Zn e Cu: de 20 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, Cd e Pb: de 40 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Segundo Skoog, Holler e Nieman, (2002), a diferença de sensibilidade entre dois métodos para análise de um analito em uma matriz comum pode ser descoberta pela diferença do coeficiente angular das equações lineares obtida para cada método. O método que fornecer uma reta com maior coeficiente angular será o método mais sensível. Esta diferença de sensibilidade pode ser observada nos coeficientes angulares demonstrados na Figura 8. As inclinações das curvas obtidas por SWV foram da ordem de 10 (para Cd e Pb) e 100 (para Zn e Cu) vezes maiores que as obtidas por DPV.

Segundo Souza e colaboradores, (2003) a SWV é uma técnica de pulso que tem como vantagem a execução da varredura com elevada velocidade. Isso proporciona uma melhora da sensibilidade da técnica, pois a corrente faradaica é obtida em um intervalo de tempo adequado que leva a uma redução da corrente capacitiva, minimizando ruídos. Isso pode ser observado na Figura 8. A partir destes experimentos pode ser observado que nas condições

deste estudo, o método de onda quadrada por ser algumas ordens de grandeza mais sensível, foi o método escolhido para o restante do trabalho.

5.1.4 Avaliação do volume de eletrólito na determinação voltamétrica

Segundo Agostinho e colaboradores, (2004) um eletrólito suporte precisa ser estável na solução em estudo, não reagindo com outras espécies em solução, além de não sofrer hidrólise e nem formar complexos com os íons em solução. Diante da importância desta solução na análise voltamétrica, julgou-se imprescindível um estudo sobre a influência da concentração de eletrólito na determinação voltamétrica. Para tal, foram feitos testes com três concentrações, como demonstrados na Tabela 6.

TABELA 6 - Coeficientes angulares obtidos a partir de curvas analíticas para diferentes volumes de eletrólito utilizados

Metais	Coeficientes angulares para diferentes concentrações de eletrólito		
	CH ₃ COOH 0,2 mol L ⁻¹ / NH ₄ OH 0,06 mol L ⁻¹	CH ₃ COOH 0,3 mol L ⁻¹ / NH ₄ OH 0,09 mol L ⁻¹	CH ₃ COOH 0,4 mol L ⁻¹ / NH ₄ OH 0,12 mol L ⁻¹
Zn	6,86 x 10 ⁻⁰⁹	6,02 x 10 ⁻⁰⁹	4,72 x 10 ⁻⁰⁹
Cd	3,96 x 10 ⁻⁰⁹	4,07 x 10 ⁻⁰⁹	3,55 x 10 ⁻⁰⁹
Pb	2,21 x 10 ⁻⁰⁹	2,23 x 10 ⁻⁰⁹	2,04 x 10 ⁻⁰⁹
Cu	7,56 x 10 ⁻⁰⁹	4,82 x 10 ⁻⁰⁹	4,81 x 10 ⁻⁰⁹

Como pode ser observado na Tabela 6, as maiores inclinações nas curvas de Zn e Cu foram obtidas para 2 mL de eletrólito e para Cd e Pb com 3 mL de eletrólito. Entretanto, em teste inicial com a amostra, após o processo de mineralização ácida, pode-se observar que com a adição de 100µL da amostra na célula, o uso de 2 mL de eletrólito não foi suficiente para manter o meio em pH 4. Entretanto, quando se usou 3 mL do eletrólito, o pH do meio permaneceu em 4 para todas as mineralizações realizadas nesse trabalho. Levando-se isso em consideração optou-se por utilizar 3 mL da solução nas análises seguintes.

5.2 Testes preliminares com a amostra e SRM

Uma vez que neste trabalho foram utilizados dois métodos de digestão por micro-ondas com diferentes intensidades de potência e diferentes composições dos reagentes oxidantes (Método A: mistura de ácido nítrico e clorídrico, com potência e temperatura máximas de 1600 W e 200° C respectivamente. Método B: ácido nítrico, com potência e temperaturas máximas de 600 W e 180° C, respectivamente), assim como um método por aquecimento com bloco digestor convencional (Método C: mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio a 100 °C) e outro com radiação UV (Método D: mistura de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio a 80 °C), foram avaliados os efeitos de matriz para cada um dos analitos nas determinações voltamétricas. Na Tabela 7 estão os resultados em porcentagem do efeito matriz da amostra e do SRM para cada método de mineralização.

TABELA 7- Valores de efeito da matriz para Zn, Cd, Pb e Cu na macroalga e SRM após as mineralizações via bloco, radiação UV e micro-ondas

Método	Matriz	Analito / Efeito Matriz (%)			
		Zn	Cd	Pb	Cu
Método A	Macroalga	-15,14	-4,01	-24,63	66,66
	SRM	-23,24	-14,56	-22,46	41,24
Método B	Macroalga	-28,44	-91,47	-18,22	-9,93
	SRM	-44,51	-95,8	-30,12	-21,65
Método C	Macroalga	-34,45	-17,49	-23,17	-9,53
	SRM	-39,58	-23,53	-8,71	-9,81
Método D	Macroalga	-12,12	-5,49	-4,91	-6,9
	SRM	-12,12	-6,81	-8,60	-6,26

Segundo Economou e colaboradores, (2009) valores de efeito matriz entre -20 e +20 % são considerados um baixo efeito matriz, valores entre -50 e -20 % ou +20 e +50 % consideram-se um efeito médio. Para valores abaixo de -50 ou acima de + 50% interpreta-se como um alto efeito matriz. Levando-se isto em consideração, pode-se inferir que o efeito de matriz para a amostra no método A é baixo para Zn e Cd, médio para Pb e alto para Cu. No método B, o efeito matriz é baixo para Pb e Cu, médio para Zn e alto para Cd. No método C, o efeito matriz é baixo para Cd e Cu e médio para Zn e Pb. No método D, o efeito matriz foi baixo para todos os analitos em estudo.

Já para o SRM, o valor de efeito de matriz foi alto apenas para Cd, após a mineralização pelo método B. Valores de efeito matriz médio foram calculados para Zn, Pb e Cu após a mineralização pelo método A e B, assim como para Zn e Cd a partir da mineralização pelo método C.

Como pode ser observado, os métodos que fizeram uso de sistema aberto (métodos C e D) de maneira geral, apresentaram os menores efeitos de matriz. Isso já era esperado para o método D, uma vez que neste caso foi utilizada uma menor proporção de amostra/meio de mineralização (0,1 g/ 20 mL de solução), além da radiação UV que é conhecida por acelerar a degradação de matéria orgânica. De acordo com Labuda e colaboradores, (1994) o uso da

radiação UV diminui os efeitos de competição entre os metais e os compostos orgânicos como ácidos húmicos pela superfície do eletrodo, fazendo com que a determinação de Zn, Cd, Pb e Cu seja mais efetiva. Adicionalmente, para as mineralizações dos métodos C e D é utilizado H_2O_2 que é um forte agente oxidante (CAMPOS e colaboradores, 2001) e que possivelmente favoreceu a mineralização da amostra.

Diferente do método D, os métodos de mineralização A, B e C fizeram uso de HNO_3 e segundo Wurfels apud (Krug, p.51 2008), substâncias que possuem proteínas em sua composição, como é o caso das amostras em estudo, ao serem digeridas com ácido nítrico por micro-ondas, podem gerar ácidos benzoícos nitrificados como resíduo de matéria orgânica e este tipo de molécula é eletroquimicamente ativa e pode diminuir a sensibilidade de um método eletroquímico, além de poder aumentar o efeito de matriz na análise voltamétrica. Os três métodos que fizeram uso de HNO_3 neste trabalho, apresentaram valores de efeito de matriz elevados (Tabela 8) para macroalga e SRM em 3 experimentos (para amostra e SRM no método B - Cd; e para macroalga no método A - Cu) e médios em 12 experimentos. Segundo Krug, (2008), para a completa oxidação da matéria orgânica é necessário mineralização em condições mais extremas de tempo, temperatura e pressão, o que pode acarretar a diminuição da vida útil dos equipamentos.

Uma vez que as determinações analíticas podem ser influenciadas pela presença de matéria orgânica (KRUG, 2008) e sabendo-se que estes compostos orgânicos podem competir com os metais na superfície do eletrodo (CARVALHO e colaboradores, 2008), julgou-se necessário determinar as concentrações de CT, CI e CO na macroalga e no SRM, após cada procedimento de mineralização e os resultados estão demonstrados na Tabela 8.

TABELA 8- Valores de concentração (g L^{-1}) de carbono total, inorgânico e orgânico na macroalga e SRM após a as mineralizações por micro-ondas (métodos A e B), bloco (método C) e radiação UV (método D)

Método	Matriz	Concentração (g L^{-1})		
		Carbono Total	Carbono Orgânico	Carbono Inorgânico
Método A	Macroalga	3,30	3,30	n.d.
	SRM	1,38	1,38	n.d.
Método B	Macroalga	1,72	1,70	0,02
	SRM	2,03	2,03	n.d.
Método C	Macroalga	0,55	0,55	n.d.
	SRM	0,9	0,9	n.d.
Método D	Macroalga	0,02	0,02	n.d.
	SRM	0,03	0,03	n.d.

n.d = não detectado

Como pode ser visualizado na Tabela 8, os menores teores de carbono total foram obtidos após as mineralizações que fizeram uso de radiação UV (método D) e H_2O_2 (métodos C e D). Isto era esperado, pois estes procedimentos de mineralização apresentaram os menores efeitos de matriz (Tabela 7). Além disso, pode-se observar que independente do procedimento de mineralização utilizado para SRM, todo o CT está na forma de CO. No caso da macroalga, apenas a mineralização realizada pelo método B não apresentou esse comportamento. Nesse caso 1,2 % do carbono presente após mineralização estava na forma inorgânica.

É conhecido que grupamentos tióis (bases moles) tendem a formar complexos metálicos com elementos de raio atômico elevado, como Cd e Pb que são cátions moles; e bases duras (oxigênio) ou intermediárias (aminas) possuem maior afinidade com cátions duros ou intermediário, como Zn e Cu (VASCONCELOS, LEAL e VAN DEN BERG, 2002; VASCONCELOS e LEAL, 2001). Por mais que seja conhecido que compostos orgânicos presentes em macroalgas possuem em sua estrutura grupamentos tióis e nitrogenados (BIANCHI, 2007). Informações mais completas neste sentido não podem ser obtidas através

dos resultados aqui demonstrados, uma vez que não se conhece a natureza química na matéria orgânica dissolvida presente nas matrizes em estudo.

5.3 Parâmetros de validação

Concluída a etapa de otimização das condições para a determinação de Zn, Cd, Pb e Cu por SWV, procederam-se as avaliações de parâmetros de mérito. Neste trabalho os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: limites de detecção e quantificação (LD e LQ), recuperação e faixa linear. Na Tabela 9 estão os resultados calculados para LD e LQ e as respectivas faixas lineares para cada um dos analitos em estudo.

TABELA 9 - Valores determinados para limite de detecção, limite de quantificação e faixas lineares para Zn, Cd, Pb e Cu por SWV

Composto	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Zn	0,45	1,38	8 – 40
Cd	0,017	0,051	1 – 5
Pb	0,045	0,14	1 – 5
Cu	0,04	0,12	10 – 50

A exatidão do método foi avaliada através da análise do SRM (Peach Leaves – NIST 1547) em que os quatro procedimentos de mineralização foram aplicados e os resultados são apresentados na Tabela 10. Cabe salientar que as concentrações dos compostos no SRM são de: Zn $17,9 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, Cd $0,026 \pm 0,003 \mu\text{g g}^{-1}$, Pb $0,87 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu $3,7 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$. Tendo como base estas concentrações, avaliou-se o tempo de deposição necessário para a quantificação simultânea dos compostos na análise voltamétrica (com o SRM digerido pelo método A). Pode-se observar que com 420 s de deposição era possível quantificar todos os elementos.

TABELA 10 - Recuperações obtidas por SWV para amostra certificada (Peach Leaves – NIST 1547) após mineralização pelos métodos A, B, C e D

Método	Zn		Cd		Pb		Cu	
	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	17,99±0,22	100	0,030±0,003	115	0,77±0,01	88	2,95±0,02	78
B	16,50±0,34	92	0,022±0,002	85	0,70±0,02	80	3,18±0,07	86
C	18,86±1,94	105	< LQ	-	0,50±0,027	57	3,74±0,34	101
D	20,02±1,46	112	0,020±0,002	77	0,58±0,002	67	3,34±0,042	90

n=3

Como pode ser observado na Tabela 10, os métodos de mineralização que apresentaram resultados de recuperação aceitáveis para todos os analitos (entre 78 a 115%) foram os métodos considerados de sistema fechado (A e B). Estes métodos fizeram uso de radiação de microondas que é conhecida por acelerar a efetividade da mineralização em tempos relativamente mais curtos e fazendo uso de menores quantidades de reagentes (AGAZZI e PIROLA, 2000). Já os resultados obtidos pelos métodos que são considerados de sistema aberto (C e D), menores valores de recuperação foram obtidos, estando alguns desses valores abaixo (como os de Cd e Pb) do limite considerado aceitável (Ribani e colaboradores, 2012). Isto pode ter sido decorrente de uma decomposição incompleta da amostra uma vez que condições brandas de temperatura foram usadas.

Uma vez que o objetivo geral do trabalho foi propor um procedimento de preparo de amostra para determinação voltamétrica simultânea dos referidos elementos, e tendo em vista que os resultados dos métodos C e D não apresentaram limites aceitáveis para alguns analitos, define-se que os métodos A e B são os indicados para a mineralização da macroalga. Sendo assim, o GF AAS foi usado como método comparativo de análise, e os resultados obtidos para o SRM estão demonstrados na Tabela 11.

TABELA 11 - Recuperações obtidas por GF AAS para amostra certificada (Peach Leaves – NIST 1547) após mineralização pelos métodos A e B

Método	Zn		Cd		Pb		Cu	
	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Valor determinado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)
A	$18,06 \pm 0,53$	104	$0,02 \pm 0,03$	77	$0,60 \pm 0,02$	69	$3,73 \pm 0,16$	100
B	$16,21 \pm 0,31$	90	$0,02 \pm 0,004$	77	$0,68 \pm 0,01$	78	$4,24 \pm 0,06$	115

n=3

Como pode ser observado na Tabela 11, os valores de recuperação para os compostos estão dentro dos limites tidos como aceitáveis (exceto para Pb – método A). De uma maneira em geral, comparando-se os resultados obtidos entre as determinações pelas diferentes técnicas, pode-se observar que os valores de recuperação para Cd e Pb foram maiores por SWV do que por GF AAS, e o contrário se pode observar para Cu. Entretanto, aplicando-se a ferramenta estatística Teste Student ($p > 0,05$), pode-se observar que não há diferença significativa entre as técnicas instrumentais aplicadas para as determinações de Zn e Cd (método A e B) e para Pb (método B). Para Cu houve diferença significativa para os métodos A e B ($p = 0,001$) e para o Pb pelo método A ($p = 0,03$). É importante relatar que para as análises do SRM por GF AAS, os valores de desvio padrão relativo foram, na sua maioria, maiores que os obtidos por voltametria (valores de até 17,3%).

5.4. Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu na amostra

As quantificações dos compostos de interesse na amostra, após as mineralizações via métodos A e B, foram realizadas por SWV e GF AAS e os resultados obtidos em ambos métodos estão demonstrados na Tabela 12.

TABELA 12 – Valores de concentrações médias de Zn, Cd, Pb e Cu (mg kg^{-1}) quantificadas por SWV e GF AAS na macroalga

Composto	Técnicas de determinação	Métodos de mineralização / Concentração (mg kg^{-1})	
		A	B
Zn	SWV	$58,23 \pm 1,31$	$56,28 \pm 3,71$
	GF AAS	$49,33 \pm 2,57$	$46,95 \pm 2,84$
Cd	SWV	$2,66 \pm 0,13$	$3,11 \pm 0,16$
	GF AAS	$1,54 \pm 0,23$	$2,07 \pm 0,16$
Pb	SWV	$3,87 \pm 0,11$	$1,89 \pm 0,06$
	GF AAS	$1,54 \pm 0,19$	$0,78 \pm 0,20$
Cu	SWV	$52,38 \pm 1,08$	$46,13 \pm 0,96$
	GFAAS	$70,03 \pm 4,49$	$64,53 \pm 7,43$

n=3

Com os dados demonstrados na Tabela 12, pode-se observar que de maneira geral, os níveis de concentração determinados para Zn, Cd e Pb por SWV foram maiores do que por GF AAS. Em contrapartida, os níveis de concentração determinados para Cu sempre foram maiores por GF AAS do que por SWV. Aplicando-se a ferramenta estatística Teste Student pode-se observar que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre as técnicas instrumentais aplicadas para as determinações de Zn (método A e B). Entretanto, independente do método de mineralização aplicado, houve diferença significativa nas quantificações de Cd, Pb e Cu realizadas por SWV e GF AAS. É válido salientar que os valores de desvio padrão relativo obtidos para as determinações por SWV (valores de 2,2 a 6,6%) foram inferiores que os obtidos por GF AAS (valores de 5,2 a 25,9%).

Acredita-se que essas diferenças de valores de concentração, assim como de desvios padrão relativo, podem ser devido ao efeito de matriz não ser compensado nas análises realizadas por GF AAS (a curva de calibração foi preparada em água) além da provável incompatibilidade da técnica de preparo aqui empregada.

Outros resultados que corroboram com essa justificativa, são os valores de recuperação obtidos para o SRM por GF AAS (Tabela 11). Neste caso, quando o método A foi utilizado,

os valores de recuperações para Cd (77%) e Pb (69%) foram inferiores aos obtidos por SWV (115 e 88%, respectivamente). Quando o método B foi utilizado, pode-se observar semelhante comportamento, pois se obteve 77% de recuperação para Cd por GF AAS, enquanto que por SWV, obteve-se 85% e para Pb os valores de recuperação por GF AAS foram de 78%, enquanto que os obtidos por SWV foram de 80%. Para o Cu comportamento inverso foi observado. Os níveis de recuperação obtidos por GFAAS pelo método A foram de 100% e os obtidos por SWV foram de 78%, assim como as recuperações do método B por GF AAS foram de 115% enquanto que por SWV foi de 86%. Neste caso, os valores de desvio padrão relativo obtidos por SWV também foram inferiores (valores entre 0,7 a 10,6%) aos obtidos por GF AAS (valores de 1,5 a 17,3%).

Mesmo as técnicas de comparação não sendo significativamente iguais para Cd, Pb e Cu, pode-se observar que a análise estatística realizada na amostra digerida pelo método A, apresentou os melhores resultados ($p_{Cd}=0,01$, $p_{Pb}=0,004$, $p_{Cu} = 0,02$) em relação ao método B ($p_{Cd}=0,001$, $p_{Pb}=0,007$, $p_{Cu} = 0,01$).

Levando-se em consideração essas informações e a exatidão da quantificação voltamétrica dos compostos no SRM mineralizado via método A, acredita-se que este método é o mais apropriado para a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu. Na Figura 8, estão demonstrados os voltamogramas obtidos para a amostra após a mineralização pelos métodos A e B.

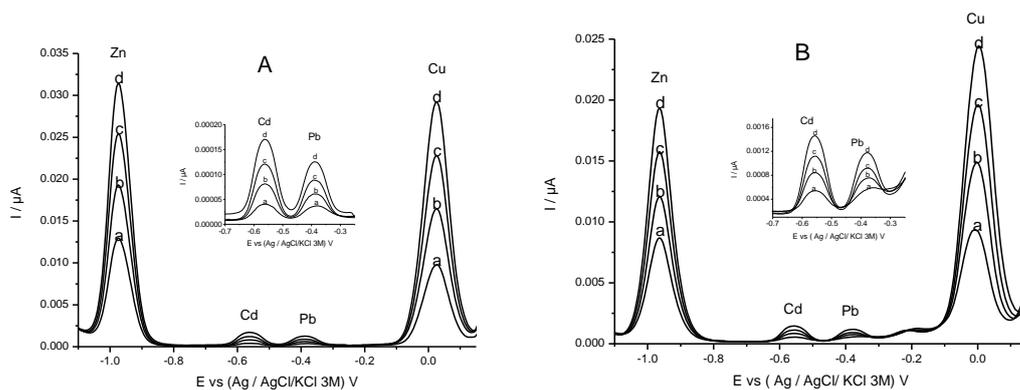


FIGURA 9- Voltamogramas obtidos por SWV após os métodos de mineralização A e B. Condições experimentais: pH = 4, $E_{dep} = -1,2$ V, $E_{inicial.} = -1,1$ V, $E_{final} = 0,3$ V, amplitude = 0,04 V, frequência = 30 Hz, $t_{dep} = 420$ s. Curvas = Zn: a-amostra, b-d de 8 a 24 $\mu\text{g L}^{-1}$, Cd e Pb: a-amostra, b-d de 1 a 3 $\mu\text{g L}^{-1}$, Cu: a-amostra, b-d de 10 a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Por mais que o intuito deste trabalho não seja a quantificação dos compostos na amostra e sim a proposição de procedimento de determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu por voltametria, pode-se observar que os compostos majoritários presentes na amostra são Zn e Cu e os minoritários são Cd e Pb. Essas diferenças de ordem de grandeza de concentração são esperadas, uma vez que os níveis de concentração que constam em alguns trabalhos reportados na literatura, corroboram com os aqui demonstrados (Caliceti e colaboradores, 2001; Stegel e colaboradores, 2004) e estes níveis podem ter relação direta com o local de coleta e a espécie do organismo em estudo (Chacrabort e colaboradores, 2014; Akcali e Kucuksezgin, 2011; Papa, Casoria e Guida, 2008).

6. CONCLUSÕES

Tendo conhecimento da importância do preparo de amostra, este trabalho propõem a avaliação de método adequado para a determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu em macroalga por voltametria. O estudo da concentração de carbono total, carbono orgânico e carbono inorgânico, junto com a avaliação do efeito matriz para amostra e material de referência certificado, mostraram que diferentes formas de mineralização apresentam distintas capacidades para decomposição da matriz. Dentre os procedimentos de mineralização apresentados, os que fizeram uso de Bloco Digestor e radiação UV apresentaram menores valores de Carbono Orgânico e efeito matriz nas análises por voltametria, quando comparado aos métodos por micro-ondas. Contudo, com base nas recuperações obtidas para a determinação de Zn, Cd, Pb e Cu no Material de Referência Certificado por voltametria, foi possível concluir que os métodos de mineralização A e B apresentaram valores de recuperações aceitáveis (de 78 a 115 %), sendo que o método A apresentou melhor exatidão e recuperação do que o método B. A Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite foi utilizada como técnica comparativa. Entretanto, tanto para as análises do material de referência certificado quanto da amostra, pode-se observar que as concentrações determinadas foram estatisticamente inferiores para Cd e Pb e superiores para Cu, quando comparadas com as análises voltamétricas. Adicionalmente, maiores valores de desvio padrão relativos foram obtidos para a maioria das análises espectroscópicas, o que pode comprometer a certeza dos resultados. Com base nisto, conclui-se que o método A, é o mais adequado para a mineralização de macroalga para determinação simultânea de Zn, Cd, Pb e Cu por voltametria. Comparada a Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite a voltametria se destaca pela capacidade de determinação simultânea e baixo custo das análises e do equipamento.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O método de mineralização por micro-ondas (método A) seguido da determinação voltamétrica de Zn, Cd, Pb e Cu será aplicado para várias amostras oriundas de regiões de difícil acesso na Antártica com o intuito de monitoramento ambiental da região. Este trabalho é de interesse e será realizado em colaboração com o Professor Doutor Claudio Martins Pereira de Pereira da Universidade Federal de Pelotas e com o Professor Doutor Pio Colepicolo da Universidade de São Paulo.

8. BIBLIOGRAFIA

ABU-SANRA, A; MORRIS, J.S; KOIRTYOHANN, S. R. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 8 p 1475-1477, 1975.

ACHTERBERG, E. P; BRAUNGARDT, C. Stripping voltammetry for the determination of trace metal speciation and in-situ measurements of trace metal distributions in marine waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 400, p. 381–397, 1999.

AGAZZI, A; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 67, p. 337-341, 2000.

AGOSTINHO, S. M. L; VILLAMIL, R. F. V. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 813-817, 2004.

AKCALI, I; KUCUKSEZGIN, F. A biomonitoring study: Heavy metals in macroalgae from eastern Aegean coastal áreas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 637–645, 2011.

ALEIXO, M. L. **Voltametria: Conceitos e Técnicas**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química S.P.C.P. 6154, 2003. Disponível em [http:// www.chemkeys.com](http://www.chemkeys.com). Acesso em 1/03/2016.

ARRUDA, M. A. Z; SANTELLI, R. E. Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638-643, 1997.

BARCELOS, T. D. J. **Cobre: vital ou prejudicial para a saúde humana?** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, 2008.

BAUMANN, H. A; MORRISON, L; STENGEL, D. B. Metal accumulation and toxicity measured by PAM-chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1063–1075, 2009.

BIANCHI, T. S. **Biogeochemistry of estuaries**. New York: Oxford University, p. 705, 2007.

BRETT, A. M. O; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, p. 473, 1996.

BRITO, G. B; e colaboradores. Levels and spatial distribution of trace elements in macroalgae species from the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, p. 2238–2244, 2012.

CALICETI, M; e colaboradores. Heavy metal contamination in the seaweeds of the Venice lagoon. **Chemosphere**, v 47, p. 443–454, 2002.

CAMPOS, M. A. M; e colaboradores. construção e otimização de um reator de baixo custo para a fotodegradação da matéria orgânica em águas naturais e sua aplicação no estudo da especiação do cobre por voltametria. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 257-261, 2001.

CARVALHO, L. M. e colaboradores. Determinação voltamétrica de metais em águas e fluidos biológicos empregando mineralização de amostras com radiação ultravioleta. **Química Nova**, v. 31, p. 1336-1342, 2008.

CAVICCHIOLI, A; GUTZ, I. G. R. O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 913-921, 2003.

CHACRABORTY, S; e colaboradores. Benthic macroalgae as biological indicators of heavy metal pollution in the marine environments: A biomonitoring approach for pollution assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 100, p. 61–68, 2014.

COBBINA, S. J; e colaboradores. Low concentration toxic metal mixture interactions: Effects on essential and non-essential metals in brain, liver, and kidneys of mice on sub-chronic exposure. **Chemosphere**, v.132, p. 79–86, 2015.

COBBINA, S. J; e colaboradores. Interaction of four low dose toxic metals with essential metals in brain, liver and kidneys of mice on sub-chronic exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, p. 280–290, 2015.

CONT, M. E; CECCHETTI, G. A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. **Environmental Research**, v. 93, p. 99–112, 2003.

CRISPONI, C; e colaboradores. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 254, p. 876–889, 2010.

DOMINGOS, D; e colaboradores. UV-Assisted Digestion of Petrochemical Industry Effluents Prior to the Determination of Zn, Cd, Pb and Cu by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p.1-7, 2016.

ECONOMOU, A; e colaboradores. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 5856–5867, 2009.

FARÍAS, S; e colaboradores. Levels of essential and potentially toxic trace metals in Antarctic macro algae. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 2133-2140, 2002.

FU, H; WANG, M; HO, Y. Mapping of drinking water research: A bibliometric analysis of research output during 1992–2011. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 757–765, 2013.

GALLI, A; e colaboradores; Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105-112, 2006.

GIRARDI, F; e colaboradores. Marine macroalgae *Pelvetia canaliculata* (Linnaeus) as natural cation exchanger for metal ions separation: A case study on copper and zinc ions removal. **Chemical Engineering Journal**. v. 247, p. 320–329, 2014.

GOLIMOWSKI, J; GUSTAVSSON, I. Determination of mercury in freeze-dried muscle sample of pike, cod and perch using an ASV-technique. **Science of the Total Environment**, v. 31, p. 89-98, 1983.

GOLIMOWSKI, J; DMOWSK, K. Voltammetric determination of mercury in bird feathers for biomonitoring studies. **Chemica Analytica, Warsaw**, v. 40, p. 13-19, 1995.

GOLIMOWSKI, J; GOLIMOWSKA, A UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 111- 133, 1996.

GOUVÊA, M. M; e colaboradores; Aplicação da radiação ultravioleta como forma de contribuição para a química verde e construção de um reator fotoquímico alternativo e de baixo custo, para pré- tratamento de amostras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 337-343, 2014.

GRIGOLETTO, T. L. B; e colaboradores. Fatores químicos e físicos que afetam a contaminação por chumbo e cobre em água potável: uma abordagem para o estudo de caso em química analítica. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p.1995-2001, 2012.

HUANG, M; DUAN, R; XIANG, J. The influence of long-term cadmium exposure on phonotaxis in male *Pelophylax nigromaculata*. **Chemosphere**, v. 119, p. 763–768, 2015.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2003.

IYER, S; SEGUPTA, C; VALUMANI, A. Lead toxicity: An overview of prevalence in Indians. **Clinica Chimica Acta**, v. 451, p. 161–164, 2015.

JAGNER, D; AREN, K. Potentiometric stripping analysis for zinc, cadmium and copper in sea water. **Analytica Chimica Acta**, v. 107, p. 29-35, 1979.

JARUP, L; AKESSON, A. Current status of cadmium as an environmental health problem. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, p. 201–208, 2009.

KINGSTON, H. M; JASSIE, L. B. Microwave Energy for Acid Decomposition at Elevated Temperatures and Pressures Using Biological and Botanical Samples. **Analytica Chimica**, v. 58, p. 253-254, 1986.

KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**; fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar, 1ª Edição, Piracicaba 2008.

LABUDA, J; SAUR, D; NEEB, R. Anodic stripping voltammetric determination of heavy metals in solutions containing humic acids. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 348, p. 312-316, 1994.

LEAL, M. C. F; e colaboradores. Biomonitoring with Benthic Macroalgae and Direct Assay of Heavy Metals in Seawater of Oporto Coast (Northwest Portugal). **Marine Pollution Bulletin**, v. 34, n. 12, p. 1006-1015, 1997.

LEJBT, B; e colaboradores. TiO₂ assisted photo-oxidation of wastewater prior to voltammetric determination of trace metals: eco-friendly alternative to traditional digestion methods. **Article in Applied Surface Science. Warsaw**, v. 1, 2016. Disponível em: www.researchgate.net. Acesso em: 10 de Março 2016.

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, Recife**, v. 31, n. 1, p. 71–80, 2003.

MAFRA, D; COZZOLINO, S. M. F; Importância do zinco na nutrição humana. **Revista de Nutrição, Campinas**, v. 17, p. 79-87, 2004.

MAHESAR, S. A; e colaboradores. Simultaneous assessment of zinc, cadmium, lead and copper in poultry feeds by differential pulse anodic stripping voltammetry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2357-2360, 2010.

MALEA, P; KEVREKIDIS, T. Trace element patterns in marine macroalgae. **Science of the Total Environment**, v. 494, p. 144-157, 2014.

MARTIN, J. M; HUANE, W. W; YOON, Y.Y. Level and fate of trace metals in the lagoon of Venice (Italy). **Marine Chemistry**, v. 46, p. 371-386, 1994.

MEEPUN, N; SIRIKET, S; DEJMANEE, S. Adsorptive Stripping Voltammetry for Determination of Cadmium in the presence of Cupferron on a Nafion-coated Bismuth Film Electrode. **Internatinal Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 10582- 10591, 2012.

MEERAVALI, N. N; KUMAR, S. J. Slurry-sampling with rapid atomization versus microwave digestion with conventional atomization for the determination of copper, manganese and nickel in algae matrix using transverse heated-electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 404, p. 295–302, 2000.

MESKO, M.F; e colaboradores. Ultraviolet radiation combined with microwave assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS. **Journal Analytical Atomic Spectrometry**, v.30, p.260, 2015.

MOFFETT, J. W; BRAND, L. E. Production of strong, extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. **Limnology and Oceanography**, v. 41, p. 388-395, 1996.

MOREIRA, F. R; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana Salud Pública**, v.15, p. 119–29, 2004.

NADKARNI, R. A. Applications of Microwave Oven Sample Dissolution in **Analysis Analytical Chemistry**, v. 56, p.2233-2237, 1984.

PALCHETTI, I; LASCHI, S; MASCINI, M. Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 61–67, 2005.

PAPA, M; CASORIAA, P; GUIDAB, M. Determination of heavy metal in seawater and macroalgae of shorelines of Naples and Ischia Island, Italy. **Chemistry and Ecology**, v. 24, p. 27–37, 2008.

PHILLIPS, D. J. H; The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments- a review. **Environmental Pollution**, v. 13, p. 281–317, 1977.

RIBANI, M; e colaboradores. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCHA, S; e colaboradores; Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 330–336, 2009.

ROSOLINA, S. M; e colaboradores. Direct determination of cadmium and lead in pharmaceutical ingredients using anodic stripping voltammetry in aqueous a and DMSO/water solutions. **Analytica Chimica Acta**, v. 893, p. 25-33, 2015.

SHAHBAZI, Y; AHMADI, F; FAKHARI, F. Voltammetric determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in milk and dairy products collected from Iran: An emphasis on permissible limits and risk assessment of exposure to heavy metals. **Food Chemistry**, v.192, p.1060–1067, 2016.

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J. NIEMAN, T. **Princípios de Análises Instrumental**. 5° Ed., São Paulo, 2002.

SMITH, F. E; ARSENALT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, p.1207-1268, 1996.

SOUZA, J; e colaboradores. Voltametria de onda quadrada. segunda parte: aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 790-797, 2004.

SOUZA, J; MACHADO, S. A. S; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

STENGEL, D. B; e colaboradores. Zinc concentrations in marine macroalgae and a lichen from western Ireland in relation to phylogenetic grouping, habitat and morphology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 48, p. 902–909, 2004.

STOEPPLER, M; NURNBERG, H, W. Comparative Studies on Trace Metal Levels in Marine Biota. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 3, p. 335-351, 1979.

TAMAYO, A. I. B; e colaboradores. Analytical method for heavy metal determination in algae and turtle eggs from Guanahacabibes Protected Sea Park. **Journal Electrochemical Science and Engineering**, v. 4, n. 4, p.145-154, 2014.

VASCONCELOS, M. T. S. D; LEAL, M. F. C. Seasonal variability in the kinetics of Cu, Pb, Cd and Hg accumulation by macroalgae. **Marine Chemistry**, v. 74, p. 65–85, 2001.

VASCONCELOS, M. T. S. D; LEAL, M. F. C; VAN DEN BERG, C. M. G. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. **Marine Chemistry**, v.77, p. 187–210, 2002.

VASCONCELOS, M. T. S; LEAL, F. C. Speciation of Cu, Pb, Cd and Hg in waters of the Oporto coast in Portugal, using pre-concentration in a Chelamine resin column. **Analytica Chimica Acta**, v. 353, p.189-198, 1997.

VIDOTI, E. C; ROLLEMBERG, M.C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p 139-145, 2004.

WALSHE, J. M. The conquest of Wilsons is disease. **Braim**, v.132, p. 2289–2295, 2009.

WANG, C; e colaboradores. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, p.1468–1476, 2009.

WIETHAN, B, A; Determinação de Zinco, Cadmio, Chumbo, Cobre, Selênio, e Manganês em ovos de galinha, Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2014.

WURFELS, M; JACKWERTH, E; STOEPLER, M. About the problem of disturbances of inverse voltammetric trace analysis after pressure decomposition of biological samples. **Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie**, v. 329, n.4, p. 459-461, 1987.

ZBIKOWSKI, R; SZEFER, P; LATALA, A. Comparison of green algae *Cladophora* sp. and *Enteromorpha* sp. As potential biomonitors of chemical elements in the southern Baltic. **Science of the Total Environment**, v. 387, p. 320–332, 2007.

ZENG, X; e colaboradores. Children with health impairments by heavy metals in an e-waste recycling área. **Chemosphere**, v.148, p. 408–415, 2016.