



FURG

Dissertação de Mestrado

**Determinação voltamétrica de selênio em
macroalgas (*Rhodophytas e Phaeophytas*) da Antártica**

JULIANA ROCHA GUILHERME

PPGQTA

Rio Grande, RS - Brasil

2017

**Determinação voltamétrica de selênio em
macroalgas (*Rhodophytas e Phaeophytas*) da Antártica**

escrita por

JULIANA ROCHA GUILHERME

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

2017

Escola de Química e Alimentos – EQA
Programa de Pós-Graduação em Química
Tecnológica e Ambiental – PPGQTA

A Comissão Examinadora abaixo assinada aprova a Dissertação de Mestrado

**Determinação voltamétrica de selênio em
macroalgas (*Rhodophytas e Phaeophytas*) da Antártica**

elaborada por

JULIANA ROCHA GUILHERME

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

COMISSÃO EXAMINADORA

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

Prof. Dr^a. Jaqueline G. Buffon (FURG-RS)

Prof. Dr. Pio Colepicolo Neto

Rio Grande, 09 de Junho de 2017.

Dedico esse trabalho ao maior amor de minha vida,

meu filho Igor Guilherme Rocha

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter guiado meu caminho da melhor maneira possível nessa jornada de minha vida.

Ao Programa de Pós Graduação em Química Tecnológica e Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande, pela possibilidade para execução desse trabalho.

À minha família. Em especial minha mãe Zeli por me incentivar dia após dia a nunca desistir da cansativa trajetória durante todos esses anos. Sou eternamente grata à tudo que fez e faz por mim. Mãe amo você!

Ao meu marido Islauro pela confiança, carinho, companheirismo e incentivo durante toda essa jornada longa e difícil, mas enfim terminou. Sou grata!

Ao meu filho Igor, uma criança admirável e adorável. Sou abençoada por ser sua mãe. Com certeza não há palavras para descrever o que sinto por você. Amo você incondicionalmente.

À Prof^ª. Dr^ª. Daiane Dias por todo conhecimento, e principalmente por ter me acolhido durante o decorrer do mestrado, dispondo o apoio necessário para o desenvolvimento desse trabalho. Muito Obrigada!

Ao Prof. Dr. Claudio M. P. Pereira pela colaboração e disponibilidade da biomassa de macroalga para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada!

Aos Prof. Dr. Carlos Andrade e a Prof^ª. Dr^ª. Jaqueline Buffon pela participação e contribuição na banca de qualificação. Obrigada!

Aos Prof. Dr. Pio Colepicolo e a Prof^ª. Dr^ª. Jaqueline Buffon pela participação na defesa da dissertação e pelas sugestões para a conclusão desse trabalho. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Bruno Meira por conhecimentos transmitidos e principalmente pela paciência. Muito Obrigada!

A todos os professores e funcionários da Escola de Química e Alimentos.

A todos meus colegas do Laboratório de Eletro Espectro Analítica: Monika, Lainide, Milena Michele, Juliana Maciel, Monize, Nadyne, Ana Munaretto, Sabrine, Diana, João, Felipe e Rodolfo pelo convívio, respeito e amizade dentro do laboratório.

Em especial gostaria de agradecer as meninas Monika, Lainide, Michele, Juliana Maciel, Milena e Diana pelas boas gargalhadas, apoio, companheirismo, carinho, que contribuíram para me acalmar em momentos tensos, que vocês acompanharam. Meninas muito obrigada!

As meninas Monize, Nadyne, Sabrina e Ana agradeço vocês também pelo carinho que demonstraram por mim nessa reta final, quando estava apavorada fazendo as prévias para a defesa. Meninas muito obrigada!

Aos meninos João e Felipe pela ajuda, apoio e alguns momentos de descontração. Muito obrigada!

Aos integrantes do Laboratório de Análises de Compostos Orgânicos e Metais, sem exceção. Alguns em especial.

As meninas Karina e Gabriela por todo apoio e companheirismo dentro e fora do laboratório. Karina agradeço à você o carinho, os conselhos e a amizade. Você dividiu comigo alguns momentos difíceis e mesmo depois do término do mestrado continua sempre disposta a me ajudar. Karina não tenho palavras para agradecer o que fez e faz por mim. Muito obrigada!

A técnica Sergiane Caldas pela amizade e apoio. Sou grata!

Ao suporte financeiro das Fundações CAPES, FAPESP (n° 2016/06931-4) e CNPq (ProAntar n° 407588/2013-2).

Ao laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas por ter concedido as amostras para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	19
3.1 Macroalga	19
3.2 Selênio	21
3.3 Preparo de Amostra.....	23
3.3.1 Mineralização por Radiação Micro-ondas.....	24
3.3.2 Mineralização por Bloco Digestor e por Radiação Ultravioleta - UV	27
3.4 Técnicas para quantificação de Se	29
3.4.1 Técnicas espectrométricas	29
3.4.2 Técnicas voltamétricas	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Instrumentação.....	34
4.2 Reagentes e soluções.....	34
4.3 Controle de contaminação	35
4.5 Parâmetros avaliados na determinação voltamétrica de Se por DPV e SWV	38
4.6 Determinação de Selênio por SWV	38
4.7 Determinação da atividade antioxidante	38
4.8 Validação do método voltamétrico	39

4.9 Efeito Matriz	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Otimização dos métodos voltamétricos.....	41
5.1.1 Voltametria de Pulso Diferencial	41
5.1.1.1 Efeito da concentração cobre	41
5.1.1.2 Avaliação do eletrólito.....	44
5.1.1.3 Avaliação do potencial de deposição	46
5.1.1.4 Avaliação do efeito da velocidade de varredura	47
5.1.2 Voltametria de Onda Quadrada	48
5.1.2.1 Avaliação do efeito da frequência	48
5.1.2.2 Avaliação do efeito da amplitude.....	49
5.2 Comparação entre Pulso Diferencial e Onda Quadrada na determinação de Se	50
5.3 Testes preliminares com a amostra (avaliação da concentração de Cu e efeito matriz nas amostras)	52
5.4 Parâmetros de Validação	56
5.5 Avaliação da influência dos interferentes.....	57
5.6 Determinação de Se por SWV em macroalgas	58
5.7 Determinação da Atividade Antioxidante	62
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da migração iônica (adaptado de KRUG, 2008)	25
Figura 2 - Representação esquemática do alinhamento da molécula da água com o campo elétrico (adaptado de KRUG, 2008)	26
Figura 3- Mapa do continente Antártico com a localização das Ilhas de Robert, Half Moon, Livingston, e Deception utilizadas para a coleta das macroalgas Phaeophyta e Rhodophyta usadas nesta dissertação	37
Figura 4- Esquema de reação entre o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e um composto antioxidante (MOON e SHIBAMOTO, 2009).	39
Figura 5 - Voltamogramas obtidos por DPCSV com e sem adição de Cu^{2+} . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	42
Figura 6 - Curvas analíticas de Se com adição de 8, 16 e 24 μM de Cu^{2+} (A) e os respectivos voltamogramas obtido por DPCSV (B). Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com íons Cu e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	44
Figura 7 - Voltamogramas de Se obtidos por DPCSV (A) e (B) curvas analíticas para Se (32 a 160 nM) em HCl, H_3PO_4 , HNO_3 e H_2SO_4 . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito e 16 μM de Cu^{2+} . $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	45
Figura 8 - Curvas analíticas de Se obtidas para as diferentes concentrações de HCl (1, 2, 50, 100 e 150 mM HCl). Condições experimentais: 10 mL do eletrólito e 16 μM de Cu^{2+} . $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	46
Figura 9 - Influência do potencial de deposição na corrente de pico de redução de Cu_2Se . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com 16 μM de Cu^{2+} e 32 nM de Se. $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	47
Figura 10 - Variação da corrente de pico de Cu_2Se em função da velocidade de varredura (A) e (B) voltamogramas obtidos por DPCSV para as velocidades de varredura de 50, 100 e 120 mV s^{-1} . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com 16 μM de Cu^{2+} e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$	48

Figura 11 - Variação da intensidade de corrente de pico de Cu ₂ Se em função da variação da frequência (A) e (B) os respectivos voltamogramas. Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com 16 µM de Cu ²⁺ e 32 nM de Se. E _{dep} = -0,4 V, E _i = -0,4 V, E _f = -0,8 V, t _{dep} = 90 s, Amp = 0,08 V.	49
Figura 12 - Variação na intensidade de corrente de pico para Cu ₂ Se com diferentes valores de amplitude (A) e (B) os respectivos voltamogramas. Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com 16 µM de Cu ²⁺ e 32 nM de Se. E _{dep} = -0,4 V, E _i = -0,4 V, E _f = -0,8 V, t _{dep} = 90 s, f = 60 Hz.....	50
Figura 13- Voltamogramas de Se por SWV (A) e DPCSV (B) e suas curvas analíticas (inset). Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) e 16 µM de Cu ²⁺ . Faixa de concentração de Se de 32 a 96 nM.	51
Figura 14 - Voltamogramas de Se 0,5 µg L ⁻¹ na macroalga <i>Phaeophytas</i> (<i>Adenocystis utricularis</i>) (A) e <i>Rhodophytas</i> (<i>Georgiella confluens</i>) (B) por SWV com 20 mL de HCl 100 mM em 16 e 140 µM de Cu ²⁺ . Condições experimentais: E _{dep} = -0,4 V, E _i = -0,4 V, E _f = -0,8 V, t _{dep} = 420 s, f = 60 Hz, Amp = 0,08 V	53
Figura 15 - Curvas analíticas obtidas por SWV para as macroalgas <i>Phaeophytas</i> (A- <i>Adenocystis utricularis</i> , B- <i>Cystosphaera jacquiniotii</i> , C- <i>Ascoseira mirabilis</i> , D- <i>Desmarestia anceps</i> e E- <i>Himantothallus grandifolius</i>) e <i>Rhodophytas</i> (F- <i>Georgiella confluens</i> , G- <i>Curdiea racovitzae</i> , H- <i>Iridaea cordata</i>). Condições experimentais: 20 mL de eletrólito (HCl 100 mM e 140 µM de Cu ²⁺) E _{dep} = -0,4 V, E _i = -0,4 V, E _f = -0,7 V, t _{dep} = 420 s, f = 60 Hz, Amp = 0,08 V	54
Figura 16 - Voltamogramas obtidos por SWV para as macroalgas <i>Phaeophytas</i> (A- <i>Adenocystis utricularis</i> , B- <i>Cystosphaera jacquiniotii</i> , C- <i>Ascoseira mirabilis</i> , D- <i>Desmarestia anceps</i> e E- <i>Himantothallus grandifolius</i>) e <i>Rhodophytas</i> (F- <i>Georgiella confluens</i> , G- <i>Curdiea racovitzae</i> , H- <i>Iridaea cordata</i>). Condições experimentais: 20 mL de eletrólito (HCl 100 mM e 140 µM de Cu ²⁺) E _{dep} = -0,4 V, E _i = -0,4 V, E _f = -0,8 V, t _{dep} = 420 s, f = 60 Hz, Amp = 0,08 V. Curva = a-e de 0,1 a 0,5 µg L ⁻¹ de Se.....	58
Figura 17- Correlação entre atividade antioxidante das macroalgas e a concentração de Se quantificada por SWV	65
Figura 18 - Correlações entre atividade antioxidante e concentração de Se em (A) <i>Curdiea racovitzae</i> , <i>Himantothallus grandifolius</i> , <i>Ascoseira mirabilis</i> , <i>Iridaea cordata</i> e (B) <i>Desmarestia anceps</i> , <i>Adenocystis utricularis</i> , <i>Cystosphaera jacquiniotii</i> e <i>Georgiella confluens</i>	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores recomendados de Se para o consumo diário segundo agências regulamentadoras ($\mu\text{g Se dia}^{-1}$).....	22
Tabela 2 - Macroalgas coletadas em diferentes locais da Antártica	36
Tabela 3 - Parâmetros utilizados para Pulso Diferencial e para Onda Quadrada.....	51
Tabela 4 - Valores de efeito da matriz para as macroalgas em estudo	55
Tabela 5 - Valores calculados para os limites de detecção e quantificação do método para Se por SWV	57
Tabela 6 - Valores de Se quantificados nas macroalgas <i>Phaeophytas</i> e <i>Rhodophytas</i> por SWV após mineralização por MAD	60
Tabela 7- Valores quantificados de atividade antioxidante para as macroalgas <i>Rhodophytas</i> e <i>Phaeophytas</i> pelo método DPPH.....	63
Tabela 8- Quantificação de Se nas amostras e as atividades antioxidantes das espécies de mesma classificação e de mesmo local de coleta.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- LD_{inst}, Limite de detecção instrumental
- LQ_{inst}, Limite de Quantificação instrumental
- LD_{met}, Limite de detecção do método
- LQ_{met}, Limite de Quantificação do método
- MAD, Digestão Assistida por Micro-ondas, do inglês *Microwave-Assisted Digestion*
- GF AAS, Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*
- HMDE, Eletrodo Trabalho de Mercúrio de Gota Pendente, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*
- CSV, Voltametria de Redissolução Catódica, do inglês *Cathodic Stripping Voltammetry*
- DPV, Voltametria por Pulso Diferencial, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*
- DPCSV, Voltametria de Redissolução Catódica por Pulso Diferencial, do inglês *Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry*
- DPPH, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- SWV, Voltametria de Onda Quadrada, do inglês *Square Wave Voltammetry*
- HG AAS, Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*
- ICP-OES, Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*
- ICP MS, Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*
- ICP AES, Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*
- E_{dep}, potencial de deposição
- Amp, amplitude
- E_p, potencial de pico
- v, velocidade de varredura
- MOD, matéria orgânica dissolvida
- EM, efeito matriz
- RSD, do inglês *relative standard deviation*

f , frequência

E_i , potencial inicial

E_f , potencial final

t_{dep} , tempo de deposição

E_{step} , potencial step

Hg, mercúrio

RESUMO

As macroalgas são consideradas fontes de compostos naturais com propriedades benéficas e antioxidantes ao ser humano, tais como os compostos fenólicos e selênio (Se) e, devido a isso, esta matriz tem despertado interesse na indústria alimentícia e farmacêutica. Em especial, estudos utilizando macroalgas da Antártica para esse fim, têm crescido nos últimos anos devido as grandes quantidades produzidas na região e pelas condições propícias para tal. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver método voltamétrico para a determinação de Se em macroalgas vermelhas (*Rhodophytas*) e pardas (*Phaeophytas*) da Antártica. Para a determinação da concentração de Se nas macroalgas foi realizada a otimização de dois métodos voltamétricos (Voltametria de Pulso Diferencial - DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry* e Voltametria de Onda Quadrada - SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*), utilizando eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE). Dentre os métodos otimizados a SWV demonstrou maior sensibilidade, apresentando limites de quantificação entre 5,21 (*Georgiella confluens*) a 9,85 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (*Iridaea cordata*). Os parâmetros voltamétricos utilizados foram: $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$; $E_i = -0,4$; $E_f = -0,8 \text{ V}$; $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$; $E_{\text{step}} = -0,005 \text{ V}$, $\text{amp} = 0,08 \text{ V}$ e $f = 60 \text{ Hz}$. As amostras foram mineralizadas por decomposição assistida por micro-ondas (0,3 g de amostra e 6 mL de HNO_3). Foi avaliado o efeito matriz e a influência da concentração de Cu na análise voltamétrica das amostras. Adicionalmente, os níveis de concentração de Se foram correlacionados com a atividade antioxidante das amostras e a determinação desta propriedade foi realizada por espectrofotometria com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Os valores de concentração de Se nas amostras ficaram entre 0,23 e 1,22 mg kg^{-1} , a exatidão do método foi comprovada pela análise de material de referência certificado (111% de recuperação).

Palavras-chave: macroalgas. selênio. atividade antioxidante. voltametria.

ABSTRACT

Macroalgae are considered sources of natural compounds with beneficial and antioxidant properties to humans, such as phenolic compounds and selenium (Se), therefore this matrix is interesting for the pharmaceutical and food industry. In special, studies using Antarctic macroalgae for this purpose have grown in recent years due to the large quantities produced in that region and the conditions appropriated for that. Therefore, the aim of this work was to develop voltammetric method for the Se determination red (*Rhodophytas*) and brown (*Phaeophytes*) macroalgae of Antarctica. To determine Se concentration in the samples, two voltammetric methods (Differential Pulse Voltammetry - DPV and Square Wave Voltammetry -SWV) were applied using a Hanging Mercury Drop Electrode (HMDE). Among the optimized methods, SWV showed higher sensitivity, presenting quantification limits between 5.21 (*Georgiella confluens*) and 9.85 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (*Iridaea cordata*). The voltammetric parameters used were: $E_{\text{dep}} = -0.4 \text{ V}$; $E_{\text{start}} = -0.4$; $E_{\text{end}} = -0.8 \text{ V}$; $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$; $E_{\text{step}} = -0.005 \text{ V}$, $\text{amp} = 0.08 \text{ V}$ and $f = 60 \text{ Hz}$. The samples were mineralized by microwave assisted decomposition (0.3 g of sample and 6 mL of HNO_3). The matrix effect and the influence of the Cu concentration on the samples voltammetric analysis were evaluated. In addition, Se concentration levels in the samples were correlated with the antioxidant activity and the determination of this property was performed by spectrophotometry with DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The Se concentration values in the samples were between 0.23 and 1,22 mg kg^{-1} and the method accuracy was proved by the certified reference material analysis (111% recovery).

Key-Words: macroalgae, selenium, antioxidant activity, voltammetry

1. INTRODUÇÃO

As macroalgas são organismos aquáticos que compõem um grupo diversificado de plantas, que podem ser encontradas em ambientes marinhos, em corpos de água doce, solos, rochas ou até mesmo sobre a neve (MAEHRE et al., 2014). Podem ser classificadas como biomonitores, pois são organismos capazes de acumular metais em seus tecidos e por esse motivo são utilizados no monitoramento de tais contaminantes nos ecossistemas (MEERAVALI; KUMAR, 2000; RAINBOW, 2006). Além disso, essas espécies podem apresentar em sua estrutura substâncias como proteínas e carboidratos, o que possibilita a interação com íons metálicos, além de substâncias bioativas como polifenóis, carotenóides, vitaminas e minerais, o que confere a elas propriedades antibacterianas (BATTU et al., 2011), antivirais (RABANAL et al., 2014) antifúngicas (PANDIAN et al., 2011) e antioxidantes (CHANDINI et al., 2008). Dentre estas, a atividade antioxidante tem sido avaliada e normalmente está associada à presença de compostos polifenólicos na estrutura dessa matriz (ZHANG et al., 2007). Entretanto, há outros compostos que se presentes na amostra, podem contribuir com a atividade antioxidante. Nesse contexto destaca-se o selênio (Se), que é um micronutriente reconhecido como essencial devido sua ação protetora contra diferentes doenças (TUZEN et al., 2009). Devido a isso, as macroalgas têm sido alvo de investigação, uma vez que apresentam elevada capacidade nutracêutica (BLUNT et al., 2011).

Segundo relatos de Zhong et al. (2015) níveis de concentração de Se de até 750 mg L⁻¹ aumentam a atividade da glutathiona peroxidase, catalase e da peroxidase (uma classe de enzimas antioxidantes) (ZHONG et al., 2015). Desse modo, pode-se inferir que as algas que apresentam Se em sua composição podem ser consideradas ricas fontes de compostos antioxidantes naturais tendo maior aplicabilidade do ponto de vista nutracêutico. É conhecido que o Se está presente em algas (COSTA et al., 2008) e a determinação de sua concentração neste tipo de amostra é de grande relevância devido à sua importância fisiológica (CHATTERJEE et al., 2001). Por ser um constituinte da glutathiona peroxidase, desempenha uma das funções biológicas mais importantes, atuando no mecanismo de defesa do organismo contra os danos oxidativos causados por radicais livres (VOLP et al., 2010). Devido a estes fatores, a ingestão de alimentos que contenham Se é indicada, podendo atuar na melhora do sistema imunológico (SILVA et al., 2011).

No ambiente, o Se encontra-se distribuído por meio de fontes antropogênicas (atividades industriais e agrícolas) e naturais (SEIXAS; KEHRIG, 2007). Pode se bioacumular na cadeia alimentar (LEMLY, 2004) e sua biodisponibilidade vai depender em grande parte, da forma na qual ele encontra-se no ambiente. Dentre as espécies de Se existentes, (selenato - SeO_4^{2-} e selenito - SeO_3^{2-}) a mais abundante é o selenato.

Para a determinação analítica normalmente é necessário que os analitos estejam em solução e desta forma, o tratamento da amostra (decomposição) envolve a transformação prévia da espécie química para uma forma apropriada para a análise (KRUG, 2008). Dentre os métodos de decomposição, a decomposição assistida por micro-ondas (MAD, do inglês *Microwave-Assisted Digestion*) tem se mostrado eficaz para a mineralização deste tipo de matriz (SOARES et al., 2012; ALMEIDA et al., 2017) uma vez que usa sistema fechado, proporcionando menor risco de contaminação, menor tempo de mineralização, e, além disso, menores volumes de reagentes são utilizados (AGAZZI; PIROLA, 2000).

Técnicas espectrométricas de elevada sensibilidade são comumente utilizadas para análise de Se (NAJAFI et al., 2012). Entretanto, em alguns casos mesmo quando utilizadas em combinação com métodos de preparo de amostra eficientes apresentam interferência da matriz (FLORES et al., 2007) o que muitas vezes pode inviabilizar a análise. Neste contexto os métodos voltamétricos vêm se mostrando uma excelente alternativa frente aos métodos espectroscópicos por apresentar sensibilidade semelhante ou maior na determinação de compostos em diferentes matrizes, inclusive em macroalgas (ALMEIDA et al., 2017), rapidez nas análises e ser de baixo custo (KOUNAVES, 1997).

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver um método voltamétrico para a determinação de Se em macroalgas obtidas da Antártica utilizando etapa prévia de mineralização da amostra por MAD.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver método voltamétrico para a quantificação de Se em macroalgas vermelhas (*Rhodophytas*) e pardas (*Phaeophytas*) da Antártica.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e comparar dois métodos voltamétricos (pulso diferencial e onda quadrada) para a determinação de Se;
- Avaliar interferentes de íons metálicos e o efeito matriz das amostras;
- Quantificar a atividade antioxidante das amostras frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH);
- Aplicar o método validado nas amostras;
- Relacionar o teor de Se com a atividade antioxidante das amostras;

3. REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 Macroalga

Macroalga é definido como um grupo de plantas diversas que estão divididas em três diferentes reinos: monera, protista e *plantae*. Algas do reino *plantae* são organismos classificados como pluricelulares, eucariontes e autótrofos, da qual fazem parte as *Rhodophytas* e as *Phaeophytas* (algas vermelhas e pardas, respectivamente) (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). A composição química geral dessas algas demonstra um valor nutricional essencial para a função fisiológica do corpo humano, sendo fontes de proteínas, carboidratos, fibras, minerais e vitaminas, além de micronutrientes (DHARGALKAR; VERLECAR, 2009).

As macroalgas são organismos fotossintetizantes, ocupam ambientes que lhes ofereçam luz e umidade (permanente ou temporária), produzem oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, fazem parte da cadeia alimentar e servem de abrigo e local de desova para animais herbívoros e onívoros. (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Dentro do ambiente aquático as macroalgas são classificadas como biomonitores, isso porque são organismos capazes de acumular metais em seus tecidos, pois em sua estrutura há substâncias que apresentam sítios ativos capaz de interagir com íons metálicos do meio (MEERAVALI; KUMAR, 2000). Por esse motivo podem ser utilizadas no monitoramento e na verificação da biodisponibilidade de tais contaminantes nos ecossistemas (RAINBOW, 2006).

Diante da diversidade bioquímica que exibem, tem havido um crescente interesse por esses organismos por parte das indústrias alimentícias e farmacêuticas devido aos seus efeitos benéficos (TURAN et al., 2015). Por conterem uma série de nutrientes, são fontes potentes de ingredientes funcionais e de compostos bioativos com diferentes propriedades, dentre as quais se destaca a atividade antioxidante (TABOADA; MILLAN; MIGUEZ, 2013).

Segundo Vidotti e Rollemborg (2004), muitas algas vermelhas (*Rhodophytas*) são utilizadas como alimento e na extração do ágar (empregado na fabricação de gomas, laxantes ou como meio de cultura para bactérias). Adicionalmente, das algas vermelhas pode ser extraído a carragenana, um polissacarídeo amplamente utilizado na produção de alimentos como iogurtes, sorvetes, achocolatados, embutidos entre outros (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Na indústria farmacêutica a carragenana (obtida da

alga vermelha) é empregada como anticoagulante e como produto anti-inflamatório (ARMISEN, 1995).

Segundo Yamasaki et al., (2005), das algas pardas (*Phaeophytas*) são extraídos os alginatos que são polissacarídeos amplamente utilizados em indústrias têxtil, de alimentos e farmacêuticas (devido sua capacidade em complexar íons metálicos), além de serem importantes geleificante, viscosificante e emulsificante (YAMASAKI et al., 2005; CARDOZO et al., 2007).

As macroalgas em sua maioria são expostas a altas concentrações de oxigênio e luz (necessária para a realização da fotossíntese) a qual pode levar a formação de radicais livres. No entanto, segundo Matsukawa et al., (1997) a ausência de danos oxidativos em sua estrutura sugere que essas espécies possuam em sua composição compostos com caráter antioxidante o que ajuda na inibição do processo oxidativo (MATSUKAWA et al., 1997).

Segundo (Rocha et al., 2007) o interesse por substâncias naturais com atividade biológica, com destaque a atividade antioxidante, surgiu no Japão, com intuito de substituir antioxidantes sintéticos que eram usados como aditivos alimentares (hidrixianisol butilado e hidroxitolueno butilado), pois os mesmos apresentavam efeitos patológicos como por exemplo efeito carcinogênico (ROCHA et al., 2007).

Duan et al., (2006), avaliaram a capacidade antioxidante da alga vermelha (*Polysiphonia urceolata*), coletada na linha costeira de Qingdao da província de Shandong, República Popular da China, através do método DPPH. O estudo demonstrou que os extratos obtidos dessa alga apresentaram elevada atividade antioxidante equiparando-se a de antioxidante comerciais como BHT, ácido gálico e ácido ascórbico, além de poder prevenir a deterioração oxidativa de alimentos (DUAN et al., 2006).

Nahas et al., (2007) avaliaram a atividade antioxidante de treze espécies de algas coletadas de áreas da costa de Kolimbari e Marathi, na ilha da Grécia, através do método DPPH. Os autores chegaram à conclusão de que os compostos taondiol e epitaondiol encontrados na alga verde (*Taonia atomaria*) apresentaram atividade antioxidante superior ao trolox e ao ácido ascórbico conferindo a esta espécie uma fonte natural com propriedade antioxidante benéfica a saúde (NAHAS et al., 2007).

Zubia e Robledo (2007) avaliaram a capacidade antioxidante de diferentes espécies de algas coletadas no México. Dentre estas, a alga parda (*Lobophora variegata*) e a alga vermelha (*Chondria baileyana*) foram as mais ativas frente ao

método DPPH. Os autores concluíram que a capacidade antioxidante que essas algas apresentaram foi equivalente à de antioxidantes comerciais como BHT, BHA, α -tocoferol e ácido ascórbico (ZUBIA; ROBLEDO, 2007).

A propriedade antioxidante das algas normalmente está associada à presença de compostos polifenólicos em sua estrutura (NAGAY; YUKIMOTO, 2003), porém há outros compostos que se estiverem presentes em sua composição podem contribuir na potencialização dessa propriedade, neste caso podemos citar o Se, que é um nutriente reconhecido como essencial devido ser um agente protetor contra diferentes doenças, tais como câncer, diabetes e hipertensão (ZIMMERMANN; KIRSTEN, 2016). Desse modo, pode-se inferir que algas que apresentam Se podem ser consideradas ricas fontes de compostos antioxidantes naturais tendo maior aplicabilidade do ponto de vista nutracêutico.

3.2 Selênio

O Se é um elemento de fundamental importância para humanos e para animais (ZHONG et al., 2015). Esse composto tem sido reconhecido como essencial devido suas funções biológicas importantes no qual se baseia na presença da glutathione peroxidase que atua no mecanismo de defesa do organismo contra os danos oxidativos, eliminando peróxidos e hidropéroxidos (ALARCON; VIQUE, 2008). Além disso, Se está associado à prevenção de várias doenças como o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão e melhora do sistema imunológico (ARTHUR; MCKENZIE; BECKETT, 2003).

Os alimentos são a principal fonte de Se para os seres vivos e de acordo com alguns órgãos regulamentadores a dose diária recomendada para humanos varia, conforme demonstrado na Tabela 1. Esse elemento possui um comportamento peculiar devido à estreita faixa de ingestão existente entre essencialidade e toxicidade (SCHIAVON et al., 2012) sendo considerado essencial em concentrações inferiores a 40 mg g⁻¹ e tóxico acima de 4000 mg g⁻¹ (TUZEN; SARI, 2010).

Tabela 1 - Valores recomendados de Se para o consumo diário segundo agências regulamentadoras ($\mu\text{g Se dia}^{-1}$)

Idade	Homens		Mulheres		Grávidas		Lactantes	
	FAO*	FNB**	FAO*	FNB**	FAO*	FNB**	FAO*	FNB**
Nascido até 6 meses	6	15	6	15				
7 - 12 meses	10	20	10	20				
1 - 3 anos	17	20	17	20				
4 - 6 anos	22	-	22	-				
4 - 8 anos	-	30	-	30				
7 - 9 anos	21	-	21	-				
9 - 13 anos	-	40	-	40				
10 - 18 anos	32	-	26	-				
14 - 50 anos	-	55	-	55	28 - 30	60	35 - 42	70
19 - 65 anos	34	-	26	-				
+ de 51 anos	-	55	-	55				
+ de 65 anos	33	-	-	25				

*Food and Agriculture Organization for World Health Organization (FAO/OMS), 2001.

** Food and Nutrition Board (FNB), 2000.

O Se encontrado no ambiente é proveniente de duas fontes: as naturais e as antropogênicas. As antropogênicas contribuem com a liberação de Se em diferentes compartimentos do ecossistema, dentre estas estão atividade agrícola, indústrias de refino, mineração, efluentes entre outros (HAMILTON, 2004). Essa fonte torna esse elemento disponível para o ambiente aquático e conseqüentemente para o homem, uma vez que a principal via de exposição para o homem e para os organismos aquáticos é através da dieta alimentar (SEIXAS; KEHRIG, 2007).

A biodisponibilidade desse elemento depende em grande parte de seu estado de oxidação. Se existe naturalmente em quatro estados de oxidação (-2, 0, +4 e +6) e dentre essas espécies a mais abundante é o selenato (+6) (AMWEG et al., 2003). Segundo Lemly, (1999) quando Se torna-se disponível para ambiente aquático três fatos podem ocorrer: pode ser absorvido ou ingerido pelos organismos, pode ligar-se ou complexar-se ao material particulado ou ligar-se à superfície do sedimento ou permanecer livre em solução (LEMLY, 1999). Devido a isso, estudos para avaliar os níveis de concentração deste micronutriente no ambiente têm aumentado (PARASKEVI; KEVREKIDIS, 2014).

3.3 Preparo de Amostra

Normalmente as técnicas analíticas de quantificação requerem que as amostras estejam em solução para que sejam introduzidas nos equipamentos, a fim de minimizar interferências, facilitar os procedimentos de calibração e aumentar o tempo de vida útil do instrumento (OLIVEIRA, 2003). Desta forma, é indispensável uma etapa prévia de preparo da amostra, etapa esta que muitas vezes dificulta o desenvolvimento do método, por crítica e por conduzir a erros que limitam a exatidão da análise, além de maior tempo da sequência analítica (WIETESKA et al., 1996).

No tratamento da amostra a mesma é decomposta utilizando-se ácidos diluídos, concentrados ou a mistura dos mesmos (com ou não adição de peróxido), em sistemas abertos ou fechados, na presença ou ausência de aquecimento, pressão, sobre a incidência de radiações UV, micro-ondas e/ou ultrassônicas.

Almeida et al., (2017) investigaram diferentes modos de preparo de amostra da macroalga verde *Porphyra endiviifolia* da Antártica para a posterior determinação voltamétrica de Zn, Cd, Pb e Cu. Um dos métodos utilizou sistema fechado (micro-ondas) e os outros dois métodos utilizaram um sistema aberto e semiaberto (bloco digestor e radiação UV, respectivamente).

A mineralização realizada por MAD consistiu de dois métodos denominados A e B. No método A foram utilizados a mistura de HNO₃ e HCl. Já o método B utilizou apenas o HNO₃. A mineralização realizada por bloco digestor (denominado método C) foi realizada utilizando a mistura de HNO₃ e H₂O₂. A amostra foi mantida em sistema aberto a uma temperatura de 100 °C por um período de 13 horas. Já a mineralização realizada por UV (denominado método D) utilizou como agente oxidante a mistura H₂SO₄ e H₂O₂. As amostras foram mantidas em um sistema semiaberto a uma temperatura de 80°C por um período de 10 h e cada hora foram adicionados H₂O₂. Ao analisar o material de referência certificado (Peach Leaves-NIST 1547) os autores obtiveram recuperações aceitáveis para todos os analitos utilizando os métodos A e B (valores entre 78 a 115%). Entretanto com o uso do bloco e radiação UV baixos índices de recuperações foram obtidos para Cd (0 e 77%, respectivamente) e Pb (57 e 67, respectivamente) estando alguns valores abaixo dos limites aceitáveis (70 a 120%). Sendo assim, os autores concluíram que a utilização da digestão assistida por micro-ondas para amostras de macroalgas é mais recomendável que por bloco digestor e/ou radiação UV (ALMEIDA et al., 2017).

3.3.1 Mineralização por Radiação Micro-ondas

Em 1946, Percy Spencer descobriu a função do micro-ondas como fonte de aquecimento. Abu-Samra, Morris e Koirtyohann (1975) foram os primeiros pesquisadores a usar a radiação micro-ondas em decomposições ácidas (ABU-SAMRA; MORRIS; KOIRTYOHANN, 1975).

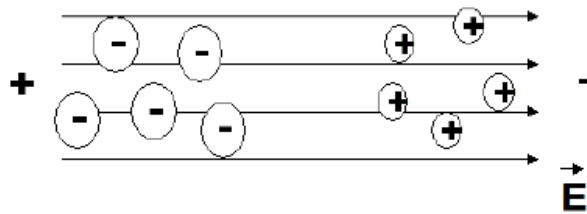
Nos últimos tempos é crescente o uso de micro-ondas na decomposição de diferentes matrizes como, solo, sedimentos, materiais biológicos, dentre outras (AGAZZI; PIROLA, 2000). Segundo Mesko et al., (2015) digestão assistida por micro-

ondas, tem sido amplamente aplicada na mineralização de amostras complexas (como amostras biológicas) pois devido a utilização do sistema fechado minimiza o risco da perda do analito por volatilização, minimizando também a contaminação e assegurando que a mineralização das amostras seja completa em curto tempo (MESKO et al., 2015).

As radiações micro-ondas são radiações eletromagnéticas não ionizantes, e por isso não possuem energia suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas (KINGSTON; JASSIE, 1986). O aquecimento por micro-ondas baseia-se em dois mecanismos principais, a migração iônica e a rotação de dipolos que transformam a radiação eletromagnética em calor (KRUG, 2008).

A migração iônica compreende o movimento dos íons dissolvidos em solução, causado pela interação entre as espécies iônicas e o campo elétrico oscilante das radiações eletromagnética. A Figura 1 mostra um esquema da migração iônica.

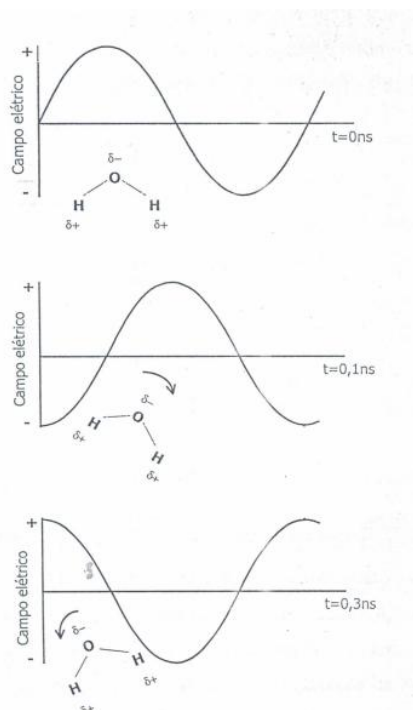
Figura 1 - Representação esquemática da migração iônica (adaptado de KRUG, 2008)



Na migração iônica, os íons deslocam-se produzindo um fluxo de corrente e o movimento sofre resistência causada por outras espécies com fluxo oposto ao deslocamento, produzindo calor e elevando a temperatura da solução (KRUG, 2008).

Outro fenômeno que ocorre é a rotação de dipolo demonstrado na Figura 2 e que consiste no alinhamento das moléculas existentes no meio que possuem momento dipolar com o campo eletromagnético.

Figura 2 - Representação esquemática do alinhamento da molécula da água com o campo elétrico (adaptado de KRUG, 2008)



Neste caso, as ondas eletromagnéticas geram campos elétricos positivos e negativos alternados, causando desordem e agitação das moléculas dipolares, e, conseqüentemente a energia absorvida para realinhar as moléculas é transformada em calor (KRUG, 2008).

Chatterjee, Bhattacharya e Das (2001) mineralizaram diferentes organismos marinhos da região da Índia por micro-ondas, utilizando uma mistura de HNO_3 e H_2O_2 . Após o Se foi extraído da solução aquosa com triisooctilamina, redissolvido com HCl diluído, e quantificado por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos, (HG AAS, do inglês *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*) e Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*). Através da análise do material de referência os autores obtiveram recuperações de 100% evidenciando a exatidão do método (CHATTERJEE; BHATTACHARYA; DAS, 2001).

Farias et al., (2002), investigaram a concentração de alguns elementos a níveis traço, em algas coletadas da Antártica. As amostras foram mineralizadas por MAD, por

meio de uma mistura de HNO₃, H₂O₂, HF e HClO₄. Utilizando a Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado, (ICP-OES, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) os autores quantificaram Se apenas na macroalga vermelha (*Monostroma hariotti*). A eficiência do processo de mineralização foi realizada através da análise do material de referência, no qual foram obtidas recuperações de 95% demonstrando exatidão no método empregado (FARIAS et al., 2002).

Volynsky e Viitak (2006) quantificaram Se na alga vermelha (*Fucus vesiculosus*), coletada da região Estoniana do Mar Báltico. A amostra foi mineralizada por MAD com a mistura de HNO₃ e H₂O₂ e a quantificação foi realizada por Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite, (GF AAS, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*). Os autores comprovaram a exatidão do método por meio de ensaio de adição padrão onde as recuperações variaram de 91 a 109% (VOLYNSKY; VIITAK, 2006).

Tuzen et al., (2009) quantificaram Se por GF AAS, após mineralização por MAD em 10 espécies de algas coletadas da costa do mar da Turquia. A exatidão método foi avaliada através da análise de material de referência onde se obteve recuperações de 95% o qual demonstra que o método empregado foi exato (TUZEN et al., 2009).

3.3.2 Mineralização por Bloco Digestor e por Radiação Ultravioleta - UV

A decomposição por bloco digestor é um dos métodos mais antigos e mais usados para a mineralização de amostras. Segundo Oliveira (2003), a mineralização utilizando sistemas abertos consome maior quantidade de reagentes e estão sujeitos a contaminações provenientes do meio externo, podem apresentar perdas completas ou parciais dos analitos por volatilização, além da necessidade da supervisão do analista durante todo o processo de mineralização (OLIVEIRA, 2003). De maneira convencional, quando se obtém uma solução clara após a decomposição por bloco, assume-se que a oxidação da matéria orgânica foi completa (KRUG, 2008).

Tamayo et al., (2014), Ribeiro et al., (2016) e Lopez et al., (2007), mineralizaram amostras de macroalgas e ovos de tartaruga por bloco digestor na

presença de HNO_3 e H_2O_2 para posterior determinação de Cd, Pb, Cu, Ca, Fe, K, Mn, Na, Zn e Mg onde as recuperações variaram entre 94,3 a 100% (TAMAYO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016; LOPEZ et al., 2007).

A radiação UV é a porção do espectro eletromagnético que se localiza entre a região do visível e a região do raio-X, cujos os comprimentos de onda (λ) varia de 40 a 400 nm. Esta radiação pode ser produzida artificialmente por diferentes fontes, como por exemplo, as lâmpadas de deutério, xenônio, fluorescentes e de vapor de mercúrio, a qual é a fonte mais utilizada no preparo de amostras (KRUG, 2008).

A decomposição por radiação UV tem sido amplamente explorada, na mineralização de amostras líquidas, como águas naturais, efluentes de sistemas de tratamento de esgoto doméstico e industriais, fluidos biológicos, bebidas e extratos de solos (GOLIMOWSKI; GOLIMOWSKA, 1996). Porém não é muito empregada para amostras que possuam grande quantidade de matéria orgânica, devido a esta dispor por longos períodos de irradiação (CAVICCHIOLI; GUTZ, 2003).

Mesko et al., (2015), investigaram a combinação da radiação UV com a radiação micro-ondas na decomposição de amostras de macroalgas coletadas da Antártica. Segundo os autores essa combinação aumentou a eficiência na mineralização, permitindo menor consumo de ácidos. A decomposição das amostras foi realizada apenas com o uso de HNO_3 e após a quantificação por ICP-MS a exatidão do método (para As, Cd e Pb) foi comprovada através da análise de material de referência certificado (recuperações de 95%) (MESKO et al., 2015).

Domingos et al., (2016), investigaram a concentração de Zn, Cd, Pb e Cu em amostras de efluentes petroquímicos. Através de um planejamento fatorial, foi feita a avaliação da mistura dos reagentes oxidantes e tempo de exposição a irradiação UV. Encontrada as condições ditas como ótima, os autores optaram pelo uso de HNO_3 , H_2O_2 e 75 minutos de irradiação. As recuperações obtidas variaram de 80 a 120% para os quatro elementos investigados, evidenciando exatidão no método proposto (DOMINGOS et al., 2016).

3.4 Técnicas para quantificação de Se

3.4.1 Técnicas espectrométricas

A Espectrometria de Absorção Atômica é dos métodos mais utilizados na determinação de elementos em uma variedade de matrizes sejam elas amostras líquidas ou sólidas (AMORIM, 2008). Dentre os tipos de atomizadores utilizados nesse tipo de análise tem-se: chama, forno de grafite e geração de hidretos (HAGE; CARR, 2011). A atomização por chama fornece boa sensibilidade quando deseja-se determinar concentrações na ordem de mg L^{-1} , no entanto para determinar concentrações na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} a mesma não pode ser utilizada, devido ao tempo reduzido de permanência dos átomos no caminho óptico e conseqüentemente altos valores de limites de quantificação são obtidos (WELZ; SPERLING, 1999).

A atomização por forno de grafite fornece alta sensibilidade quando comparada a chama, pois a amostra é introduzida em um forno de volume confinado, sendo maior a permanência dos átomos no caminho óptico, assim a amostra é atomizada em um curto intervalo de tempo (WELZ; SPERLING, 1999).

Já a atomização por geração de hidretos aumenta a sensibilidade para elementos que formam hidretos (WELZ; SPERLING, 1999), dentre os quais o Se encaixa-se (COELHO; BACCAN, 2004). Essa técnica baseia-se na conversão da espécie de interesse em um hidreto gasoso, que por meio de um gás de arraste é transportado até o atomizador, onde ocorre a atomização. Esse processo divide-se em três etapas: geração, transporte e atomização do hidreto volátil (WELZ; SPERLING, 1999). Nestas circunstâncias a geração de hidretos apresenta vantagens frente ao forno e chama, pois apenas o analito forma a espécie volátil e o transporte do mesmo para o atomizador pode atingir cerca de 100% obtendo-se menores limites de detecção e maior sensibilidade (TAKASE et al., 2002).

Viitak e Volynsky (2006) quantificaram Se em 2 algas coletada em diferentes locais da região Estoniana do mar Báltico. As concentrações quantificadas foram através da GF AAS e variaram de 0,22 a 0,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ para a alga vermelha (*Furcellaria*

lumbricalis) e para a alga parda (*Fucus vesiculosos*) as concentrações variaram de 0,014 a 0,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ (VIITAK; VOLYNSKY, 2006).

Seixas e Moreira (2007) determinaram Se em tecido muscular e fígado de três espécies de peixes coletados na Baía de Guanabara (Rio de Janeiro). Utilizando GF AAS os autores quantificaram Se na faixa de 0,07 a 0,29 $\mu\text{g g}^{-1}$ (SEIXAS; MOREIRA, 2007).

Tuzen et al., (2009) avaliaram a concentração de Se em 10 espécies de algas coletadas no mar da Turquia por GF AAS e as concentrações quantificadas variaram de 0,5 a 44,6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (TUZEN et al., 2009).

A Espectrometria de Emissão Atômica e a Espectrometria de Massa são também utilizadas na determinação de Se em amostras ambientais. A Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-AES, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*) caracteriza-se por linhas de emissão geradas através de um plasma indutivo com temperatura capaz de promover a excitação de uma série de elementos (GINÉ, 1998). Já a Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*) é uma técnica largamente usada na determinação simultânea de uma série de elementos onde os íons formados no plasma são introduzidos no analisador de massas, e selecionados conforme sua razão massa carga para posterior quantificação (THOMAS, 2013).

Farias et al., (2002), quantificaram Se por ICP-OES em 11 espécies de macroalgas coletadas na estação de Juban, base Argentina, perto de Potter Cove na ilha de King George. Dentre estas, Se foi quantificado na macroalga vermelha (*Monostroma hariotti*) e a concentração obtida foi de 6,55 $\mu\text{g g}^{-1}$ (FARIAS et al., 2002).

Soares et al., (2012), determinaram dentre outros elementos o Se na microalga verde (*Chlorella sp*) adquirida comercialmente e produzida em laboratório. Utilizando ICP-MS os autores quantificaram Se na concentração de 0,089 $\mu\text{g g}^{-1}$ (SOARES et al., 2012).

Turner, (2013), utilizando ICP-MS avaliou a concentração de Se em sedimentos e em diferentes organismos marinhos coletados de diferentes lugares do estuário do Sudoeste da Inglaterra. Dentre estas amostras, Se foi quantificado nas macroalgas

pardas (*Fucus vesiculosos*) e (*Fucus ceranoides*) com concentrações que variaram de 0,05 a 0,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,05 a 0,51 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (TURNER, 2013).

Piñeiro-Moreda et al., (2013) quantificaram Se em frutos do mar e algas marinhas (obtidas comercialmente do fabricante local). Utilizando ICP-MS foram quantificadas as concentrações de Se em 7 espécies de algas que variaram de 49 a 230 ng g^{-1} (PIÑEIRO-MOREDA et al., 2013).

Malea e Kevrekidis, (2014) investigaram a concentração de Se em 26 espécies de algas coletadas do Golfo de Thessaloniki, no norte do mar Egeu no Mediterrâneo Utilizando ICP-MS os autores quantificaram concentrações de Se que variaram de 0,6 a 11,06 $\mu\text{g g}^{-1}$ (MALEA; KEVREKIDIS, 2014).

Cabrira et al., (2016) avaliaram a concentração de Se em alga marinhas coletadas da costa central e norte em Portugal. Utilizando ICP-MS foram quantificadas concentrações de Se em 15 espécies de macroalgas que variaram de 0,71 a 2,65 mg kg^{-1} (CABRITA et al., 2016).

Singh et al., (2016) avaliaram diferentes elementos em 5 espécies de algas. Dentre estas, Se foi quantificado na microalga verde (*Hydrodictyon reticulatum*) utilizando ICP-MS e as concentrações obtidas foram de 194 mg kg^{-1} (SINGH et al., 2016).

3.4.2 Técnicas voltamétricas

A voltametria é uma técnica eletroquímica e/ou eletroanalítica onde obtém-se informações qualitativas e quantitativas de uma espécie de interesse através do registro das curvas de corrente versus potencial denominado voltamograma (WANG, 2000).

A voltametria originou-se a partir da polarografia que foi descoberta por Jaroslav Heyrovsky em 1920. Na voltametria é aplicado uma diferença de potencial entre o eletrodo trabalho e o eletrodo de referência, essa diferença aumenta a resistência do eletrodo de referência e diminui a do eletrodo auxiliar. A reação redox ocorre no eletrodo trabalho e as informações qualitativas e quantitativas do analito são registradas através de um voltamograma (WANG, 2000).

Diferentes tipos de eletrodos são usados em voltametria, como eletrodos de metais como platina e ouro (WANG, 2000), carbono vítreo (GCE, do inglês *Glassy Carbon Electrode*) (WANG, 2000), filme de mercúrio (TMFE, do inglês *Thin Mercury Film Electrode*) (WANG, 2000), pasta de carbono (CPE, do inglês *Carbon Past Electrode*) (WANG, 2000), gota de mercúrio pendente (HMDE, do inglês *Hanging Mercury Drop Electrode*) (WANG, 2000), entre outros.

Entre os eletrodos citados, o eletrodo mais usado é o de mercúrio no modo HMDE e existem razões para isso, dentre as quais se destaca a reprodutibilidade, e a ampla faixa de potencial, onde o limite da faixa útil de trabalho no eletrodo de mercúrio pode variar de -2 V para a região catódica e de + 0,2V para a região anódica (BRETT, 1996).

No que se refere à segurança ambiental, os mecanismos de formação da gota de mercúrio em equipamentos modernos, produz uma gota com uma área pequena, gerando o mínimo de risco ambiental e exposição ao analista (ACHTERBERG; BRAUNGARDT, 1999).

A Voltametria de Redissolução (SV, do inglês *Stripping Voltammetry*) é uma técnica sensível, amplamente utilizada na determinação de compostos à níveis traço (WANG, 2000). A principal vantagem dessa técnica é atribuída a etapa de deposição, onde a espécie de interesse pode ser depositada como maior eficiência na superfície do eletrodo, de modo que a corrente seja menos perturbada pela corrente residual (BARD; FAULKNER, 1980).

Essa técnica consiste de duas etapas, a primeira envolve a deposição eletrolítica do analito no eletrodo trabalho e a segunda etapa envolve a redissolução do analito depositado no eletrodo para a solução (WANG, 2000). Na etapa de redissolução se utiliza a Voltametria de Pulso Diferencial (DPV, do inglês *Differential Pulse Voltammetry*) ou a Voltametria de Onda Quadrada (SWV, do inglês *Square Wave Voltammetry*) (BARD; FAULKNER, 1980).

Na DPV um pulso de magnitude constante é sobreposto a uma rampa de potencial aplicado no eletrodo trabalho. A corrente é amostrada duas vezes, antes e após a aplicação do pulso, então a diferença de corrente é plotada *versus* ao potencial aplicado. A resposta voltamétrica obtida geralmente é proporcional a concentração do

analito presente em solução (WANG, 2000). Já a SWV é uma técnica diferencial de grandes amplitudes, na qual uma forma de onda, composta de uma onda quadrada simétrica é sobreposta em uma escada de potencial é aplicado no eletrodo trabalho (WANG, 2000). A corrente é amostrada duas vezes a cada ciclo da onda quadrada, uma vez no final do pulso no sentido da varredura direta e outra ao final do pulso reverso o que faz com que a sensibilidade da SWV seja maior do que a DPV. Outra vantagem da SWV é em relação à rapidez das análises (WANG, 2000).

Liu et al., (1987) quantificaram Se em 8 espécies de algas verde, vermelha e parda coletadas da costa da China utilizando a Voltametria de Resolução Catódica (CSV, do inglês *Cathodic Stripping Voltametry*) e as concentrações variaram de 0,09 a 0,61 $\mu\text{g g}^{-1}$ (LIU et al., 1987).

Martin, Huang e Yoon (1994) quantificaram Fe, Mn, Cu, Ni e Cd na alga verde *Ulva*, utilizando a Voltametria de Redissolução Catódica por Pulso Diferencial (DPCSV, do inglês *Differential Pulse Cathodic Stripping Voltametry*). A concentração quantificada foi 9,67; 1,64; 0,10; 0,04 e 0,001 $\mu\text{mol g}^{-1}$ para Fe, Mn, Cu, Ni e Cd, respectivamente (MARTIN; HUANG; YOON, 1994).

Lambert e Turoczy (2000) quantificaram 3,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se em tecido de peixe usando a DPCSV (LAMBERT; TUROCZY 2000).

Tamayo et al., (2014), utilizando a SWV quantificaram Cd, Pb e Cu na macroalga parda (*Sargasun natan*) e as concentrações foram de 0,528; 6,7 e 1,49 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (TAMAYO et al., 2014) e Almeida et al., (2017), mineralizando a macroalga verde *Pyropia endiviifolia* por MAD quantificaram Zn, Cd, Pb e Cu por SWASV e as concentrações obtidas foram de 17,9; 0,03; 0,77 e 2,95 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (ALMEIDA et al., 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instrumentação

Potenciostato/Galvanostato PGSTAT 302 N (Autolab), conectado à uma interface IME 663 (Autolab) e VA Stand 663 (Metrohm) (Suíça), gerenciado pelo software Nova 2.0 foi utilizado nas determinações voltamétricas de Se. Os dados foram tratados através do programa Origin Pro 9.0. A célula voltamétrica utilizada nas análises foi de quartzo, consistindo de três eletrodos, sendo de trabalho HMDE, o referência de Ag/AgCl/KCl 3 mol L⁻¹ e o auxiliar de carbono vítreo.

Para a mineralização das amostras foi utilizado um forno micro-ondas, modelo Multiwave 3000 (Anton Paar, Áustria) equipado com oito frascos de quartzo.

Para a determinação da atividade antioxidante, foi utilizado um espectrofotômetro de Absorção Molecular Ultravioleta-Visível (UV-vis) de duplo feixe modelo UV – 2550 (Shimadzu, Japão), equipado com duplo monocromador e cubetas de vidro com 1,0 cm de caminho óptico.

Também foi utilizada balança analítica (Acculab, Sartorius, Alemanha) e sistema de purificação de água com resistividade 18,2 MΩ cm⁻¹ (Millipore, modelo Milli-Q Direct-Q UV3®, Alemanha).

4.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. HNO₃ 65% destilado (Vetec, Brasil), H₂SO₄ 98% (Neon, Brasil), HCl 37% destilado (Synth, Brasil), H₃PO₄ 85% (Vetec, Brasil), Pd(NO₃)₂ (Assurance®, Spex CertiPrep, EUA), metanol HPLC (J.T Baker, USA), DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich). A solução trabalho de Se 250 nM, foi preparada diariamente, a partir de uma solução intermediária de Se de 10 mg L⁻¹. Esta solução intermediária foi preparada a partir de uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ (Grupo Química GQ, Bélgica). A solução trabalho de Cu (1,6 mM) foi preparada a partir da solução estoque de Cu de 1000 mg L⁻¹ (GQ, Bélgica). Além destas, foram preparadas soluções de 5 mg L⁻¹ dos íons

interferentes a partir de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ de Fe, Zn, Mn, Cr, Sn, Pb, As, Cd, Cu, Sb, Ca, Ni, Bi, Ba, Al, V e Te (ASSURANCE SprexCertiprex - EUA). HCl (Synth, Brasil) foi utilizado para o preparo do eletrólito da análise voltamétrica. NaBH₄ (0,2%) (Vetec, Brasil) e NaOH (0,05%) (Merck, Alemanha) foram utilizados nas análises por HG AAS. A solução DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich) foi preparada pela dissolução de 0,05 g do produto em 100 mL de etanol, a fim de se obter a solução DPPH 1,27 mmol L⁻¹. Desta pipetou-se 8 mL e dilui-se em 50 mL de metanol para a obtenção da solução trabalho 0,203 mmol L⁻¹.

4.3 Controle de contaminação

Todos os materiais (plástico e vidro) utilizados nesse trabalho foram mantidos em uma solução de HNO₃ 10% (v/v) por 24 horas para a descontaminação. Antes da utilização os materiais foram lavados com água ultrapura em abundância. A descontaminação das células voltamétricas foi realizada em solução de HNO₃ 20%.

4.4 Coleta e preparo das amostras

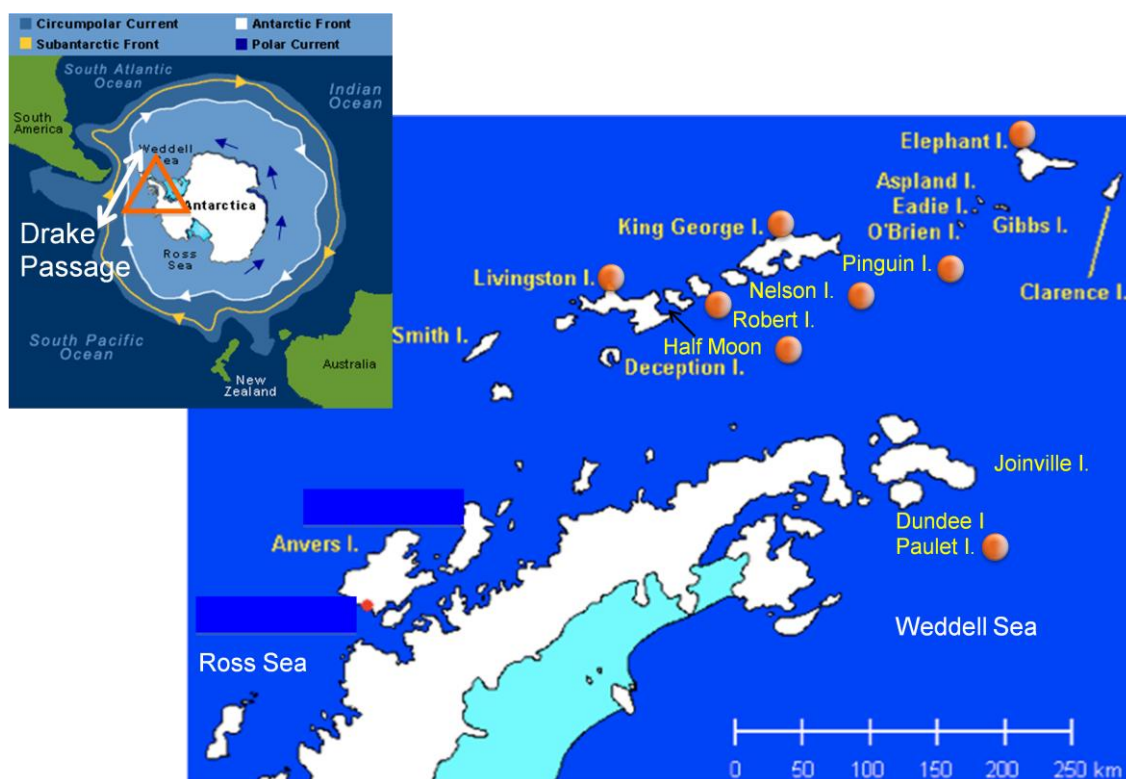
As macroalgas utilizadas neste trabalho foram as *Rhodophytas* (*Georgiella confluens*, *Curdiea racovitzae*, *Iridaea cordata*) e as *Phaeophytas* (*Adenocystis utricularis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Ascoseira mirabilis*, *Desmarestia anceps*, *Himantothallus grandifolius*), coletadas em diferentes locais da Antártica no período de Dezembro de 2013, conforme descrito na Tabela 2 e fornecidas pelo Laboratório de Heterociclos Bioativos e Bioprospecção (LAHBBio) do centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. As amostras foram liofilizadas, moídas e armazenadas a temperatura ambiente no escuro até o momento da manipulação das mesmas.

Tabela 2 - Macroalgas coletadas em diferentes locais da Antártica

Classificação	Macroalga^a	Local da coleta	Coordenadas	Data da coleta
	<i>Adenocystis utricularis</i>	Ilha de Robert	62° 22' x 59° 41'	06/12/2013
	<i>Cystosphaera jacquinotii</i>	Ilha de Half Moon	62° 35' x 59° 54'	04/12/2013
<i>Phaeophyta</i>	<i>Ascoseira mirabilis</i>	Ilha de Livingston, Punta Hannah	62° 39' x 60° 36'	05/12/2013
	<i>Desmarestia anceps</i>	Ilha de Livingston, Punta Hannah	62° 39' x 60° 36'	05/12/2013
	<i>Himantothallus grandifolius</i>	Ilha de Half Moon	62° 35' x 59° 54'	04/12/2013
	<i>Georgiella confluens</i>	Ilha de Robert	62° 22' x 59° 41'	06/12/2013
<i>Rhodophyta</i>	<i>Curdiea racovitzae</i>	Ilha de Livingston, Punta Hannah	62° 39' x 60° 36'	05/12/2013
	<i>Iridaea cordata</i>	Ilha de Deception, Whalers Bay	62° 58' x 60° 33'	02/12/2013

^aTemperatura da água na coleta (-1°C - 0°C)

Figura 3- Mapa demonstrativo do continente Antártico com a localização de algumas ilhas dentre elas as utilizadas para a coleta das amostras em estudo.



Paras as determinações de Se por SWV as amostras foram decompostas por MAD de acordo com o estabelecido por Soares et al., (2012). Cerca de 0,3 g de amostra foram pesadas e transferidas para tubos de quartzo, onde permaneceram com 6 mL de HNO₃ destilado em pré-mineralização por 1 hora. Passado este período, os frascos foram submetidos ao seguinte programa de irradiação: 15 min a 1400 W (rampa de aquecimento) e 20 min a 0 w (resfriamento). Após o resfriamento, as amostras foram transferidas para tubos de polipropileno e o volume aferido a 30 mL com água ultrapura.

Para a obtenção dos extratos algais foi utilizado o método estabelecido por Marxen et al. (2007) que consistiu na maceração das amostras em grau e pistilo, seguido da adição de 0,5 g de amostra macerada em tubos falcon em 5 mL de metanol, que foram submetidos ao banho de ultrassom durante 30 minutos e filtrados em papel filtro (MARXEN et al., 2007).

4.5 Parâmetros avaliados na determinação voltamétrica de Se por DPV e SWV

As respostas voltamétricas de Se foram avaliadas por meio de dois métodos voltamétricos. Para DPV foram avaliados o efeito da concentração de Cu (8, 16 e 24 μM), o efeito dos eletrólitos (HCl, HNO_3 , H_2SO_4 , H_3PO_4), o potencial de deposição (de -0,1 a -0,5V) e a velocidade de varredura (de 5 a 120 mV s^{-1}). Para SWV foram avaliados a frequência (de 20 a 80 Hz) e amplitude (de 0,01 a 0,15 V).

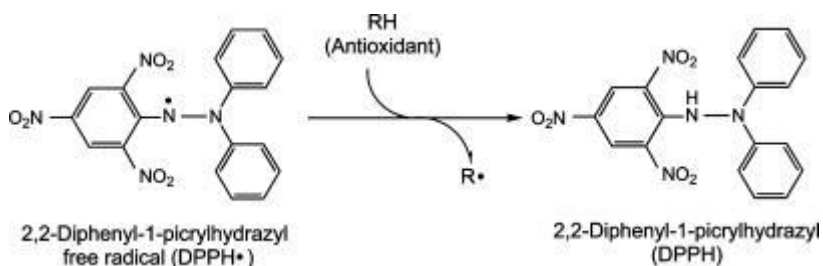
4.6 Determinação de Selênio por SWV

A célula voltamétrica foi constituída por 20 mL de eletrólito (HCl 100 mM e Cu 140 μM) e 0,4 mL de amostra. Esta mistura foi desaerada com fluxo de gás N_2 de alta pureza (99,8%) por 300 s e a determinação de Se foi realizada por SWV. A etapa de deposição de íons Se foi executada sob agitação a um potencial de -0,4 V por 420 s e a varredura de potenciais utilizada foi de -0,4 a -0,8 V. Os parâmetros voltamétricos utilizados foram: $E_{\text{deposição}} = -0,4 \text{ V}$, $E_{\text{inicial}} = -0,4$, $E_{\text{final}} = -0,8 \text{ V}$, $t_{\text{deposição}} = 420 \text{ s}$, $E_{\text{step}} = -0,005$, amplitude = 0,08 V e frequência = 60 Hz. O método de calibração utilizado foi o de adição padrão, por meio de 5 adições sucessivas de 100 μL de uma solução de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se na célula voltamétrica, perfazendo concentrações de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos os ensaios descritos nesse item foram realizados em triplicata.

4.7 Determinação da atividade antioxidante

A partir dos extratos obtidos no item 4.4 conduziu-se a avaliação da atividade antioxidante empregando o método DPPH proposto por Brand-Willians et al., (1995) cujo esquema da reação está representada na Figura 4

Figura 4- Esquema de reação entre o radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e um composto antioxidante (MOON e SHIBAMOTO, 2009).



Portanto um volume de 1,48 mL de DPPH 0,203 mmol L⁻¹ foi adicionado a 1,5 mL de extrato e 20 µL de metanol 100%, essa mistura resultou na concentração de 0,1 mmol L⁻¹. Adicionalmente, preparou-se o branco da amostra (1,5 mL do extrato em 1,5 mL de solução metanólica 100%). Paralelamente foi preparado o controle do DPPH onde 1,48 mL de DPPH 0,203 mmol L⁻¹ foi adicionado a 1,52 mL de metanol 100%. Após 30 minutos de reação sob abrigo da luz, foi realizada a análise da capacidade do DPPH em reduzir-se na presença de substâncias antioxidantes, através do decréscimo da absorbância a 515 nm em espectrômetro UV-vis (BRAND-WILLLIANS et al.,1995). A porcentagem da atividade antioxidante foi calculada conforme equação 1

$$AA (\%) = ((X_1 - (X_2 - X_3)) / X_1) \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

AA = atividade antioxidante

X₁ = absorbância do DPPH controle

X₂ = absorbância da amostra

X₃ = absorbância do branco

4.8 Validação do método voltamétrico

Os parâmetros de mérito avaliados neste trabalho foram limite de detecção (LD, do inglês *Limit of Detection*) e de quantificação (LQ, do inglês *Limit of Quantification*) instrumentais e do método, exatidão, precisão e faixa linear.

Para os cálculos dos limites de detecção e quantificação instrumentais, analisou-se 10 vezes o eletrólito (20 mL de eletrólito composto por HCl 100 mM, e Cu 140 µM) e o valor de corrente obtido para o sinal do potencial de pico (E_p) do Se (-0,60 V) foi utilizado para os cálculos através das equações 2 e 3

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

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

Onde:

s = estimativa do desvio padrão referente a dez leituras do branco;

S = coeficiente angular da curva analítica.

Para os cálculos dos limites de detecção e quantificação do método, analisou-se 10 vezes o branco (20 mL de eletrólito composto por HCl 100 mM, e Cu 140 µM e 0,4 mL do branco da amostra mineralizada) e o valor de corrente obtido para o sinal do E_p do Se foi utilizado para os cálculos, através das equações 2 e 3. Para o cálculo levou-se em consideração a massa de amostra e volume aferido após a etapa de mineralização.

A avaliação da exatidão foi realizada através da análise do material de referência certificado *Peach Leaves* (NIST 1547).

4.9 Efeito Matriz

O efeito matriz foi calculado conforme a equação 4 (ECONOMOU et al., 2009).

$$EM (\%) = \frac{x_1 - x_2}{x_2} \times 100 \quad (\text{equação 4})$$

Onde:

x_1 = coeficiente angular obtido da curva na amostra mineralizada;

x_2 = coeficiente angular obtido da curva no branco mineralizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização dos métodos voltamétricos

Com intuito de obter as melhores condições quanto à sensibilidade e resolução voltamétrica para a determinação de Se, foi realizada a otimização de dois métodos voltamétricos: pulso diferencial e onda quadrada.

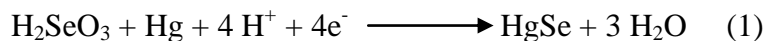
No método por DPV, os parâmetros avaliados foram: avaliação da concentração de Cu, avaliação da influência da concentração do eletrólito, influência do potencial de deposição (E_{dep}) e efeito da velocidade de varredura. No método por SWV, os parâmetros avaliados foram: frequência e amplitude.

5.1.1 Voltametria de Pulso Diferencial

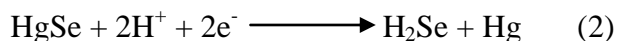
5.1.1.1 Efeito da concentração cobre

A Voltametria de CSV é o método frequentemente usado para a determinação de Se. A determinação baseia-se na eletrodeposição dos íons Se na superfície do eletrodo de gota de mercúrio pendente em meio ácido seguida da redissolução do mesmo (MATTSSON et al., 1994; PIECH; KUBIAK, 2007). Esse método envolve dois principais mecanismos demonstrados das equações 1 e 2:

* Formação do seleneto de mercúrio (HgSe) durante a etapa de deposição (PANIGATI et al., 2007).



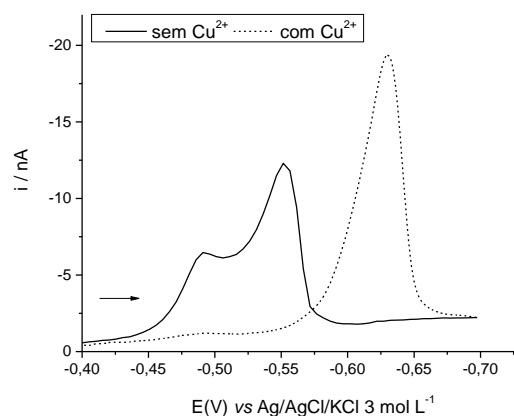
* Redução do HgSe durante a etapa de redissolução (PANIGATI et al., 2007; ADELOJU; BOND, 1983).



É conhecido que o método para a determinação de Se na presença de íons Cu^{2+} fornece picos com maior intensidade de corrente, melhor sensibilidade do método (resultando em baixos limites de detecção) e é menos suscetível a interferências de íons metálicos, do que se realizado sem a adição de Cu^{2+} (FERRI et al., 2007).

Levando-se isso em consideração foi realizada a avaliação do efeito da adição de íons Cu na resposta voltamétrica de Se por DPCSV conforme está demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Voltamogramas obtidos por DPCSV com e sem adição de Cu^{2+} . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$

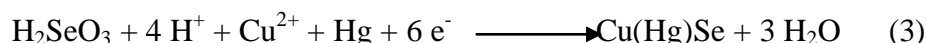


Conforme se observa na Figura 5, sem adição de íons Cu (linha contínua) o pico para Se apresentou uma má resolução, porém quando adicionado Cu (linha pontilhada) houve melhora na resolução do pico e aumento na intensidade de corrente do mesmo, como já esperado e relatado por Adeloju e Bond (1983) assim como por Oveisi et al., (2002). Pode-se também observar o deslocamento do potencial de redução para potenciais mais catódicos assim como o descrito por Zuman e Somer (2000) e isso ocorre devido à formação do composto intermetálico Cu_2Se na superfície do eletrodo (OVEISI et al., 2002).

Segundo Mattsson et al., (1994) na etapa de redissolução, a espécie Se^{2+} (HgSe – ver equação 2) se reduz fornecendo voltamogramas com baixa resolução (2 picos sobrepostos) e isso ocorre pois uma pequena quantidade de Se interage com a superfície

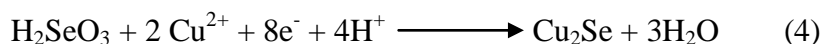
do eletrodo (uma vez que Se não apresenta alta solubilidade no Hg) na etapa de deposição representada pela equação 1 (MATTSSON et al., 1994).

Adeloju e Bond, (1983) e Oveisi et al., (2002) contornaram esse problema adicionando íons Cu no meio antes da etapa de deposição, facilitando assim a solubilização do Se na superfície do eletrodo através da formação do complexo estável de Cu(Hg)Se, conforme descrito na equação 3 (OVEISI et al., 2002).

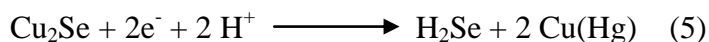


Portanto, para a determinação de Se é importante à adição de íons Cu^{2+} . Sendo assim, o Se é depositado na superfície do eletrodo como Cu_2Se (equação 4) e é redissolvido (equação 5), conforme descrito a seguir (FERRI et al., 2007).

* deposição:



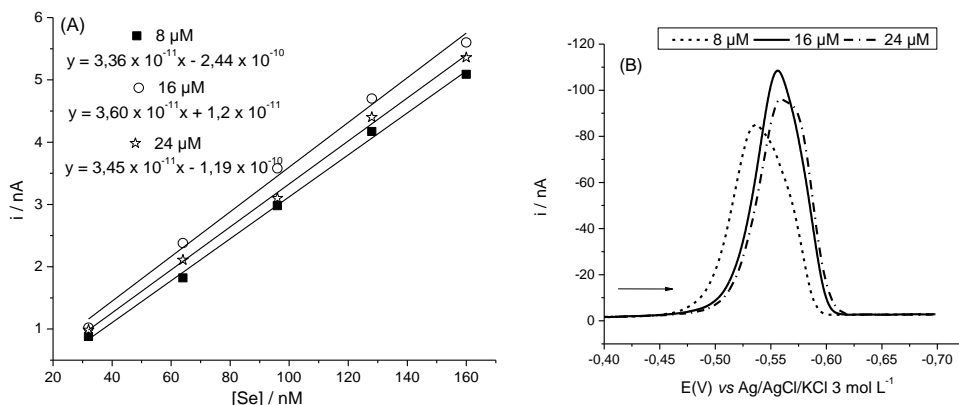
* redissolução:



Uma vez conhecido que o Cu afeta a resposta voltamétrica de Se, investigou-se o efeito da concentração do mesmo na corrente de pico de redução do composto intermetálico Cu_2Se em meio ácido (HCl 100 mM). As concentrações de Cu estudadas foram 8, 16 e 24 μM .

Na Figura 6 (A) e (B) são demonstradas às curvas analíticas obtidas quando se utilizou as diferentes concentrações de Cu e os seus voltamogramas, respectivamente.

Figura 6 - Curvas analíticas de Se com adição de 8, 16 e 24 μM de Cu^{2+} (A) e os respectivos voltamogramas obtido por DPCSV (B). Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com íons Cu e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



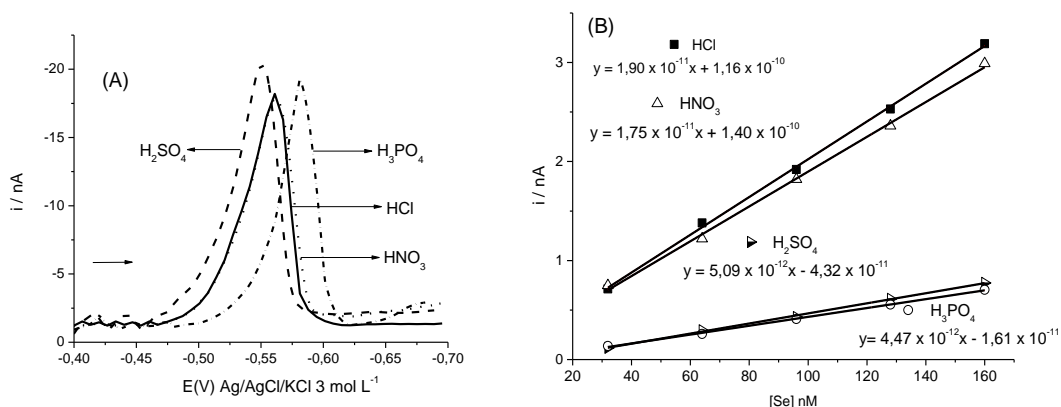
Conforme demonstrado na Figura 6 (A), a curva de concentração de 16 μM apresenta uma inclinação cerca de 6,7% maior que a curva de concentração de 8 μM e cerca de 4,2% maior que a de 24 μM . Já a inclinação da curva de concentração de 24 μM é cerca de 2,6% maior que a de 8 μM . Portanto conforme os valores obtidos (porcentagem), pode-se inferir que se utilizando 16 μM de Cu, além de maior sensibilidade analítica, um melhor perfil voltamétrico (resolução) foi obtido, conforme está demonstrado na Figura 6 (B). Assim, com essa concentração de Cu, maiores valores de corrente foram obtidos devido à formação do Cu_2Se como já esperado e relatado por Mattsson et al., (1994) que investigou a formação desse composto em solução aquosa (MATTSSON et al., 1994). Cabe salientar que esta concentração foi utilizada por Nascimento et al., (2009), sendo reportada como suficiente para a formação do Cu_2Se em meio salino (NASCIMENTO et al., 2009). Desta forma, a concentração de 16 μM foi à concentração de Cu utilizada nos experimentos seguintes.

5.1.1.2 Avaliação do eletrólito

A avaliação de diferentes eletrólitos foi realizada com intuito de verificar suas influências na determinação voltamétrica de Se. A escolha do eletrólito suporte é importante, já que em voltametria deseja-se que as condições experimentais sejam

ajustadas para que o transporte de massa seja efetivo e que ocorra preferencialmente por difusão (WANG, 2000). Portanto, o eletrólito suporte deve apresentar as seguintes propriedades: alta solubilidade, alto grau de ionização, ser estável quimicamente, eletroquimicamente inerte, não deve sofrer hidrólise e nem formar complexos com íons em solução (AGOSTINHO; RUTH, 2004) Uma vez que é conhecido que a determinação de Se por voltametria ocorre preferencialmente em meio ácido (MATTSSON et al., 1994), os eletrólitos avaliados foram HCl, H₃PO₄, HNO₃ e H₂SO₄ (com concentração de 100 mM). Para a escolha do melhor eletrólito suporte avaliou-se aquele que apresentou melhor perfil voltamétrico para Se e maior sensibilidade (inclinação da curva). Na Figura 7 estão demonstrados os respectivos voltamogramas.

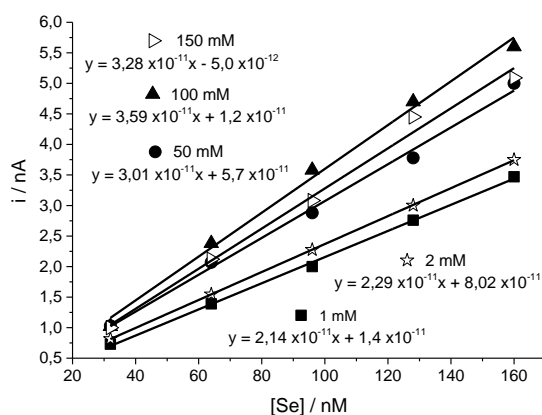
Figura 7 - Voltamogramas de Se obtidos por DPCSV (A) e (B) curvas analíticas para Se (32 a 160 nM) em HCl, H₃PO₄, HNO₃ e H₂SO₄. Condições experimentais: 10 mL de eletrólito e 16 μM de Cu²⁺. E_{dep} = -0,4 V, E_i = -0,4 V, E_f = -0,7 V, t_{dep} = 90 s, ν = 5 mV s⁻¹.



Conforme observado na Figura 7 (A) os quatro eletrólitos testados apresentaram perfis voltamétricos semelhantes. No entanto, para melhor interpretação dos resultados foram plotadas as curvas analíticas de Se em cada eletrólito (Figura 7 B), a fim de verificar em qual se obtém uma curva de maior sensibilidade. Dentre os eletrólitos avaliados, o HCl e o HNO₃ apresentaram sensibilidade semelhantes (inclinação da curva analítica), no entanto o HCl apresenta uma inclinação de cerca de 7,9% maior que o HNO₃ e por esse motivo que o HCl foi o escolhido para as próximas análises. Estabelecido o eletrólito, avaliou-se a concentração do mesmo, com intuito de

identificar qual a concentração mais adequada de HCl a ser utilizada. Os resultados estão demonstrados na Figura 8.

Figura 8 - Curvas analíticas de Se obtidas para as diferentes concentrações de HCl (1, 2, 50, 100 e 150 mM HCl). Condições experimentais: 10 mL do eletrólito e 16 μ M de Cu^{2+} . $E_{\text{dep}} = -0,4$ V, $E_i = -0,4$ V, $E_f = -0,7$ V, $t_{\text{dep}} = 90$ s, $v = 5$ mV s $^{-1}$.

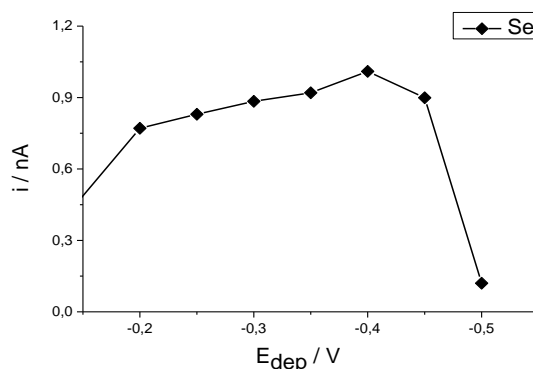


Conforme se observa na Figura 8 a concentração do eletrólito que proporcionou a maior sensibilidade dentre as curvas foi com 100 mM, uma vez que nessa concentração obteve-se uma inclinação de cerca de 8,63% e de 16,1% maior que a concentração de 150 e 50 mM, respectivamente. Por esse motivo, optou-se por trabalhar nas próximas análises com o eletrólito HCl 100 mM. Cabe salientar que HCl 100 mM foi também avaliado por Zuman e Somer (2000) e considerado como o melhor (ZUMAN; SOMER, 2000).

5.1.1.3 Avaliação do potencial de deposição

Para a avaliação do efeito do E_{dep} na resposta voltamétrica de Se, os potenciais avaliados foram de -0,1 a -0,5 V e os resultados estão demonstrados na Figura 9.

Figura 9 - Influência do potencial de deposição na corrente de pico de redução de Cu_2Se . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com 16 μM de Cu^{2+} e 32 nM de Se. $E_i = -0,4$ V, $E_f = -0,7$ V, $t_{\text{dep}} = 90$ s, $v = 5$ mV s^{-1} .

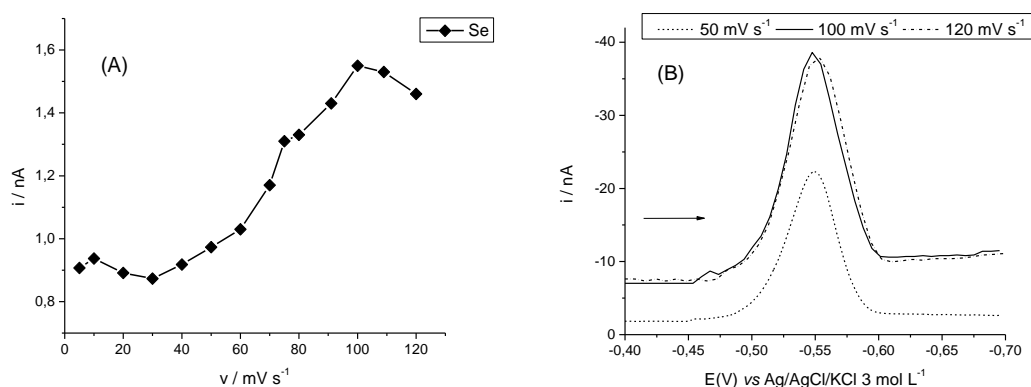


Conforme pode ser observado na Figura 9, a maior intensidade de pico de redução de Cu_2Se ($i = 1,01 \times 10^{-9}$ A) foi obtida quando foi aplicado potencial de -0,4 V. Em potenciais mais positivos, as intensidades de corrente foram menores e isso se deve a formação incompleta do composto intermetálico Cu_2Se (OVEISI et al., 2002). Em potenciais mais negativos que -0,4 V ocorreu um decréscimo na corrente possivelmente devido a este potencial ser muito próximo ao potencial de redução de Cu_2Se (VAN DEN BERG; KHAN, 1990). Desse modo, o potencial utilizado para os seguintes experimentos foi de -0,4 V.

5.1.1.4 Avaliação do efeito da velocidade de varredura

A escolha da velocidade de varredura é importante de modo que esse parâmetro pode afetar a resolução do sinal analítico e a sensibilidade do método voltamétrico (ALEIXO, 2003). As Figuras 10 A e B estão demonstrando o efeito da velocidade de varredura (5 a 120 mV s^{-1}) na corrente de pico de redução de Cu_2Se e os voltamogramas, respectivamente.

Figura 10 - Variação da corrente de pico de Cu_2Se em função da velocidade de varredura (A) e (B) voltamogramas obtidos por DPCSV para as velocidades de varredura de 50, 100 e 120 mV s^{-1} . Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com $16\mu\text{M}$ de Cu^{2+} e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$.



Como pode ser observado na Figura 10 (A), há um aumento da corrente de pico com um valor máximo para a velocidade de 100 mV s^{-1} . Em velocidades menores e maiores que 100 mV s^{-1} , as intensidades de corrente foram menores. Adicionalmente, na Figura 10 (B) observou-se que em 100 mV s^{-1} a resolução do sinal analítico não foi prejudicada. Portanto, optou-se por trabalhar com a velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} , uma vez que nessa velocidade obteve-se a maior intensidade de corrente.

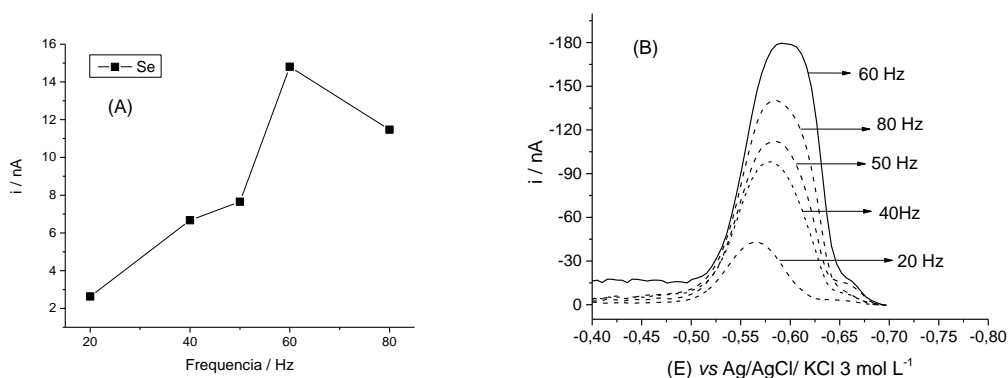
5.1.2 Voltametria de Onda Quadrada

5.1.2.1 Avaliação do efeito da frequência

A frequência é um dos parâmetros importantes da SWV, pois pode influenciar a intensidade do sinal voltamétrico, o que conseqüentemente, reflete diretamente na sensibilidade (SOUZA; MACHADO, 2003). Para isso, foram realizados experimentos variando as frequências de 20 a 80 Hz (com incrementos de 20 Hz) fixando-se a amplitude em 0,08 V. Cabe destacar que para as frequências de 20, 40, 50, 60 e 80 Hz, as varreduras ocorreram em velocidades de 100, 200, 250, 302 e 402 mV s^{-1} ,

respectivamente. As Figuras 11 A e B mostram a influência da frequência na corrente de pico de redução do Cu_2Se e os voltamogramas, respectivamente.

Figura 11 - Variação da intensidade de corrente de pico de Cu_2Se em função da variação da frequência (A) e (B) os respectivos voltamogramas. Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com 16 μM de Cu^{2+} e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,8 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $Amp = 0,08 \text{ V}$.

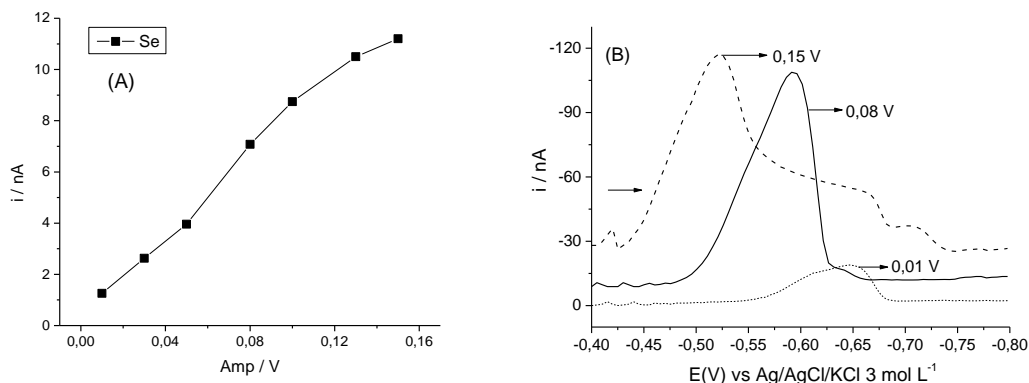


Conforme se observa na Figura 11 (A), a intensidade do sinal aumenta conforme o aumento da frequência de 20 a 60 Hz. A partir de 60 Hz a intensidade do sinal diminui. Desse modo, a frequência escolhida foi de 60 Hz, onde se obteve maior intensidade de corrente de pico de redução para Cu_2Se e a resolução não foi afetada, conforme demonstra a Figura 11 (B).

5.1.2.2 Avaliação do efeito da amplitude

Geralmente com o aumento da amplitude obtêm-se intensidades de corrente de pico maiores, proporcionando o aumento na sensibilidade. Contudo elevados valores de amplitude podem provocar alargamentos nos picos reduzindo consequentemente a resolução do sinal analítico (ALEIXO, 2003). Nas Figuras 12 A e B está demonstrado o efeito da amplitude na corrente de pico de redução para Cu_2Se e os voltamogramas, respectivamente.

Figura 12 - Variação na intensidade de corrente de pico para Cu_2Se com diferentes valores de amplitude (A) e (B) os respectivos voltamogramas. Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) com $16 \mu\text{M}$ de Cu^{2+} e 32 nM de Se. $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,8 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 90 \text{ s}$, $f = 60 \text{ Hz}$.



Na Figura 12 (A) é possível observar que se fixando a frequência em 60 Hz, (cuja velocidade de varredura é 302 mV s^{-1}) e variando-se a amplitude no intervalo de 0,01 a 0,15 V, há um aumento nas intensidades de corrente de pico com o aumento da amplitude. Entretanto, a melhor resolução obtida foi quando se utilizou amplitude de 0,08 V e a resolução foi comprometida em amplitudes maiores que 0,1 V devido à formação de dois picos como anteriormente verificado e descrito por Somer e Zuman, (2000). Portanto dentre as amplitudes avaliadas, a de 0,08 V foi escolhida por apresentar melhor perfil voltamétrico conforme é demonstrado na Figura 12 (B).

5.2 Comparação entre Pulso Diferencial e Onda Quadrada na determinação de Se

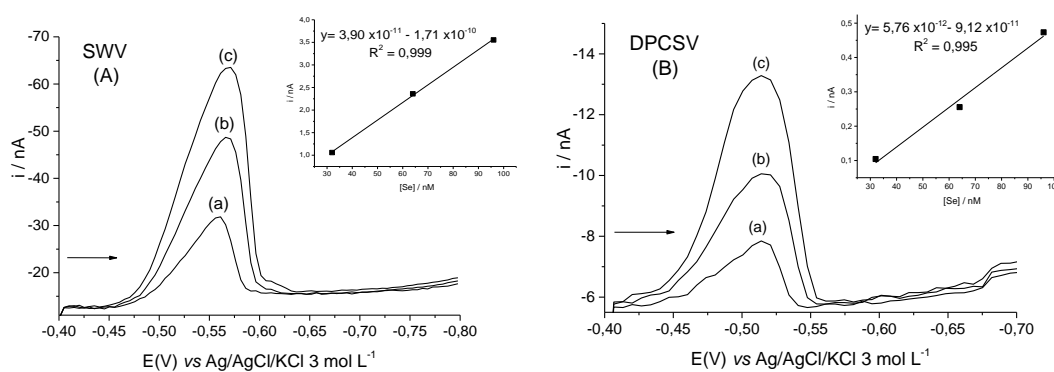
Verificar qual a técnica mais sensível é o objetivo da comparação entre DPCSV e SWV. Para isso, foram utilizadas as condições experimentais otimizadas nos itens anteriores e essas condições estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para Pulso Diferencial e para Onda Quadrada

Parâmetros	DPCSV	SWV
$E_{\text{dep}} / \text{V}$	-0,4	- 0,4
$t_{\text{dep}} / \text{s}$	90	90
$E_{\text{inicial}} / \text{V}$	-0,4	-0,4
$E_{\text{final}} / \text{V}$	-0,7	-0,7
$E_{\text{step}} / \text{V}$	-0,0067	-0,005
Amplitude / V	0,08	0,08
Intervalo de tempo / s	0,067	0,017
Velocidade / mVs^{-1}	100	302
Frequência / Hz	-	60

A aplicação dos métodos por DPCSV e SWV originaram dois voltamogramas e suas respectivas curvas analíticas estão demonstradas na Figura 13 (A- SWV e B – DPCSV).

Figura 13- Voltamogramas de Se por SWV (A) e DPCSV (B) e suas curvas analíticas (inset). Condições experimentais: 10 mL de eletrólito (HCl 100 mM) e 16 μM de Cu^{2+} . Faixa de concentração de Se de 32 a 96 nM.



Um método é dito sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (INMETRO, 2011). Isto pode ser observado na Figura 13 (A), onde a inclinação da curva obtida por SWV ($3,90 \times 10^{-11}$

¹¹⁾ foi da ordem de 10 vezes maiores que a obtida por DPCSV ($5,76 \times 10^{-12}$). Segundo Souza e Machado (2003) a principal vantagem da SWV é possibilitar a obtenção de correntes em altas velocidades de varredura, melhorando a sensibilidade da técnica (SOUZA; MACHADO, 2003) e isso pode ser visualizado nesse estudo.

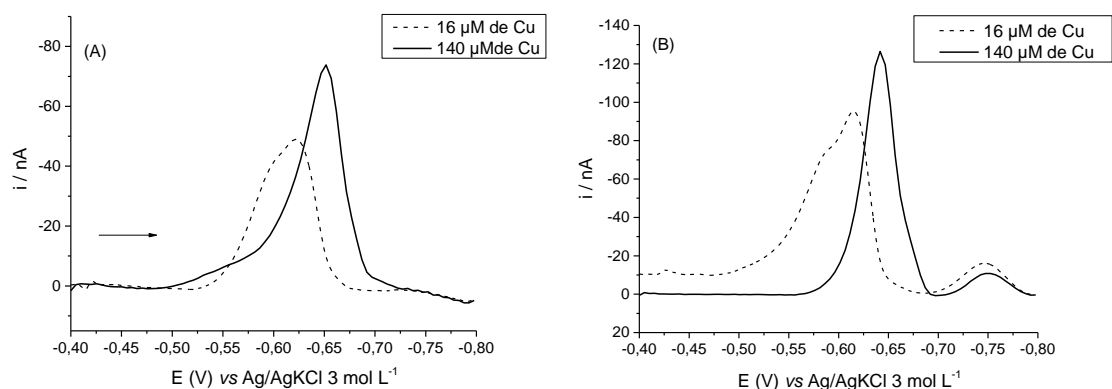
Na SWV a corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto e a outra ao final do pulso reverso e, essa dupla amostragem de corrente contribui para que a corrente capacitiva seja minimizada, favorecendo a redução de ruídos, melhorando a resolução dos sinais voltamétricos e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade da técnica (SOUZA; MACHADO, 2004). Conforme observado nas curvas de regressão linear (Figura 13 A), a técnica mais sensível é a SWV, pois apresentou o maior coeficiente angular e, sendo assim, será utilizada para a validação do método e análise das amostras.

5.3 Testes preliminares com a amostra (avaliação da concentração de Cu e efeito matriz nas amostras)

Utilizando-se um tempo de deposição de 420 s para a determinação de Se, pode-se observar que uma corrente mensurável (na ordem de nA) foi obtida e sendo assim, este tempo foi utilizado no restante do trabalho. Uma vez que as amostras utilizadas neste trabalho são consideradas de elevada complexidade, foi avaliada a concentração de Cu necessária para a determinação de Se nas macroalgas *Rhodophytas* e *Phaeophytas* e os efeitos de matriz das mesmas.

O motivo da realização da avaliação do efeito da concentração de Cu, é devido ao Cu poder ser complexado pela MOD (matéria orgânica dissolvida) presente na amostra e conseqüentemente, não estar totalmente disponível para reagir com o Se. Por esse motivo avaliou-se o perfil voltamétrico e as correntes obtidas para Se nas amostras de macroalga *Phaeophytas* (*Adenocystis utricularis*) e *Rhodophytas* (*Georgiella confluens*) com a adição de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se, e com a variação de Cu entre 16 a $140 \mu\text{M}$. Os voltamogramas obtidos para a alga *Phaeophytas* e *Rhodophytas* estão demonstrados na Figura 14 A e B, respectivamente.

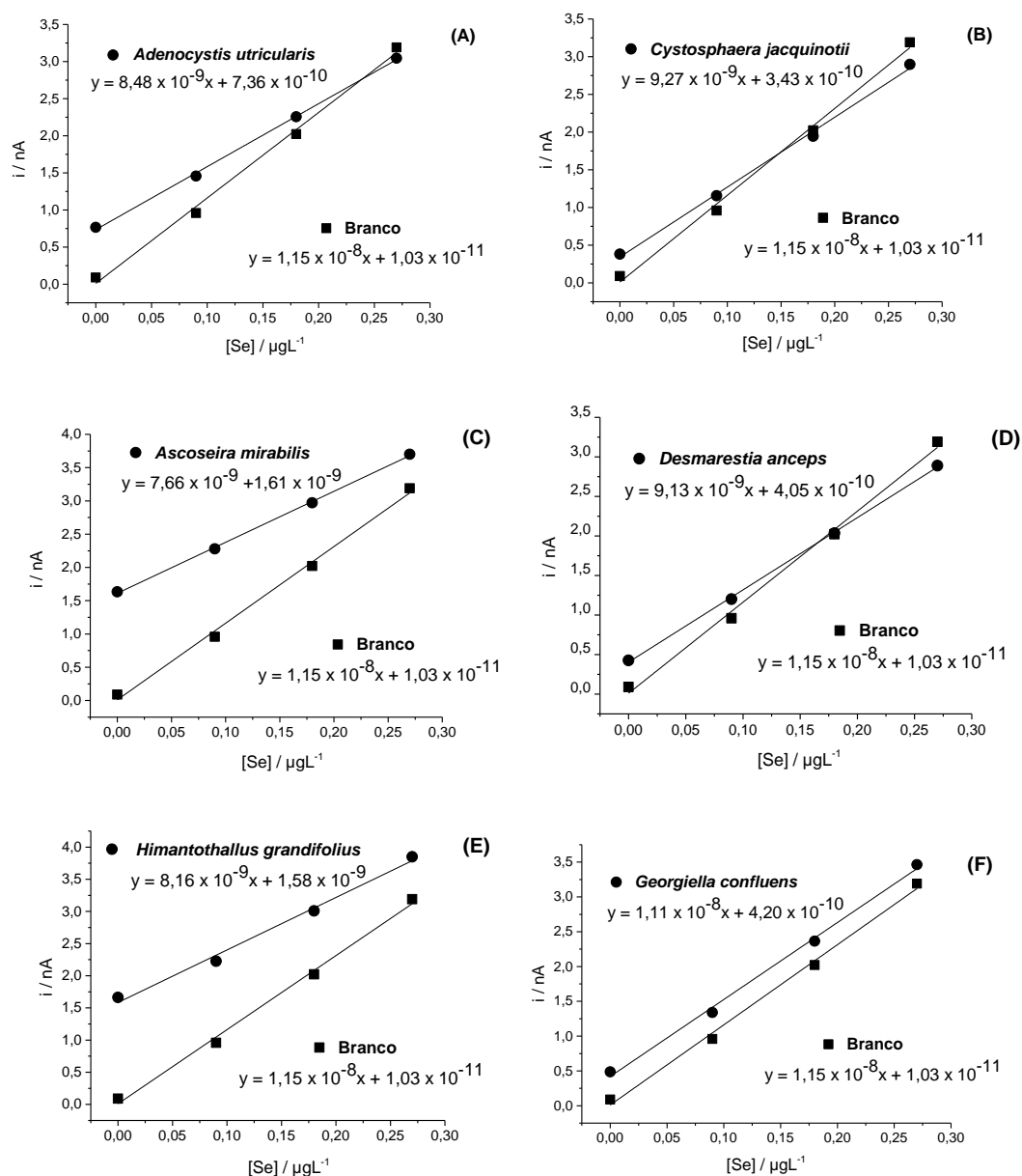
Figura 14 - Voltamogramas de Se $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ na macroalga *Phaeophytas* (*Adenocystis utricularis*) (A) e *Rhodophytas* (*Georgiella confluens*) (B) por SWV com 20 mL de HCl 100 mM em 16 e 140 μM de Cu^{2+} . Condições experimentais: $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,8 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$, $f = 60 \text{ Hz}$, $\text{Amp} = 0,08 \text{ V}$

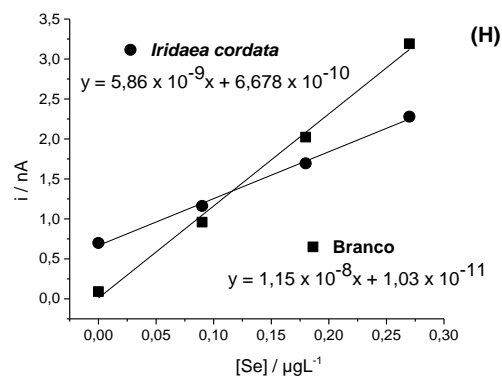
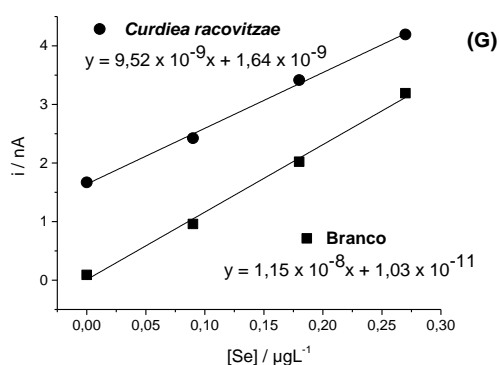


Como pode ser observado na Figura 14 A e B, quando foram utilizados 16 μM de Cu (em ambas as amostras) a resolução do pico ficou comprometida podendo ser observado dois picos sobrepostos. Acredita-se que isso ocorreu, pois, o Cu pode ter interagido (complexado) com a MOD. Quando foram utilizados 140 μM , pode-se observar a obtenção de um pico gaussiano, confirmando a hipótese de que em meio da amostra é necessária a adição de mais Cu do que o otimizado em meio somente do eletrólito (16 μM). Cabe salientar que concentrações maiores de Cu foram avaliados e os mesmos resultados de quando se utilizou 140 μM foram obtidos. Com isso, nos estudos seguintes, a concentração de Cu utilizada para as determinações voltamétricas foi de 140 μM .

Adicionalmente, o efeito matriz foi calculado para todas as amostras em estudo a partir das curvas de calibração do branco e da amostra demonstradas na Figura 15.

Figura 15 - Curvas analíticas obtidas por SWV para as macroalgas *Phaeophytas* (A- *Adenocystis utricularis*, B- *Cystosphaera jacquinotii*, C- *Ascoseira mirabilis*, D- *Desmarestia anceps* e E- *Himantothallus grandifolius*) e *Rhodophytas* (F- *Georgiella confluens*, G- *Curdiea racovitzae*, H- *Iridaea cordata*). Condições experimentais: 20 mL de eletrólito (HCl 100 mM e 140 μM de Cu^{2+}) $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,7 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$, $f = 60 \text{ Hz}$, $\text{Amp} = 0,08 \text{ V}$





Na Tabela 4 estão demonstrados os valores em percentagem do EM calculados para as amostras.

Tabela 4 - Valores de efeito da matriz para as macroalgas em estudo

Classificação	Macroalga	Efeito Matriz (%)
<i>Phaeophytas</i>	<i>Adenocystis utricularis</i>	- 26
	<i>Cystosphaera jacquinotii</i>	- 19
	<i>Ascoseira mirabilis</i>	- 33
	<i>Desmarestia anceps</i>	- 20
	<i>Himantothallus grandifolius</i>	- 29
<i>Rhodophytas</i>	<i>Georgiella confluens</i>	- 3
	<i>Curdiea racovitzae</i>	- 17
	<i>Iridaea cordata</i>	- 49

Segundo Economou et al., (2009) valores de efeito matriz entre -20 e +20 % são considerados um baixo EM, valores entre -50 e -20 % ou +20 e +50 % considera-se um EM médio. Para valores abaixo de -50 ou acima de + 50% interpreta-se como um alto EM. Levando-se isto em consideração, pode-se inferir que os valores de efeito de matriz para as macroalgas pardas *Adenocystis utricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Desmarestia*

anceps e *Himantothallus grandifolius* foram médios (valores de -26, -33, -20, -29%, respectivamente), exceto para a *Cystosphaera jacquinotii* que apresentou EM baixo (-19%). Dentre as macroalgas vermelhas, a *Curdiea racovitzae* e *Georgiella confluens* apresentaram baixo EM (-17 e -3%, respectivamente) e a *Iridaea cordata* apresentou um alto EM (-49%).

Almeida et al., (2017) utilizaram diferentes métodos de preparo de amostra (micro-ondas, bloco digestor e radiação UV) na mineralização da macroalga *Chlorophyta* para posterior quantificação de Zn, Cd, Pb e Cu por SWV. Os autores verificaram que o método que fez uso de sistema fechado com micro-ondas em meio HNO₃ apesar de ter apresentado valores de EM que variaram de baixo a alto (ALMEIDA et al., 2017), mostrou-se exato e preciso. Uma vez que o método aqui proposto também foi exato e preciso (ver item 5.4), pode-se inferir que mesmo esses efeitos médios e altos não são um problema para o procedimento voltamétrico aqui proposto.

Adicionalmente, acredita-se que esses efeitos podem ser gerados a partir da possível formação de ácidos benzoicos nitrificados gerados na mineralização por MAD em meio de HNO₃ uma vez que os mesmos são eletroquimicamente ativos (KRUG, 2008) e podem influenciar no efeito matriz na análise voltamétrica (ALMEIDA et al., 2017).

5.4 Parâmetros de Validação

Concluída a etapa de otimização para a determinação de Se por SWV, foram conduzidas as avaliações dos parâmetros de mérito. Neste trabalho foram os seguintes parâmetros avaliados: faixa linear, LD_{inst} (limite de detecção instrumental), LQ_{inst} (limite de quantificação instrumental) LD_{met} (limite de detecção do método), LQ_{met} (limite de quantificação do método), exatidão e precisão.

O LD_{inst} e LQ_{inst} calculados foram de 0,013 e 0,043 µg L⁻¹, respectivamente. Já os valores de LD_{met} e LQ_{met} calculados para a macroalga *Rhodophyta* e *Phaeophytas* estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores calculados para os limites de detecção e quantificação do método para Se por SWV

Classificação	Macroalga	LD _{met} (µg kg ⁻¹)	LQ _{met} (µg kg ⁻¹)
<i>Phaeophytas</i>	<i>Adenocystis utricularis</i>	2,05	6,84
	<i>Cystosphaera jacquinotii</i>	1,90	6,35
	<i>Ascoseira mirabilis</i>	2,30	7,66
	<i>Desmarestia anceps</i>	1,94	6,48
	<i>Himantothallus grandifolius</i>	2,18	7,28
<i>Rhodophytas</i>	<i>Georgiella confluens</i>	1,56	5,21
	<i>Curdiea racovitzae</i>	1,86	6,20
	<i>Iridaea cordata</i>	2,96	9,85

A faixa de concentração utilizada para a obtenção dos parâmetros de mérito assim como para a análises das amostras foi de 0,1 a 0,5 µg L⁻¹ de Se obtendo-se valores de correlação linear maior que 0,99. A precisão foi avaliada através dos resultados de desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*). A avaliação da exatidão foi realizada através da análise do material de referência certificado *Peach Leaves* (NIST 1547) onde a concentração certificada para Se é de 0,12 µg g⁻¹ e a quantificada pela método proposto foi de 0,13 ± 0,004 µg g⁻¹. Isso comprova que o método desenvolvido é exato devido à recuperação obtida de 111% e também foi preciso, pois os valores de RSD obtidos na análise do CRM formam menores que 3%.

5.5 Avaliação da influência dos interferentes

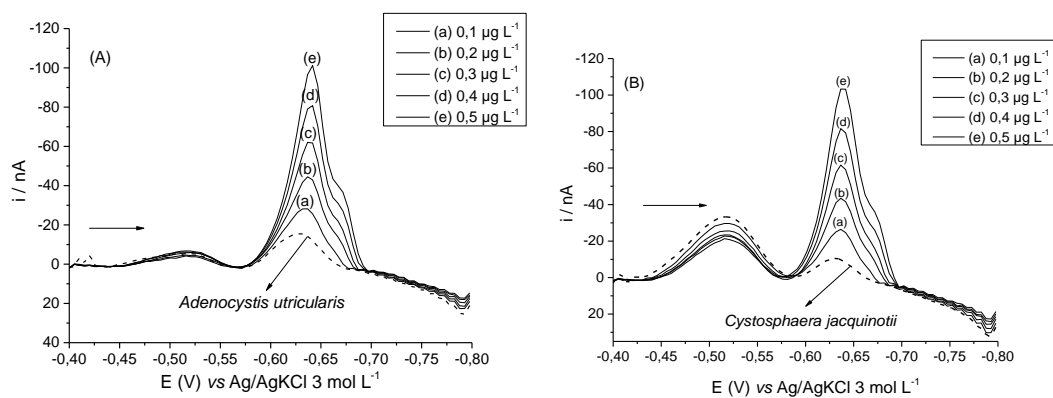
Com o intuito de avaliar a influência de outros elementos que possam ser encontrados nas amostras em estudo e que possam interferir na resposta voltamétrica do Se, escolheram-se Fe, Zn, Mn, Cr, Sn, As, Cd, Cu, Sb, Ni, Ba, Al e V. A escolha da avaliação destes compostos supracitados se justifica uma vez que Zuman e Somer (2000) relatam que a determinação de Se é afetada pela presença de metais gerando

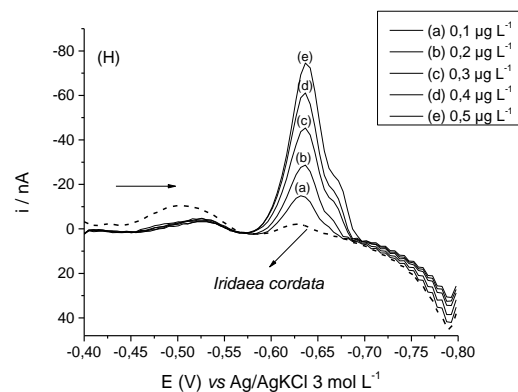
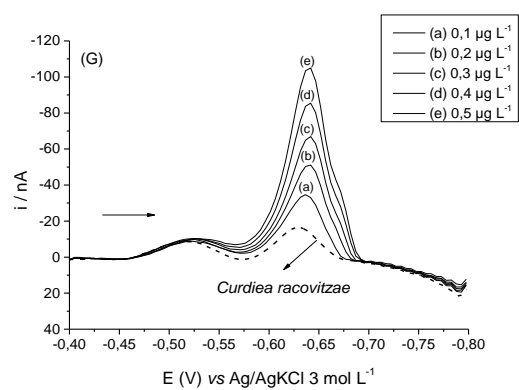
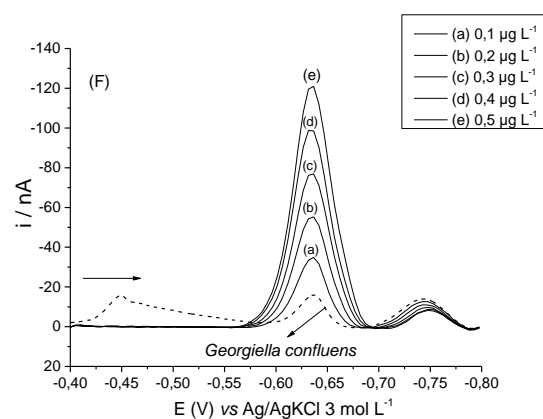
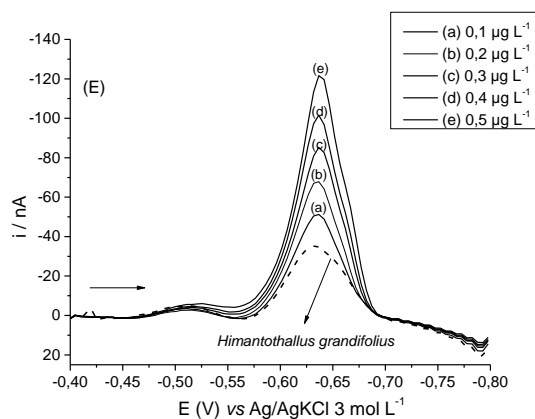
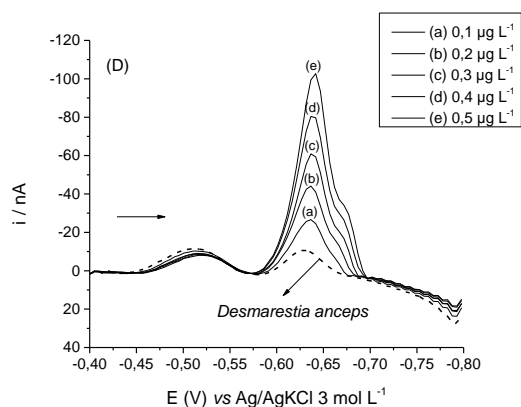
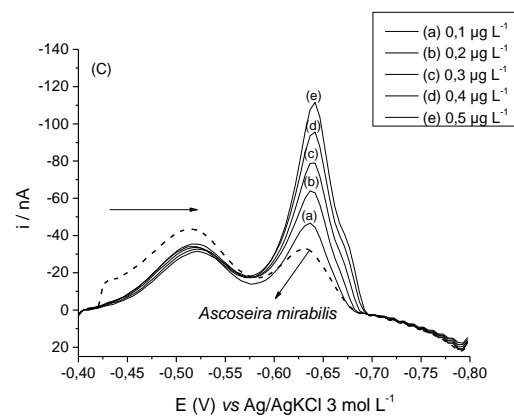
picos sobrepostos (ZUMAN; SOMER, 2000). Adicionalmente, Farias et al., (2002) investigaram 11 espécies de algas da Antártica com objetivo de verificar a capacidade dessas espécies em acumular em seus tecidos elementos tais como As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V e Zn (FARIAS et al., 2002). Para essa avaliação realizou-se as análises voltamétricas isoladamente de cada um dos compostos e a concentração utilizada de $125 \mu\text{g L}^{-1}$ (50 vezes superior à faixa linear de Se utilizada). Dentre os metais avaliados, nenhum apresentou resposta voltamétrica na faixa de trabalho do Se. Sendo assim, os metais avaliados não interferem nesse estudo.

5.6 Determinação de Se por SWV em macroalgas

Após a otimização e validação do método proposto, o mesmo foi aplicado para as amostras de macroalga *Phaeophytas* e *Rhodophytas* da Antártica. As determinações de Se foram realizadas como descrito no (item 4.6) e os voltamogramas obtidos para ambas macroalgas estão demonstrados na Figura 16.

Figura 16 - Voltamogramas obtidos por SWV para as macroalgas *Phaeophytas* (A- *Adenocystis utricularis*, B- *Cystosphaera jacquinotii*, C- *Ascoseira mirabilis*, D- *Desmarestia anceps* e E- *Himantothallus grandifolius*) e *Rhodophytas* (F- *Georgiella confluens*, G- *Curdi Curdiea racovitzae*, H- *Iridaea cordata*). Condições experimentais: 20 mL de eletrólito (HCl 100 mM e $140 \mu\text{M}$ de Cu^{2+}) $E_{\text{dep}} = -0,4 \text{ V}$, $E_i = -0,4 \text{ V}$, $E_f = -0,8 \text{ V}$, $t_{\text{dep}} = 420 \text{ s}$, $f = 60 \text{ Hz}$, $\text{Amp} = 0,08 \text{ V}$. Curva = a-e de $0,1$ a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se.





Como se pode observar por meio dos voltamogramas o perfil voltamétrico de Se é gaussiano e as diferenças de incremento de correntes são proporcionais entre amostra e as adições do padrão. Os valores de Se quantificados por SWV estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de Se quantificados nas macroalgas *Phaeophytas* e *Rhodophytas* por SWV após mineralização por MAD

Classificação	Macroalga	Concentração de Se (mg kg ⁻¹)
<i>Phaeophytas</i>	<i>Adenocystis utricularis</i>	0,54 ± 0,05 ^{bc}
	<i>Cystosphaera jacquinotii</i>	0,23 ± 0,02 ^d
	<i>Ascoseira mirabilis</i>	1,22 ± 0,16 ^a
	<i>Desmarestia anceps</i>	0,28 ± 0,02 ^{cd}
	<i>Himantothallus grandifolius</i>	1,13 ± 0,12 ^a
<i>Rhodophytas</i>	<i>Georgiella confluens</i>	0,24 ± 0,02 ^d
	<i>Curdiea racovitzae</i>	1,00 ± 0,18 ^a
	<i>Iridaea cordata</i>	0,63 ± 0,12 ^b

n=3

TestTukey p<0,05-95%

* letras iguais não apresentam diferenças significativas

Com os dados descritos na Tabela 6 é possível observar que o desvio padrão obtidos para as macroalgas *Phaeophytas* e *Rhodophytas* foram baixos (SD de 0,02 a 0,18 e RSD de 8 a 19%) e estes valores estão dentro dos limites estabelecidos como aceitáveis (RSD menores que 20%) (INMETRO, 2011). De maneira geral pode-se observar que os níveis de concentração determinados nas macroalgas analisadas variaram entre 0,23 e 1,22 mg kg⁻¹. Acredita-se que essas diferenças de concentração entre as espécies, podem ser atribuída a diferentes fatores como a espécie da macroalga, tamanho, cor, forma e local onde habitam tendo a influência direta da turbidez da água, luz e temperatura (FARIAS et al., 2002; VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Além disso, as macroalgas podem estar em um ambiente onde haja escassez de nutrientes como o Se, o que acarretará uma menor absorção deste nutriente nos tecidos algais.

Fárias et al., (2002) quantificaram Se em amostras de macroalgas, utilizando MAD com determinação por ICP-OES. Essas amostras foram coletadas na ilha de King George sendo 6 pardas (*Ascoseira mirabilis*, *Desmarestia anceps*, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia antarctica*, *Himantothallus grandifolius*, *Phaeurus antarcticus*)

e 5 vermelhas (*Palmaria decipiens*, *Monostroma hariotti*, *Iridaea cordata*, *Georgiella confluens*, *Myriogramme mangini*). Dentre estas, 6,55 e 1,54 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se foi quantificado apenas nas macroalgas vermelhas *Monostroma hariotti* e *Palmaria decipiens*, respectivamente (FARIAS et al., 2002).

Viitak e Volynsky (2006) quantificaram Se por GF AAS (mineralização por MAD) nas macroalgas vermelhas *Fucus vesiculosus* e *Furcellaria lumbricalis*, coletada em diferentes locais da região costeira Estoniana do mar Báltico e as concentrações variaram de 0,014 a 0,43 $\mu\text{g g}^{-1}$ com RSD de 2,3 a 21% (VIITAK; VOLYNSKY, 2006). Cabe salientar que os valores quantificados de Se pelo método voltamétrico proposto por nós para a macroalga vermelha *Georgiella confluens* (0,24 mg kg^{-1}) foi semelhante ao quantificado pelos autores na *Furcellaria lumbricalis* (0,22 $\mu\text{g g}^{-1}$).

Cabrita et al., (2016) investigaram 15 espécies de algas coletadas da costa central e norte em Portugal, sendo elas 3 verdes (*Codium adhaeren*, *Codium vermilara*, *Ulva sp.*), 10 pardas (*Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira usneoides*, *Fucus giryi*, *Fucus serratus*, *Fucus spiralis*, *Laminaria ochroleuca*, *Pelvetia canaliculata*, *Saccharina latissima*, *Sargassum muticum*, *Sargassum vulgare*) e 2 vermelhas (*Gigartina sp.*, *Gracilaria vermiculophylla*). Selênio foi determinado por ICP-MS após mineralização por MAD e as concentrações de Se variaram de 0,71 mg kg^{-1} para a macroalga *Bifurcaria bifurcata* a 2,66 mg kg^{-1} para a macroalga *Codium adhaerens* com valores de RSD de 6 a 49%. Já macroalgas pardas *Fucus serratus* e *Sargassum muticum* apresentaram concentrações de Se de 1,21 e 1,01 mg kg^{-1} , respectivamente (CABRITA et al., 2016). Esses valores estão muito próximos aos quantificados por nós para a macroalga parda *Ascoseira mirabilis* (1,22 mg kg^{-1}).

Tuzen et al., (2009) quantificaram Se empregando MAD como preparo de amostra com determinação por GF AAS em 10 espécies de algas coletadas em diferentes locais da costa da Turquia. Dentre estas, 6 são vermelhas (*Porphyra umbilicalis*, *Ceramium rubru*, *Antithamnion cruciatum*, *Gelidium latifolium*, *Phyllophora nervosa*, *Corallina elongate*), 2 são verdes (*Ulva lactuca* and *Enteromorpha intestinalis*) e 2 são pardas (*Padina pavonica* and *Cystoseira barbata*). Nas algas vermelhas da região Rize (*Porphyra umbilicalis*, *Ceramium rubru* e *Antithamnion cruciatum*) a concentração de Se foi 134, 25 e 42 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Já as concentrações de Se nestas espécies de algas coletadas na região Trabzon foram de 11, 12 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente e da região Sinop foram de 20, 16 e 247 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente (TUZEN et al., 2009). Com esses resultados pode-se observar que a mesma espécie de alga pode apresentar diferentes concentrações de Se e acredita-se que isso possa ter relação com os locais de cultivo das mesmas.

As algas vermelhas *Gelidium latifolium*, *Phyllophora nervosa* e *Corallina elongata* analisadas por Tuzen et al., (2009) e coletadas da região Sinop apresentaram concentração de Se de 38, 26 e 16 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Já nas algas verdes *Ulva lactuca* e *Enteromorpha intestinalis* da região Rize, a concentração de Se quantificada foi de 354 e 694 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, e as da região Trabzon foi de 162 e 33 $\mu\text{g g}^{-1}$ e para a região de Sinop foi de 29 e 17 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Já para as algas pardas *Padina pavonica*, *Cystoseira barbata* a concentração de Se quantificada foi de 30 e 91 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. (TUZEN et al., 2009).

Liu et al., (1987) determinaram Se em 8 espécies de algas verdes, vermelhas e pardas coletadas da costa da China, por CSV. As concentrações de Se quantificadas variaram de 0,09 a 0,61 $\mu\text{g g}^{-1}$ (LIU et al., 1987). Cabe salientar que essas concentrações estão próximas as quantificadas pelo método voltamétrico por nós proposto.

Como se pode observar diante dos dados descritos, há uma grande variabilidade nas concentrações quantificadas de Se. Acredita-se que diferentes fatores como turbidez, disponibilidade de nutrientes, luz, salinidade, temperatura, podem alterar as taxas de crescimento desses organismos, além de dificultar a comparação entre os níveis da concentração da espécie de interesse nas diferentes espécies avaliadas.

5.7 Determinação da Atividade Antioxidante

No organismo as enzimas antioxidantes desempenham um papel protetor no combate a radicais livres e isso pode ser potencializado pela ingestão de compostos com caráter antioxidante através da dieta (WELLS et al., 2017). Uma vez que as macroalgas têm sido utilizadas na indústria nutracêutica realizou-se a determinação da atividade antioxidante nas amostras em estudo e os resultados estão demonstrados na Tabela 7.

Tabela 7- Valores quantificados de atividade antioxidante para as macroalgas *Rhodophytas* e *Phaeophytas* pelo método DPPH

Macroalga	Nome de alga	Atividade antioxidante (%)
<i>Phaeophytas</i>	<i>Adenocystis utricularis</i>	49
	<i>Cystosphaera jacquinotii</i>	36
	<i>Ascoseira mirabilis</i>	26
	<i>Desmarestia anceps</i>	22
	<i>Himantothallus grandifolius</i>	26
<i>Rhodophytas</i>	<i>Georgiella confluens</i>	34
	<i>Curdiea racovitzae</i>	8
	<i>Iridaea cordata</i>	7

Conforme os resultados obtidos na Tabela 7 é possível observar que de um modo geral as macroalgas *Phaeophytas* apresentam maior atividade antioxidante que as *Rhodophytas*. A macroalga vermelha *Georgiella confluens* e as macroalgas pardas *Adenocystis utricularis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Ascoseira mirabilis*, *Desmarestia anceps* e *Himantothallus grandifolius* foram mais ativas frente ao método DPPH com valores de 34, 49, 36, 26, 22 e 26 %, respectivamente. As macroalgas vermelhas *Curdiea racovitzae* e *Iridaea cordata* foram menos ativas frente ao DPPH apresentando atividade antioxidante de 8 e 7 %, respectivamente. Esses baixos resultados de atividade antioxidante quantificadas nessas amostras de algas pode ser devido à baixa concentração de substâncias capazes de doar H⁺ para o radical DPPH (BRAND-WILLIAMS et al.,1995). Em acordo com a hipótese descrita acima, acredita-se que algumas espécies de algas pardas podem possuir em sua estrutura substâncias com caráter antioxidante maior do que outras, o que as torna mais ativas frente ao ensaio de atividade antioxidante empregado.

Raymundo et al., (2004) avaliaram o caráter antioxidante de quatro espécies de algas verdes, através da inibição da peroxidação do ácido linoleico. Dentre as espécies estudadas as algas *Enteromorpha intestinalis* e *Chaetomorpha antennina* foram mais

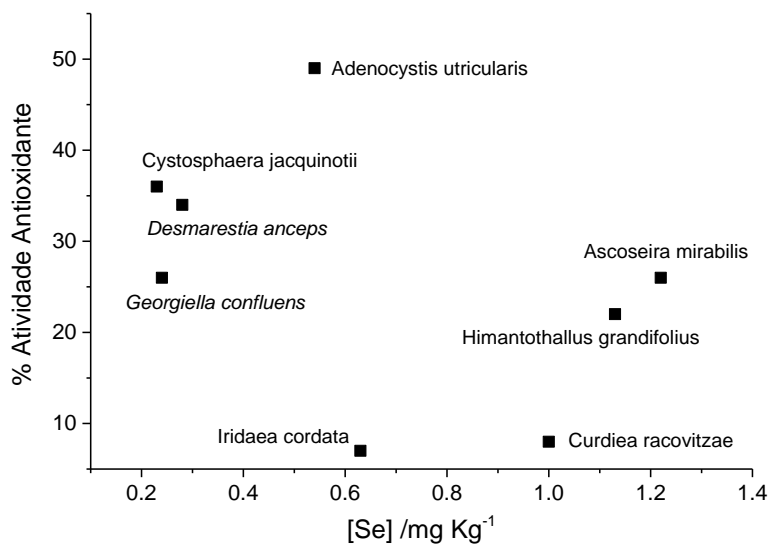
ativas sobre a peroxidação lipídica com porcentagens de inibição acima de 70% (RAYMUNDO et al., 2004).

Matsukawa et al., (1997) investigaram o efeito da atividade antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de 17 espécies de algas, sendo elas 11 pardas (*Colpomenia bullosa*, *Desmarestia ligulate*, *Eisenia bicyclis*, *Hizikia fusiformis*, *Laminaria religiosa*, *Sargassum horneri*, *Sargassum macrocarpum*, *Sargassum siliquastrum*, *Sargassum thunbergii*, *Scytosiphon lomentaria*, *Spatoglossum pacificum*), 1 verde (*Enteromorpha linza*) e 5 vermelha (*Ahnfeltiopsis paradoxa*, *Chondrus giganteus*, *Grateloupia elliptica*, *Mazzaella japonica* e *Porphyra sp*), através do método DPPH. Dentre estas, os extratos aquosos das algas verdes, vermelhas e pardas, exceto as pardas da espécie *Sargassum* apresentaram baixa atividade antioxidante frente ao DPPH. No entanto os extratos etanólicos das algas verdes e vermelhas mostraram-se ativas frente ao DPPH. Desta forma, os autores concluíram que os extratos aquosos e etanólicos de todas espécies pardas da espécie *Sargassum* foram as mais efetivas frente ao DPPH com porcentagens de inibição acima de 50%. Além disso esta espécies inibiram cerca de 80% da atividade da enzima lipoxigenase (MATSUKAWA et al., 1997).

Guaratini et al., (2012) avaliaram a capacidade antioxidante das *Rhodophytas Gracilaria domingensis* e *Gracilaria birdiae* utilizando o método DPPH. A alga que apresentou maior atividade antioxidante foi a *Gracilaria birdiae* que precisou cerca de 0,6 mg mL⁻¹ e 0,8 mg mL⁻¹ do extrato para inibir 50% do radical DPPH (GUARATINI et al., (2012).

Adicionalmente, é conhecido que alguns minerais como Fe, Mn, Cu, Zn e Se atuam como cofatores de enzimas antioxidantes tais como superóxido dismutase, catalase e peroxidase (WELLS et al., 2017; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004). Dentre esses minerais Se é conhecido por apresentar propriedade antioxidante (WELLS et al., 2017) e devido a isso avaliou-se a correlação da concentração de Se nas amostras e suas respectivas atividades antioxidantes (Figura 17).

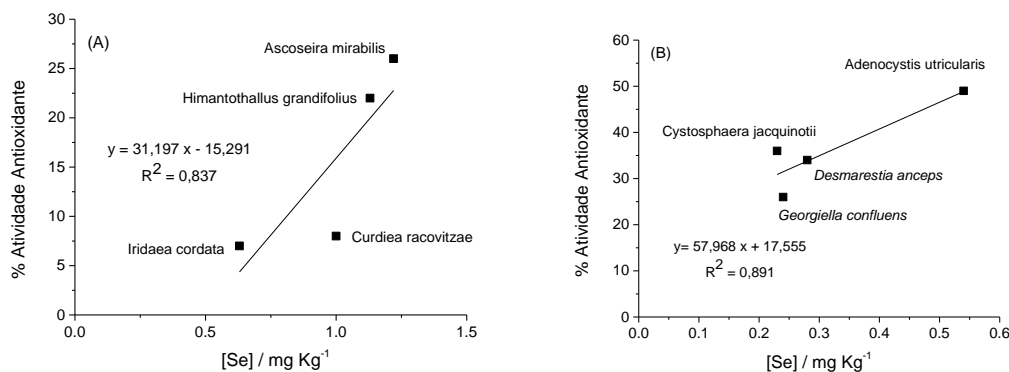
Figura 17- Correlação entre atividade antioxidante das macroalgas e a concentração de Se quantificada por SWV.



Conforme demonstrado na Figura 17 de um modo geral é possível verificar baixa correlação da concentração de Se e atividade antioxidante nas macroalgas em estudo. Isso pode ser notado, por exemplo na macroalga parda *Ascoseira mirabilis* que apresentou elevada concentração de Se (1,22 mg kg⁻¹), entretanto baixa atividade antioxidante (26%) quando comparada da *Cystosphaera jacquinotti* cuja concentração de Se foi de 0,23 mg kg⁻¹ e apresentou 36% de atividade antioxidante. Já a macroalga parda *Adenocystis utricularis* apresentou valores intermediário de atividade antioxidante (49%) assim como de concentração de Se (0,54 mg kg⁻¹).

Outra informação que deve-se ser ressaltada na Figura 17 é a presença de duas regiões (*cluster*) onde percebe-se uma correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de Se. Essas regiões estão demonstradas na Figura 18 A e B.

Figura 18 - Correlações entre atividade antioxidante e concentração de Se em (A) *Curdiea racovitzae*, *Himantothallus grandifolius*, *Ascoseira mirabilis*, *Iridaea cordata* e (B) *Desmarestia anceps*, *Adenocystis utricularis*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Georgiella confluens*.



O *cluster* na Figura 18 (A) onde encontra-se as macroalgas *Curdiea racovitzae* (vermelha), *Himantothallus grandifolius* (parda), *Ascoseira mirabilis* (parda) e *Iridaea cordata* (vermelha) observa-se de uma forma em geral que quanto maior a concentração de Se, maior a atividade antioxidante e que os resultados são correlacionáveis uma vez que apresentam um coeficiente de correlação de 0,837. O mesmo comportamento pode ser observado no *cluster* demonstrado na Figura 18 (B) onde há a presença das macroalgas *Desmarestia anceps* (parda), *Adenocystis utricularis* (parda), *Cystosphaera jacquinotii* (parda) e *Georgiella confluens* (vermelha) onde o coeficiente de correlação obtido foi de 0,891. A maior atividade antioxidante de algumas espécies pode ser atribuído ao fato de que possivelmente estas algas possuem em sua estrutura diferentes grupos funcionais que possibilita maior adsorção de nutrientes (MEERAVALI; KUMAR, 2000), além de substâncias bioativas como polifenóis e carotenóides e que talvez a presença dessas substâncias bioativas possam ter contribuído na potencialização da atividade antioxidante (CHANDINI et al., 2008).

Outra informação verificada por meio dos resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante foi a correlação da concentração de Se e a atividade das espécies coletadas de mesmos locais de coleta, conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8- Quantificação de Se nas amostras e as atividades antioxidantes das espécies de mesma classificação e de mesmo local de coleta

Locais de Coleta	Macroalga	Concentração de Se (mg kg⁻¹)	Atividade antioxidante (%)
	<i>Curdiea racovitzae (vermelha)</i>	1,22	8
Ilha de Livingston,	<i>Ascoseira mirabilis (parda)</i>	1,0	26
Punta Hannah	<i>Desmarestia anceps (parda)</i>	0,28	34
	<i>Cystosphaera jacquinotii (parda)</i>	0,23	36
Ilha Half Moon	<i>Himantothallus grandifolius (parda)</i>	1,13	22
	<i>Adenocystis utricularis (parda)</i>	0,54	49
Ilha de Robert	<i>Georgiella confluens (vermelha)</i>	0,24	26

De modo geral, percebe-se na Tabela 8 que espécies de mesma classificação coletadas do mesmo local apresentaram diferenças na correlação da concentração de Se com a atividade antioxidante. Dentre as amostras coletadas na ilha de Livingston, Punta Hannah pode-se observar que *Ascoseira mirabilis* e *Curdiea racovitzae* apresentaram concentrações semelhantes de Se (1,22 e 1,0 mg kg⁻¹, respectivamente), porém a *Curdiea racovitzae* apresentou valor de atividade antioxidante inferior (8%) à *Ascoseira mirabilis* (26%). Em contrapartida, *Desmarestia anceps* apresentou a maior atividade antioxidante (34%) dentre estas macroalgas e o menor valor de concentração de Se (0,28 mg kg⁻¹).

O mesmo ocorreu para as macroalgas *Cystosphaera jacquinotii* e a *Himantothallus grandifolius* que foram coletadas da ilha Half Moon. Percebe-se que a *Cystosphaera jacquinotii* apresentou menor concentração de Se (0,23 mg kg⁻¹), entretanto maior atividade antioxidante (36%), quando comparada com a *Himantothallus grandifolius* cuja atividade antioxidante foi de 22%, porém a concentração de Se foi maior (1,13 mg kg⁻¹). Em contrapartida, as macroalgas coletadas da ilha de Robert *Adenocystis utricularis* e a *Georgiella confluens* apresentaram uma correlação direta entre a concentração de Se e atividade antioxidante. A *Adenocystis utricularis* apresentou maior concentração de Se (0,54 mg kg⁻¹) e maior atividade antioxidante (49%) quando comparada com a *Georgiella confluens* cuja concentração de Se e atividade antioxidantes foram menores (0,24 mg kg⁻¹ e 26%, respectivamente).

De modo geral é possível constatar que as amostras avaliadas possuem uma fonte potente de um composto com caráter antioxidante, o Se, mas que a concentração do composto depende de diversos fatores já expostos e não necessariamente tem relação com a atividade antioxidante da macroalga.

6. CONCLUSÃO

Após a realização deste trabalho conclui-se que com a utilização do método proposto é possível realizar a determinação voltamétrica de Se em macroalgas após a mineralização por MAD de forma exata e precisa. O uso da MAD mostrou-se eficaz, na mineralização das macroalgas em estudo uma vez que, ambas macroalgas *Phaeophytas* e *Rhodophytas* apresentaram EM que variaram de médios a baixos, exceto para a macroalga *Iridaea cordata* que apresentou EM alto. Desta forma o método descrito neste trabalho é considerado adequado para a determinação de Se em macroalgas da Antártica, uma vez que é considerado sensível e de baixo custo, (quando comparado com as técnicas espectrométricas convencionalmente utilizadas). Além disso, a exatidão do método proposto foi comprovada por meio da análise do material de referência certificado apresentando recuperação de 111%. Avaliando-se a correlação entre atividade antioxidante e concentração de Se nas amostras, é possível inferir que apesar das amostras apresentarem uma fonte potente de um composto com caráter antioxidante (Se) a atividade antioxidante pode depender de outros fatores. Sendo assim, este tipo de amostra pode ser de grande valia para a indústria farmacêutica e na área nutricional devido aos efeitos benéficos que estes compostos causam aos organismos humanos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACHERBERG, 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.

ADELOJU, S. B; BOND, A. M. Determination of selenium, copper, lead and cadmium in biological materials by differential pulse stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 148, p. 59-69, 1983.

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; RUTH F. V. V. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.

ALARCON, M. N; VIQUE, C. C. Selenium in food and the human body: a review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 115-141, 2008.

ALEIXO, L, M. Voltametria: **Conceitos e Técnicas**. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. Disponível em <http://www.chemkeys.com>. Acesso em 05/03/2017, 2003.

ALMEIDA, L. S; STREIT, N; COSTA, D. SEUS, E. R; ANDRADE, C. F. F; PEREIRA, C. M. P; COLEPICOLO, P; DIAS, D. Systematic evaluation of sample preparation method for simultaneous voltammetric determination of Zn, Cd, Pb, and Cu in macroalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 595-605, 2017.

AMORIM, F. A. C; LOBO, I. P; SANTOS, V. L. C. S; FERREIRA, S. L. C. Espectrometria de Absorção Atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v.31, p. 1784-1790, 2008.

AMWEG, E. L; STUART, D. L; WESTON, D. P. Comparative bioavailability of selenium to aquatic organisms after biological treatment of agricultural drainage water. **Aquatic toxicology**, v. 63, p. 13-25, 2003.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of Gracilaria. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, p. 231-243, 1995.

ARTHUR, J. R; MCKENZIE, R. C; BECKETT, G. J. Selenium in the immune system. **The Journal of Nutrition**, v. 133, p. 1457-1459, 2003.

- BARD, A. FAULKNER, L. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 718. John Wiley e Sons: New York, 1980.
- BATTU, G. R; ETHADI, S; MURTHY, P; PRANEETH, V. S; RAO, M. In-vitro antibacterial activity and preliminary phytochemical screening of three algae from Visakhapatnam Coast, Andhra Pradesh, India. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 399-401, 2011.
- BISUTTI, I. HILKE, I. RAESSLER, M. Determination of total organic carbon—an overview of current methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, p. 716-726, 2004.
- BLUNT, J. W; COPP, B. R; MUNRO, M. H. G; NORTHCOTE, P. T; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 196-268, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRETT, A. BRETT, C. **Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações**. Coimbra: Almedina, p. 473, 1996.
- CABRITA, A. R. J; MAIA, M. R. G; OLIVEIRA, H. M; PINTO, I. S; ALMEIDA, A. A; PINTO, E; FONSECA, A. J. M. Tracing seaweeds as mineral sources for farm-animals. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p. 3135-3150, 2016.
- CARDOZO, K. H. M; GUARATINI, T; BARROS, M. P; FALCÃO, V. R; TONON, A. P; LOPES, N. P; TORRES, M. A; SOUZA, A. O; COLEPICOLO, P; PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, p. 60-78, 2007.
- CARVALHO, L. M; SPENGLER, C; GARMATZ, J. C; NASCIMENTO, P. C; BOHRER, D; DEL-FABRO, L; RADIS, G; BOLLI, A. A. 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, p. 913-921, 2003.
- CHANDINI, S. K; GANESAN, P; BHASKAR, N. In vitro antioxidant activities of three selected brown seaweeds of India. **Food Chemistry**, v. 107, p. 707-713, 2008.
- CHATTERJEE, A; BHATTACHARYA, B; DAS, R. Temporal and organ-specific variability of selenium in marine organisms from the eastern coast of India. **Advances in Environmental Research**, v. 5, p. 167-174, 2001.

- CHERNANE, H. MANSORI, M. LATIQUE, S. Evaluation of antioxidant capacity of methanol extract and its solvent fractions obtained from four Moroccan macro algae species. **European Scientific Journal**, v. 10, p. 35-48, 2014.
- COELHO, N, M, M. BACCAN, N. Determinação de ultratraços de selênio em urina por geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica em fluxo. **Eclética Química, São Paulo**, v. 29, p. 7-14, 2004.
- COSTA, C. R; OLIVI, P; BOTTA, C. M. R; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, p. 1820-1830, 2008.
- DHARGALKAR, V. K; VERLECAR, X. N. Southern Ocean seaweeds: a resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**, v. 287, p. 229-242, 2009.
- DOMINGOS, D; NETA, M. S; MASSA, A. R. C. G; REBOUCAS, M. V; TEIXEIRA, L. S. G. 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. 27, p.1594-1601 2016.
- DUAN, X-J; ZHANG, W-W; LI, X-M; WANG, B-G. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chemistry**, v. 95, p. 37-43, 2006.
- ECONOMOU, A; BOTITSI, H; ANTONIOU, S; TSIPI, D. 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.
- FARIAS, S; ARISNABARRETA, S. P; VODOPIVEZ, C; SMICHOWSKI, P. Levels of essential and potentially toxic trace metals in Antarctic macro algae. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 2133-2140, 2002.
- FERRI, T; FAVERO, G; FRASCONI, M. Selenium speciation in foods: Preliminary results on potatoes. **Microchemical Journal**, v. 85, p. 222-227, 2007.
- FLORES, E. M. M; BARIN, J. S; MESKO, M. F; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels a brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 62, p. 1051-1064, 2007.
- GINÉ, M. Espectroscopia de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente - ICP-AES. **Centro de Energia Nuclear na Agricultura-CENA/USP**, São Paulo 1998.
- GOLIMOWSKI, J; GOLIMOWSKA, K. UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 325, p. 111-133, 1996.

- GUARATINI, T; LOPES, N, P; SORIANO, E, M; COLEPICCOLO, P; PINTO, E. Antioxidant activity and chemical composition of the non polar fraction of *Gracilaria domingensis* (Kützing) Sonder ex Dickie and *Gracilaria birdiae* (Plastino & Oliveira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 724-729, 2012.
- HAGE, D. CARR, J. **Química Analítica e Análise Quantitativa**. 1 ed. Pearson - Universitários/Profissionais/Negócios-Kotler, 2011.
- HAMILTON, S. J. Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Science of the Total Environment**, v. 326, p. 1-31, 2004.
- INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre validação de métodos analíticos. p. 20, 2011.
- KINGSTON, H. M; JASSIE, L. B; Microwave energy for acid decomposition at elevated temperatures and pressures using biological and botanical samples. **Analytical Chemistry**, v. 58, p. 2534-2541, 1986.
- KOUNAVES, S. Voltammetric Techniques: **Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry**. Ed. F. A. Settle. Prentice Hall PTR, Upper Saddle River, NJ, 1997.
- KRUG, J. Métodos de preparo de amostras. **Fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. ed. 1ª. Piracicaba, SP: CENA/USP, 2008.
- LAMBERT, D. F; TUROCZY, N. J. Comparison of digestion methods for the determination of selenium in fish tissue by cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 408, p. 97-102, 2000.
- LEMLY, A. D. Aquatic selenium pollution is a global environmental safety issue. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 44-56, 2004.
- LEMLY, A. D. Selenium Transport and Bioaccumulation in Aquatic Ecosystems: A proposal for Water Quality Criteria Based on Hydrological Units. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 42, p. 150-156, 1999.
- LIU, D. L; YANG, Y. P; HU, M. H. Selenium content of marine food chain organisms from the coast of China. **Marine Environmental Research**, v. 22, p. 151-165, 1987.
- LOPEZ, A. J. P; NICOLAS, J. M. L; BARRACHINA, A. A. C. Effects of organic farming on minerals contents and aroma composition of *Clemenules* mandarin juice. **European Food Research and Technology**, v. 225, p. 255-260, 2007.
- MAEHRE, H. K; MALDE, M. K; EILERTSEN, K-E; ELVEVOLL, E. O. Characterization of protein, lipid and mineral contents in common Norwegian seaweeds

and evaluation of their potential as food and feed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 3281-3290, 2014.

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

MARTIN, J. M; HUANG, 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.

MARXEN, K; VANSELOW, K. H; LIPPEMEIER, S; HINTZE, R; RUSER, A; HANSEN, U-P. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. **Sensors**, v. 7, p. 2080-2095, 2007.

MATSUKAWA, R; DUBINSKY, Z; KISHIMOTO, E; MASAKI, K; MASUDA, Y. TAKEUCHI, T; CHIHARA, M; YAMAMOTO, Y; NIKI, E; KARUBE, I. A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 9, p. 29- 35, 1997.

MATTSSON, G; NYHOLM, L; OLIN, A. Cathodic stripping voltammetry of Cu₂Se at mercury electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 379, p. 49-61, 1994.

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; PICOLOTO, R. S; FERREIRA, L. R; COSTA, V. C; PEREIRA, C. M. P; COLEPICOLO, P; MULLER, E. I; FLORES, E. M. M. 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.

MOON, J. K; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

NAGAI, T; YUKIMOTO, T. Preparation and functional properties of beverages made from sea algae. **Food Chemistry**, v. 81, p. 327-332, 2003.

NAHAS, R; ABATIS, D; ANAGNOSTOPOULOU, M. A; KEFALAS, P; VAGIAS, C; ROUSSIS, V. Radical scavenging activity of Aegean Sea marine algae. **Food Chemistry**, v. 102, p. 577-581, 2007.

NAJAFI, N. M; TAVAKOL, H; ABDOLLAHZADEH, Y; ALIZADEH, R. Comparison of ultrasound-assisted emulsification and dispersive liquid-liquid microextraction methods for the speciation of inorganic selenium in environmental

water samples using low density extraction solvents. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 82-88, 2012.

NASCIMENTO, P. C; JOST, C. L; CARVALHO, L. M; BOHRER, D; KOSCHINSKY, A. Voltammetric determination of Se (IV) and Se (VI) in saline samples Studies with seawater, hydrothermal and hemodialysis fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 648, p. 162-166, 2009.

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 174-182, 2003.

OVEISI, M. R; JANNAT, B; SHEFAATI, A; HAMED, M. Determination of Selenium in infant formula by differential pulse cathodic stripping voltammetry. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, p. 28-33, 2002.

PANDIAN, P; SELVAMUTHUKUMAR, S; MANAVALAN, R; PARTHASARATHY, V. Screening of antibacterial and antifungal activities of red marine algae *Acanthaphora spicifera* (*Rhodophyceae*). **Journal of Biomedical Science** v. 3, p. 444-448, 2011.

PANIGATI, M; FALCIOLA, L; MUSSINI, P; BERETTA, G; FACINO, R. M. Determination of selenium in Italian rices by differential pulse cathodic stripping voltammetry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1091-1098, 2007.

PIECH, R; KUBIAK, W. W. Determination of trace selenium on hanging copper amalgam drop electrode. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 584-589, 2007.

PIÑEIRO, J. M; PIÑEIRO, A. M; HORTAS, V. R; GONZALEZ, R. D; RODRIGUEZ, R. D; RODRIGUEZ, E. A; MAHIA, P. L; LORENZO, S. M; RODRIGUEZ, D. P; BARRERA, P. B. ICP-MS for the determination of selenium bioavailability from seafood and effect of major food constituents. **Microchemical Journal**, v. 108, p. 174-179, 2013.

RABANAL, M; PONCE, N. M. A; NAVARRO, D. A; GOMEZ, R. M; STORTZ, C. A; The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: chemical analysis and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 804-811, 2014.

RAINBOW, P. Biomonitoring of trace metals in estuarine and marine environments. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 12, p. 107-122, 2006.

RAYMUNDO, M; HORTA, P; FETT, R. Atividade antioxidante in vitro de extratos de algumas algas verdes (*Chlorophyta*) do litoral catarinense (Brasil). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 40, p. 495-503, 2004.

RIBEIRO, J. R; SIQUEIRA, S; NOVAES, C. G; NETO, J. H. S. Determinação de metais em água e folha de *Aechmea blanchetiana*. **Química Nova**, v. 39, p. 442-449, 2016.

- ROCHA, F. D; PEREIRA, R. C; KAPLAN, M. A. C; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 631-639, 2007.
- SCHIAVON, M; MORO, I; SMITS, E. A. H. P; MATOZZO, V; MALAGOLI, M; VECCHIA, F. D. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. **Aquatic Toxicology**, v. 122, p. 222-231, 2012.
- SCHNEIDER, C. D; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.
- SEIXAS, T. G; KEHRIG, H. A. O selênio no meio ambiente. **Oecologia Brasiliensis**, v. 11, p. 264-276, 2007.
- SEIXAS, T. G; MOREIRA, I. Distribuição de selênio em organismos marinhos da Baía de Guanabara/RJ. **Química Nova**, v. 30, p. 554, 2007.
- SILVA, F. A; PADILHA, C. C. F; CASTRO, G. R; ROLDAN, P. S; NOGUEIRA, A. R. A; MORAES, P. M; PADILHA, P. M. Selenium determination in tissue samples of Nile tilapia using ultrasound-assisted extraction. **Central European Journal of Chemistry**, v. 9, p. 119-125, 2011.
- SINGH, N. K; RAGHUBANSHI, A. S; UPADHYAY, A. K; RAI, U. N. Arsenic and other heavy metal accumulation in plants and algae growing naturally in contaminated area of West Bengal, India. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 224-233, 2016.
- SOARES, B. M. S; VIEIRA, A. A; LEMÕES, J. S; SANTOS, C. M. M; MESKO, M. F; PRIMEL, E. G; D'OCA, M. G. M; DUARTE, F. A. Investigation of major and trace element distribution in the extraction–transesterification process of fatty acid methyl esters from microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 730-734, 2012.
- SOUZA, D; MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, p. 644-647, 2003.
- TABOADA, C; MILLAN, R; MIGUEZ, I. Evaluation of marine algae *Undaria pinnatifida* and *Porphyra purpurea* as a food supplement: composition, nutritional value and effect of intake on intestinal, hepatic and renal enzyme activities in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1863-1868, 2013.

TAKASE, I; LUNA, A; PEREIRA, H. B; GRINBERG, P; CAMPOS, R. C; A geração química de vapor em espectrometria atômica. **Química Nova**, v. 25, p. 1132-1144, 2002.

TAMAYO, A. I. B; GUAS, A. M. E; VIDAL, J. J. P. L; MACCINI, M. Analytical method for heavy metal determination in algae and turtle eggs from Guanahacabibes Protected Sea Park. **Journal Electrochemical Science and Engineering**, v. 4, p.145-154, 2014.

THOMAS, R. **Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners**. ed. 3 CRC press Taylor e Francis Group, 2013.

TURAN, F; OZGUN, S; SAYIN, S; OZYILMAZ, G. Biochemical composition of some red and green seaweeds from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. **Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment**, v. 21, p. 239-249, 2015.

TURNER, A. Selenium in sediments and biota from estuaries of southwest England. **Marine Pollution Bulletin**, v. 73, p. 192-198, 2013.

TUZEN, M; VEREP, B; OGRET MEN, A. O; SOYLAK, M. Trace element content in marine algae species from the Black Sea, Turkey. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 151, p. 363-368, 2009.

TUZEN, M; SARI, A. Biosorption of selenium from aqueous solution by green algae (*Cladophora hutchinsiae*) biomass: Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 158, p. 200-206, 2010.

VAN DEN BERG, C. M. G; KHAN, S. H. Determination of selenium in sea water by adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 231, p. 221-229, 1990.

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

VIITAK, A; VOLYNSKY, A. B. Simple procedure for the determination of Cd, Pb, As and Se in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using colloidal Pd modifier. **Talanta**, v. 70, p. 890-895, 2006.

VOLP, A. C. P; BRESSAN, J; HERMSDORFF, H. H. M; ZULET, M. A; MARTÍNEZ, J. A. Efeitos antioxidantes do selênio e seu elo com a inflamação e síndrome metabólica. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 581-590 2010.

WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. 2 ed. New York. Wiley-VCH, 2000.

WELLS, M. L; POTIN, P; CRAIGIE, J. S; RAVEN, J. A; MERCHANT, S. S; HELLIWELL, K. E.; SMITH, A. G; CAMIRE, M. E. BRAWLEY, S. H. Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 949-982, 2017.

WELZ, B; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3 ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

WIETESKA, E; ZIOEK, A; DRZEWIHNSKA, A. Extraction as a method for preparation of vegetable samples for the determination of trace metals by atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 330, p. 251-257, 1996.

YAMASAKI, M; OGURA, K; HASHIMOTO, W; MIKAMI, B; MURATA, K. A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, p. 11-21, 2005.

YAN, X; ZHENG, L; CHEN, H; LIN, W; ZHANG, W. Enriched accumulation and biotransformation of selenium in the edible seaweed *Laminaria japonica*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6460-6464, 2004.

ZHANG, W. W; DAN, X. J; HUANG, H. L; ZHANG, Y; WANG, B. G. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyclocladia latiuscula* (*Rhodomelaceae*). **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 97-108, 2007.

ZHONG, Y; CHEN, T; ZHENG, W; YANG, Y. Selenium enhances antioxidant activity and photosynthesis in *Ulva fasciata*. **Journal of Applied Phycology**, v. 27, p. 555-562, 2015.

ZIMMERMANN, A. M; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas: uma abordagem clínica. **Disciplinarum Scientia**, v. 8, p. 51-68, 2016.

ZUBIA, M; ROBLEDO, D; PELEGRIN, Y. F. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. **Journal of Applied Phycology**, v. 19, p. 449-458, 2007.

ZUMAN, P; SOMER, G. Polarographic and voltammetric behavior of selenious acid and its use in analysis. **Talanta**, v. 51, p. 645-665, 2000.