UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

LUIZ FERNANDO RIBEIRO

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Cu(II), Pb(II), Cd(II) E Zn(II) EM
ÁGUAS E SEDIMENTOS USANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL
(SIA) COM DETECÇÃO VOLTAMÉTRICA**

Versão corrigida da Dissertação defendida

Data de depósito na secretaria de pós-graduação

21/7/2014

LUIZ FERNANDO RIBEIRO

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE Cu(II), Pb(II), Cd(II) E Zn(II) EM
ÁGUAS E SEDIMENTOS POR SIA COM DETECÇÃO VOLTAMÉTRICA**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Jorge Cesar Masini

São Paulo

2014

Dedicatória

Dedico aos meus dois avôs

Antônio Sarti e Geraldo Ribeiro

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Jorge pela orientação, pela paciência e incentivo ao longo do mestrado.

Aos professores Thiago Paixão e Pedro Vitoriano de Oliveira, que no exame de qualificação contribuíram com opiniões sobre o projeto que foram importantes para a conclusão do mesmo.

Aos colegas do laboratório que continuam e aos que já saíram: Fernando, Ricardo, Carlos, Sandro, Marilda, Kamila, Ausberta.

Aos funcionários da SPG e do IQ.

Aos amigos de São Paulo (e Rio): Rodrigo, Sérgio, Hamilton, Henrique, Ariadne, Nazaret, Érico, Ricardo, Carlos, Rodrigo, Daniel, Natália, Anna.

Aos amigos de Sumaré e Nova Odessa: São tantos que não iria caber aqui.

Aos amigos de Santos: Leandro, Lucas e Laércio.

Ao amigo de Jundiaí: Hélio Shiro Eguchi.

A minha mãe, meu pai e meus dois irmãos.

A todos os amigos que eu encontrei até hoje, valeu!

RESUMO

Ribeiro, L.F. **Determinação simultânea de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em águas e sedimentos usando análise por injeção sequencial (SIA) com detecção voltamétrica**

Esta dissertação descreve o desenvolvimento de uma metodologia de determinação de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em amostras ambientais por voltametria de redissolução anódica (ASV) automatizada com sistema de Análise por Injeção Sequencial (SIA). Sensores impressos com o eletrodo de trabalho de filme fino de mercúrio foram utilizados em uma cela de fluxo. As determinações foram feitas por adição de padrão, com o sistema SIA fazendo a diluição em linha da solução padrão de referência e formando na bobina coletora e auxiliar um segmento contendo as zonas de amostra, solução padrão e solução de diluição. A concentração do padrão preparada nesse segmento gerou um sinal de corrente indistinguível do sinal gerado por uma solução padrão de mesma concentração preparada em batelada em balão volumétrico. Os limites de quantificação e detecção foram da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, comparáveis à de técnicas de espectrometria atômica com detecção óptica, cujos custos instrumentais e de manutenção são significativamente maiores. Com o sistema proposto os limites de quantificação e detecção podem ser aumentados ou diminuídos pela simples alteração dos parâmetros como vazão e número de reversões de fluxo, bem como o tempo de deposição no potenciostato. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, de 1,3 e 4,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Cu(II), 1,4 e 4,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Pb(II), 0,6 e 1,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Cd(II) e 4,2 e 14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Zn(II). Esses limites de detecção e quantificação foram obtidos quando o método funcionou com volume de amostra de 1000 μL , vazão de 10 $\mu\text{L s}^{-1}$ (durante a etapa de deposição), e utilizando 3 reversões de fluxo (volume de reversão = 950 μL), totalizando um tempo de deposição de 315 segundos. O potenciostato, trabalhando sincronicamente com o sistema SIA operou com potencial de condicionamento de -0,1 V vs. pseudo referência de Ag (100 s), potencial de deposição de -1,0 V para Cu(II), Pb(II) e Cd(II) e de -1,3 V para Zn(II) (315 s), frequência de onda quadrada de 100 Hz, incremento de potencial de 6 mV e altura de pulso de 40 mV. Para determinação de Zn(II) foi necessário depositar Ga^0 no eletrodo de trabalho e evitar a formação do intermetálico de Zn^0 com Cu^0 . Estudos de interferentes não apontaram desvios significativos em interferentes aniônicos e catiônicos, mas apresentaram desvios significativos na presença de ácidos húmicos e ácidos fúlvicos. A exatidão do método foi avaliada por estudos de adição e recuperação em amostra de água que resultaram taxas de recuperação próximas de 100%. A exatidão também foi avaliada pelas porcentagens de recuperação das concentrações dos metais da amostra certificada de sedimento CRM-701 submetido ao processo de extração sequencial BCR®. As concentrações obtidas foram testadas pelo teste t de Student, mostrando que os desvios dos valores obtidos em relação aos valores certificados não sugerem a existência de diferenças estatisticamente significativas.

Palavras-chave: Cobre, Chumbo, Cadmio, Zinco, voltametria de redissolução anódica, análise de injeção sequencial, sensores impressos, determinação de metais, CRM-701

ABSTRACT

Ribeiro, L.F. Simultaneous determination of Cu(II), Pb(II), Cd(II) and Zn(II) in waters and sediments using Sequential Injection Analysis (SIA) with voltammetric detection

This dissertation describes the development of a methodology for determination of Cu(II), Pb(II), Cd(II) and Zn(II) in environmental samples by anodic stripping voltammetry (ASV) automated by Sequential Injection Analysis (SIA). Screen printed thin mercury film sensors were used as working electrode in a flow cell. The determinations were made by standard addition, with the SIA system performing the inline dilution of the reference standard solution and forming a segment inside the holding coil containing zones of sample, standard and dilution solutions. The concentration of the standard prepared in this segment generated a current signal undistinguishable from the signal generated by a standard solution of the same concentration prepared manually in a volumetric flask. The limits of quantification and detection were at the level of $\mu\text{g L}^{-1}$, comparable to those of atomic spectrometry techniques with optic detection, whose instrumental and maintenance costs are significantly higher. With the proposed system the limits of quantification and detection can be increased or lowered by simple change of parameters such as flow rate and number of flow reversals, as well as the deposition time at the potentiostat. The limits of detection and quantification were, respectively, 1.3 and $4.3 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cu(II), 1.4 and $4.6 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb(II), 0.6 and $1.8 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd(II) and 4.2 and $14 \mu\text{g L}^{-1}$ for Zn(II). These limits of detection and quantification were obtained for a sample volume of 1000 μL , flow rate of $10 \mu\text{L s}^{-1}$ (during the deposition step), and utilizing 3 flow reversals (volume of reversion = 950 μL) totalizing a deposition time of 315 seconds. The potentiostat worked synchronically with the SIA system performing a conditioning potential of -0,1 V vs pseudo reference of Ag (100 s), deposition potential of -1,0 V for Cu(II), Pb(II) and Cd(II) or -1,3 V for Zn(II) (315 s), square wave frequency of 100 Hz, potential step of 6 mV and pulse height of 40 mV. For determination of Zn(II), deposition of Ga^0 on the working electrode was necessary to avoid the formation of intermetallic between Zn^0 and Cu^0 . Studies of interference did not point significant deviation for anionic and ionic potentially interfering substances, but exhibited significant deviations in the presence of humic and fulvic acids. The accuracy of the method was assessed by spike and recovery experiments in a water sample that resulted recovery rates near of 100%. The accuracy was also assessed by percentages of recovery of concentrations of metals in the certified sediment sample CRM-701 undergoing the sequential extraction procedure of BCR®. The concentrations obtained were tested by test t of Student, showing that the deviations of the obtained values don't suggest the occurrence of statistically significant differences.

Keywords: Copper, Lead, Cadmium, Zinc, anodic stripping voltammetry, sequential injection analysis, printed sensors, metal determinations, CRM-701

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Esquema típico de um sistema SIA.	38
Figura 2 - Representação do sistema SIA-ASV	50
Figura 3 – Perfil da zona de mistura na bobina coletora para determinação de Cu, Pb e Cd.....	52
Figura 4 - Perfil da zona de mistura na bobina coletora para determinação do Zn	55
Figura 5 - Típica curva de adição de padrão dos experimentos	60
Figura 6 : Voltamogramas da ativação do eletrodo por voltametria cíclica	62
Figura 7 : Voltamogramas obtidos para soluções preparadas em linha e manualmente em três concentrações diferentes.....	65
Figura 8 : Variação da corrente de pico para as frequências de aplicação de pulsos avaliadas	68
Figura 9 : Variação da corrente de pico para as vazões avaliadas	69
Figura 10 : Variação da corrente de pico para o número de reversões avaliadas	71
Figura 11 : Variação das correntes de pico em função da concentração dos íons metálicos	72
Figura 12 : Voltamogramas na faixa de concentrações de 0,0025 a 0,1 mg L ⁻¹	73
Figura 13 : Curvas analíticas obtidas a partir de medidas de corrente de pico dos voltamogramas da figura 12	74
Figura 14 : Voltamogramas de soluções preparadas manualmente e em linha na presença de AH e manualmente na ausência de AH.....	81
Figura 15 : Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra de extrato de sedimento sem a utilização do Ga(III) e em um única etapa.....	85
Figura 16 : Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra de extrato de sedimento com a utilização do Ga(III) e em duas etapas.....	87
Figura 17 : Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra da primeira etapa da extração do sedimento certificado	90
Figura 18 : Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra da segunda etapa da extração do sedimento certificado	91
Figura 19 : Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra da terceira etapa da extração do sedimento certificado	91

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 - Trabalhos publicados que utilizaram sensores impressos em SIA-ASV para determinação de metais	45
Tabela 2 - Dados complementares para a construção da curva de adição de padrão para de determinação de Cu, Pb e Cd	53
Tabela 3 - Dados complementares para a construção da curva de adição de padrão da zona de mistura de 1200 μL (200 μL de Ga(III)) para determinação do Zn(II)	56
Tabela 4 - Comparação dos valores de corrente de pico (I_p) de soluções preparadas em linha e manualmente	66
Tabela 5 - Coeficientes angular, linear e de correlação obtidos a partir das curvas analíticas da Figura 13.....	74
Tabela 6 - LQ e LD do método	75
Tabela 7 - Desvios padrões relativos de 10 medidas voltamétricas.....	76
Tabela 8 - Estudo de íons interferentes.....	77
Tabela 9 - Estudo de interferência da MON.....	78
Tabela 10 - Concentrações obtidas com a aplicação da metodologia de determinação dos metais nas amostras de água e no branco analítico.....	88
Tabela 11 - Taxas de recuperação da concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ dos metais nas amostras de água e no branco analítico	89
Tabela 12 - Comparação das concentrações de metais obtidas com as concentrações certificadas para a amostra CRM-701.....	92
Tabela 13 - Valores de n_1 , n_2 e valores de t crítico e calculado para o nível de confiança de 90%	96

Índice

Página

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Poluição por metais	13
1.2. Legislação e fiscalização	18
1.3. Fatores que afetam a biodisponibilidade de metais	19
1.4.1. Extração sequencial	23
1.4.2. Procedimento BCR de extração sequencial e materiais certificados de sedimentos (CRM-601 e CRM-701)	26
1.5.1. Determinação de metais	29
1.5.2. Métodos eletroquímicos e ASV	30
1.6.1. Análise por injeção sequencial (SIA)	35
1.6.2. SIA-ASV	40
1.7. Sensores Impressos.....	42
2. OBJETIVOS.....	46
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1. Equipamentos e Soluções	47
3.2. Sistema para determinações voltamétricas assistidas por sistema de análise de injeção sequencial (SIA-ASV)	49
3.3. Ativação do eletrodo	50
3.4. Procedimento para determinações pelo sistema SIA-ASV utilizando o método de adição de padrão em linha	51
3.4.1. Determinação de Cu(II), Pb(II) e Cd(II)	51
3.4.2. Determinação de Zn(II)	54
3.5. Amostras	57
3.6. Procedimento de extração sequencial para o material certificado de sedimento CRM-701	58
3.7. Tratamento de dados	59
3.7.1. Determinação dos metais na amostra ou solução extratora usando curva de adição de padrão	59
3.7.2. Determinação dos metais no sedimento	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1. Ativação do Eletrodo.....	61
4.2. Homogeneização da zona de mistura	63
4.3. Desenvolvimento do método.....	66
4.3.1. Frequência de onda quadrada.....	67
4.3.2. Vazão.....	68
4.3.3. Número de reversões de fluxo.....	69
4.3.4. Parâmetros Analíticos.....	72
4.3.5. Repetibilidade.....	75
4.4. Estudo de interferentes.....	76
4.4.1. Teste de acidulação da zona de mistura.....	80

4.5. Formação de intermetálico entre Zn e Cu.....	82
4.6. Aplicação da metodologia a amostras.....	87
4.6.1 Amostras de água.....	88
4.6.2 Amostra de sedimento certificado.....	89
5. CONCLUSÕES.....	97
6. PROPOSTAS FUTURAS.....	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1.INTRODUÇÃO

1.1 Poluição por metais

A poluição causada por metais é um dos principais problemas ambientais enfrentados atualmente. Durante todo o ciclo de utilização dos metais, desde atividades de mineração em que é destruída a vegetação e relevos naturais para construir minas, até o descarte dos mesmos, eles exercem impacto ambiental. Há muito tempo a sociedade tornou a utilização de metais necessária e indispensável, como por exemplo, no seu uso para forjar utensílios a partir do começo da civilização. Desde então, com a diversificação e extensão do seu uso, é quase impossível evitar que corpos aquáticos estejam em contato com alguma quantidade de metal de origem antropogênica, consequentemente estando presente em microrganismos e na cadeia alimentar. Pelo fenômeno de biomagnificação os metais presentes em microrganismos são acumulados em animais de níveis tróficos superiores, sendo um motivo de preocupação com a saúde dos mesmos, inclusive a do ser humano. Tal processo tem magnitude muito maior do que se existissem apenas as emissões naturais de metais, como evidenciado por estudos que sugerem que as pessoas estão sujeitas hoje a uma concentração de cádmio e chumbo 500 vezes maior do que o homem primitivo (Schroeder e Darrow, 1973).

É inegável que a atividade humana relacionada aos metais tem colocado o meio ambiente num desequilíbrio nocivo pela emissão do material em águas, solos e atmosfera. A cada ano milhões de toneladas de novos metais são extraídos de minas e redistribuídos, inevitavelmente sendo transferidos à biosfera (Nriagu e Pacyna, 1988). Para evidenciar a toxicidade anual mobilizada pela atividade humana relacionada a metais pesados, Nriagu e Pacyna (1988) contabilizaram a quantidade de água potável necessária para diluí-los, e mostraram que ela excede a toxicidade anual de todos os resíduos orgânicos e radioativos gerados. O mesmo trabalho mostrou que a atividade

antrópica superou a deposição litogênica natural de metais, indicando que o homem se tornou o maior responsável pela ciclagem biogeoquímica de metais traço. Metais interagem com sistemas biológicos, e são considerados tóxicos a organismos no momento em que passam a ter um efeito adverso à sua saúde (Fergusson, 1991).

Os metais estão presentes no ambiente sendo constituintes de rochas e sedimentos. Muitos são essenciais às plantas, aos animais e ao homem, desempenhando funções bioinorgânicas, principalmente na constituição de enzimas, no funcionamento de sistema nervoso e formação de ossos. São os chamados metais essenciais, como zinco, ferro, cobre e cálcio. Mesmo os metais essenciais podem ser tóxicos, dependendo da dose ingerida, do estado e da forma como são ingeridos. Se alguma ingestão de metal essencial é superior à capacidade de absorção do organismo, isso levará ao aumento de metal livre no respectivo organismo, sendo possível que ele ocupe funções que de outra forma não lhe caberiam, provocando perturbações. Por serem essenciais, obviamente a sua deficiência também causa problemas. Além desses há os metais que são desprovidos de função biológica, ou seja, não participam das reações bioquímicas para manutenção da vida e, uma vez ingressando no organismo, são transportados para diversos sítios, interagem de várias formas e geram uma extensa lista de efeitos tóxicos. São os chamados metais tóxicos, como chumbo, cádmio e mercúrio. Em animais interferem na saúde causando problemas hematológicos, cardiovasculares, gastrointestinais, neurológicos e lesões renais (Fergusson, 1991). Em plantas os metais tóxicos intensificam a produção das espécies ativas de oxigênio, fazendo com que o metabolismo das mesmas esteja dedicado na eliminação desses produtos do interior das células. Resultam em inibição de enzimas que atuam na respiração, fotossíntese, fixação do CO₂ e trocas gasosas, fazendo com que a planta cresça menos e tenha menor produção de carboidrato (Gupta e Cuypers, 1999).

As atividades humanas que contribuem para o lançamento de metais podem ser extensivamente listadas: indústrias extrativas de metais, indústria de tintas e pigmentos, galvanoplastias, indústrias de formulações de compostos orgânicos, indústrias de couro, pele e produtos similares, siderúrgicas e indústrias do petróleo (Lima e Verson, 2011). Incineradores de lixo urbano e industrial são também fontes importantes, formando cinzas ricas em metais que pela movimentação das massas de ar depositam-se em solos ou corpos d'água em regiões mais distantes. Indústrias emitem metais de um ponto bem definido, sendo chamadas fontes de poluição pontual, mas existe a poluição difusa, como por exemplo, um produto final que chega à população e a partir daí o seu descarte não é mais concentrado. Uma pilha ou bateria de carro ou celular após ser usada, quando não é descartada devidamente, pode fatalmente chegar ao sistema aquático, já que os aglomerados urbanos normalmente ocorrem nas proximidades de corpos d'água. A disposição de metais feita em aterros torna o solo um reservatório para esses materiais que teoricamente estão imobilizados, mas que com infiltrações e chuvas também podem ser levados até as águas.

A maior peculiaridade dos metais em relação a outros poluentes, como os orgânicos, é não serem biodegradáveis e, uma vez inseridos no meio ambiente permanecem por longos períodos, assumindo formas físico-químicas diversas (chamadas de espécies químicas) conforme a composição e condição desse meio. Para entender o real impacto dessas espécies metálicas em sistemas aquáticos é fundamental considerar fatores que afetam a atividade das espécies, pois em geral admite-se que a atividade relaciona-se mais diretamente com a mobilidade geoquímica dos mesmos. Isso pode ser feito com uma análise mais refinada do sistema do que simplesmente determinar a quantidade de metais totais, caracterizando e determinando individualmente as espécies segundo alguma de suas propriedades físicas ou químicas

relacionadas com as suas atividades. O procedimento de analisar as espécies separadamente é chamada de “análise de especiação”, para diferenciar do termo “especiação”, definido pela IUPAC como a distribuição do elemento nas suas diferentes formas (Templeton et al., 2000; Caruso et al., 2003). Entretanto, pela complexidade de amostras reais, a especiação é muito difícil de ser alcançada. Na prática, depende da relevância da diferença entre as espécies e da habilidade em distinguir entre várias espécies analiticamente, se elas podem ser determinadas separadamente ou se são separadas segundo alguma propriedade física ou química operacionalmente definida e resultam numa resposta analítica conjunta. A informação obtida ao se determinar as espécies por grupos pode ser considerada complementar à apenas determinar a concentração total dos metais justamente por levar em conta aspectos da sua atividade, o que deixa a análise mais próxima do entendimento da real biodisponibilidade. Esse processo de separação em frações de um analito ou grupo de analitos segundo uma propriedade operacionalmente definida é chamado de fracionamento.

Dentre os metais mais utilizados, e de maior impacto ambiental, estão zinco, cádmio, chumbo e cobre.

Zinco

O zinco é um metal essencial encontrado em um grande número de enzimas. É o segundo metal mais abundante em organismos atrás apenas do ferro. Desempenha vários papéis biológicos em todo corpo humano desde conformação de sítios ativos de enzimas a regulador de atividades do sistema nervoso central. Sua deficiência é prejudicial para a saúde, mas seu excesso pode suprimir a absorção de ferro e cobre, e no caso de acidentes de superdosagem como ingestão de zinco, como já foi reportado, em forma de moedas (Fernbach e Tucker, 1986), pode ocasionar danos no estômago, fígado e rins. As reservas de zinco economicamente viáveis estão em sua maior parte

nos Estados Unidos, Austrália e China, e o mineral mais abundante do qual se extrai zinco é a esferalita (ZnS). As maiores aplicações do zinco são em galvanização e ligas metálicas, nas quais normalmente é usado como metal de sacrifício para proteger ferro e aço de oxidação, mas também é usado em uma variedade de aplicações industriais como em pigmento branco para tintas, e aditivos para borrachas.

Cádmio

O metal cádmio é obtido como subproduto da mineração do zinco, uma vez que, ambos ocorrem em forma de sulfeto em minérios comuns. Embora haja semelhança química entre os dois elementos o minério do cádmio é muito menos abundante e tem o nome de grinoquita (CdS). Cádmio é extensivamente utilizado como eletrodo em baterias níquel-cádmio, e como pigmento, na forma de sulfeto de cádmio que tem uma cor amarela. O cádmio é muito tóxico e acumula-se principalmente nos rins e fígado, podendo agir no corpo como inibidor de enzimas que têm o zinco como constituinte, pelo deslocamento do mesmo. Em concentrações muito altas pode substituir os íons Ca(II) nos ossos tornando-os então porosos e frágeis, uma vez que Cd(II) e Ca(II) apresentam a mesma carga e aproximadamente o mesmo tamanho (Fergusson, 1991).

Chumbo

O chumbo é utilizado desde a antiguidade devido ao seu baixo ponto de fusão, portanto de fácil extração de seus minérios. Já foi utilizado como material de canalização e compostos de alquil-chumbo como aditivo em gasolina, agora sendo restringido basicamente em combustível de aviação. É um poluente ambiental extremamente tóxico que causa efeitos neurológicos, interfere na produção de hemoglobina podendo levar à anemia, além de causar danos irreversíveis aos néfrons, o que diminui a eficiência da excreção de ácido úrico (Fergusson, 1991).

Cobre

O cobre é utilizado na indústria elétrica, encanamentos, especialidades químicas e farmacêuticas, ligas metálicas, moedas e fungicidas. É um micronutriente essencial que no organismo humano participa no processo de fixação do ferro na hemoglobina do sangue. Grandes concentrações são encontradas no cérebro e no fígado. O cobre é tóxico em seres humanos e animais somente quando a ingestão é superior a capacidade de absorção dos organismos, fazendo assim com que o cobre livre se ligue a enzimas que de outra forma não conteriam este metal. Mesmo baixas concentrações de compostos de cobre são tóxicas para organismos inferiores como algas e bactérias, uma vez que estes não possuem os mecanismos regulatórios dos organismos superiores (Fergusson, 1991).

1.2 Legislação e fiscalização

A preocupação gerada em torno da poluição dos metais fez com que fossem criadas legislações ambientais no mundo todo para estabelecer padrões de qualidade para águas e solos. No Brasil a resolução nº 357 de 17/03/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), ligado ao Ministério do Meio Ambiente dispõem sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento como adequada ou poluída. Nela estão tabelados valores máximos permitidos para poluentes, inclusive metálicos, de acordo com os tipos de águas. Para solos o mesmo é encontrado na resolução nº 420 de 30/12/2009 do CONAMA. Laboratórios envolvidos na fiscalização e na determinação de metais em geral utilizam métodos espectroscópicos (em particular espectrometria de absorção atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de absorção atômica (AAS) combinado com pré-concentração), seguindo procedimentos bem estabelecidos de coleta e preparo de

amostra. Esses métodos são os escolhidos por serem robustos, e determinar um grande número de metais em baixas concentrações, mas têm a desvantagem de serem caros e não poderem ser levados a campo, por isso com eles torna-se difícil a implantação de pontos de análise móveis, para detecção rápida de emissão de poluentes. Sendo assim, métodos analíticos mais simples, práticos e baratos, como a voltametria de redissolução anódica (ASV) são oportunos para a implantação de maior número de pontos de análise.

Entretanto a especiação química dos metais não é considerada na fiscalização, pois a legislação trata apenas das concentrações totais, deixando de lado uma importante característica dos metais que é a de se dividir em várias formas com diferentes toxicidades. Na legislação existe alguma informação sobre especiação física (por exemplo, frações dissolvidas, as quais não são retidas em membrana de 0,45 μm), considerando Mn(II), Cu(II) e Fe(II) dissolvidos mas não considera a especiação química.

1.3 Fatores que afetam a biodisponibilidade de metais

O impacto ambiental da presença de poluentes metálicos está intimamente relacionado com a mobilidade dos mesmos. Solos são importantes reguladores pois a capacidade do solo em reter e liberar metais influencia muito a disponibilidade dos metais. A solubilidade das espécies metálicas é controlada por reações de adsorção/dessorção, precipitação/dissolução e complexação, que influenciam a partição de metais na fase líquida e sólida do solo e são responsáveis pela mobilidade e biodisponibilidade dos metais no sistema. A mobilidade destes íons depende da natureza da fase sólida e da proporção de seus constituintes, propriedades da fase líquida e das espécies metálicas presentes em solução (Sposito, 1984).

A quantidade total de metais no solo é distribuída em frações. Os metais podem estar adsorvidos às partículas do solo, estar presentes como íons-livres ou como complexos orgânicos minerais. O transporte de metais em solos que receberam poluentes metálicos depende da composição desse resíduo. As frações solúvel e trocável são as mais importantes em relação à poluição do lençol freático e à nutrição de plantas (Sastre et al., 2001).

O tipo e a quantidade dos componentes do solo são fatores importantes que afetam as taxas das reações na solução do solo (Sheidegger et al., 1996). A especiação e a concentração de metais, o pH do solo, a relação solo:solução e o tempo de contato estão entre os principais fatores que controlam a distribuição dos contaminantes entre as fases líquida e sólida do solo (Cavallaro et al., 1980). A concentração do metal em solução é controlada pela sua interação com as fases do solo, principalmente a sólida, sempre no sentido de alcançar o equilíbrio.

A maneira como os metais podem estar no solo é determinada pelas propriedades de cada metal e por atributos do solo, como pH, potencial redox, textura, mineralogia das argilas, capacidade de carga catiônica (CTC), quantidade e natureza dos componentes orgânicos da fase sólida e da solução, competição de outros metais pelos sítios de complexação, temperatura do solo e atividade microbiana. O pH influi direta ou indiretamente nos fatores citados anteriormente (Pierzynski et al., 1994). A maior parte da CTC do solo é devido à desprotonação de grupamentos ácidos da matéria orgânica e da superfície de minerais e de óxidos de ferro e alumínio, apresentando valores crescentes com o aumento do pH (Pierzynski et al., 1994).

A adsorção específica e adsorção não específica são mecanismos usados para descrever a adsorção de metais nas superfícies das partículas coloidais do solo (McBride, 1989). Na adsorção não específica, o complexo é considerado de esfera

externa, pois existe uma molécula de água entre o grupo funcional de superfície e o íon aderido por forças eletrostáticas, sendo esta complexação um processo rápido, reversível e influenciado pela força iônica da solução envolvente. Na adsorção específica, o metal é fortemente retido pela superfície mineral por meio de uma ligação com forte caráter covalente, com força proporcional à solubilidade do cátion metálico. Esse complexo de esfera interna, no geral, não é reversível, e a adsorção por este mecanismo é pouco afetada pela concentração iônica da solução envolvente (Sparks, 1995).

O termo carbono orgânico dissolvido (COD) identifica substâncias orgânicas presentes na solução. Essas substâncias normalmente são oriundas da decomposição de matéria orgânica e são ricas em grupo funcionais com cargas negativas, tais como ácidos carboxílicos, hidroxilas fenólicas e alcoólicas que são sítios de bioadsorção dos metais em solução. A constante de dissociação destes ácidos varia amplamente e, por isso, suas interações com os metais em solução são inúmeras (Elliot et al., 1982). Os complexos formados entre metais pesados e fração orgânica do solo podem ser solúveis ou não, e a solubilidade de tais compostos depende da natureza dos ligantes orgânicos, e depende indiretamente do pH, pois a alteração do mesmo altera o grau de interação dos metais com os ligantes, fazendo com que os equilíbrios mudem (protonação dos grupos negativos diminui a interação com os metais). A biodisponibilidade dos metais complexados é melhor relacionada com a concentração dos complexos cineticamente lábeis do que complexos inertes, pois em complexos lábeis o metal em equilíbrio está mais disponível a ser absorvido. Os complexos metálicos com ácidos fúlvicos, proteínas e aminoácidos livres são, em geral, solúveis, enquanto os formados com ácidos húmicos são insolúveis. A fração solúvel da matéria orgânica pode se tornar insolúvel quando forma complexos organominerais com a fração de argila. Quando a interação metal-

ligante leva à formação de complexos termodinamicamente estáveis, as reações de adsorção podem ser retardadas (Davies et al., 1978).

Os metais podem formar precipitados diretamente com ânions na forma de carbonatos (CO_3^{2-}), sulfatos (SO_4^{2-}), e hidroxocomplexos (ligados a OH^-), entre outros, ou ainda serem coprecipitados junto a componentes poucos solúveis de Ca, Fe, Mg e Al, conforme estes se formam. Há a possibilidade de os metais serem adsorvidos na superfície amorfa destes precipitados, podendo passar para a forma trocável ou covalentemente adsorvida, quando as camadas superficiais cristalizarem (Alloway, 1990). É importante dar destaque ao sulfeto, que é um importante regulador da biodisponibilidade de metais quando em alta concentração no sedimento, atuando como um agente de precipitação de íons metálicos em ambientes anóxicos ou como uma fonte de metais se o ambiente passar a ser oxidante, devido à mudança de pH, ou ocorrência de ventos e correntes de água que forneçam oxigênio ao sistema.

As superfícies das partículas do solo são eletricamente carregadas, devido ao excesso ou ao déficit de elétrons, e podem atuar como barreiras geoquímicas à evolução da mobilidade dos elementos no solo (Bradl, 2004). Reconhecer as reações que comandam o comportamento destes metais no solo e, principalmente os processos que conduzem à sua solubilização e consequentemente disponibilidade, é importante para avaliar impactos que estes metais podem provocar no meio ambiente (Mattiazzo et al., 2000). A extensão das reações de solubilização são melhores entendidas se forem conhecidas as composições do solo e as suas interações com os metais. A complexidade de cada solo dificulta a definição das interações de adsorção características de cada metal, e isso dificulta a formulação efetiva dos modelos para predição do transporte de metais no solo (Mattiazzo et al., 2000).

1.4.1. Extração sequencial

Assim como no meio aquoso a determinação das concentrações totais de metais no solo não é, usualmente, de grande utilidade, quando se busca compreender os processos que afetam a ciclagem e a biodisponibilidade desses elementos (McBride, 1989). O uso da concentração total como critério para avaliar os potenciais efeitos de contaminação de sedimentos implicaria que todas as formas de um determinado metal têm impacto ambiental igual, o que é certamente insustentável (Tessier et al., 1979). Uma avaliação mais completa sobre a mobilidade dos metais pode ser alcançada com a identificação e quantificação das formas químicas que os metais se encontram no solo. Esquemas de extração sequencial têm sido aplicados com esse objetivo.

No método da extração sequencial uma mesma amostra é submetida a etapas sequenciais de extrações com extratores definidos, cujo poder de extração aumenta a cada etapa. O extrator modifica as propriedades que influem na interação do metal com a fase sólida, promovendo sua solubilização para que possa ser quantificado por um método analítico conveniente. Teoricamente, os reagentes, o tempo de extração, e a relação entre massa de solo e volume de solução utilizados na extração sequencial são selecionados com o objetivo de solubilizar frações específicas da fase sólida com o mínimo de interferência nas demais frações. Na prática, entretanto, a distribuição de determinado metal entre as frações não reflete necessariamente a retenção por essas frações, mas principalmente a seletividade dos extratores utilizados. Dessa forma, obtêm-se informações a respeito das frações químicas (quantidade do metal que é extraída por um reagente específico), sendo as fases (espécie química do metal que um reagente deve extrair) inferidas das primeiras.

A teoria por trás dos procedimentos de extração sequencial é que as frações de metais mais móveis são removidas na primeira etapa de extração e que as frações subsequentes têm ordem decrescente de mobilidade. Tessier, em seu trabalho lançado em 1979, dividiu essas frações entre trocáveis, ligados a carbonatos, ligados a Fe e Mn, ligados a matéria orgânica e residuais. Tipicamente metais de fontes antropogênicas tendem a residir nas frações mais móveis, enquanto metais encontrados nas frações residuais são de ocorrência natural nas rochas parentais (Ratuzny et al., 2009).

As frações escolhidas por Tessier foram citadas por serem consideradas suscetíveis a variações nas condições ambientais, e juntamente com a definição da fração são apontados os tipos de extratores que podem ser utilizados para solubilizar cada uma. A fração trocável é a mais fraca, adsorvida na superfície exposta do sedimento através de interações eletrostáticas. Uma mudança na composição iônica utilizando um sal em solução pode remover a fração trocável (Zimmerman et al., 2010; Tessier et al., 1979). Ácido acético também pode ser usado para remover essa fração, mas dissolve também formas trocáveis mais fortemente ligadas, já que ataca parcialmente as fases carbonato e silicato (Ure, 1996). A fração de metais ligada a carbonato é significativa e é suscetível a mudanças no pH, portanto uma solução ácida é aplicada para remoção (Zimmerman et al., 2010). Óxidos de Fe e Mn podem estar presentes no solo de formas variadas (em nódulos, componentes de matriz ou elemento de preenchimento entre partículas) e formam uma fase importante, pois podem aprisionar os metais por adsorção. São particularmente suscetíveis a remoção por soluções ácidas contendo agentes redutores, popularmente cloridrato de hidroxilamina acidificado com ácido nítrico (Pickering, 1986). A fase orgânica compreende metais ligados a organismos vivos e detritos bióticos (ácido húmico e ácido fúlvico). Para remover os metais ligados a essa fase ela deve ser oxidada, o que é comumente feito

com adição de H_2O_2 30% acidificado com HNO_3 . A fração residual consiste em metais incorporados na estrutura cristalina de minerais primários e secundários. Essa fração é a mais difícil de remover e requer o uso de ácidos fortes (HF-HClO_4) para quebrar as estruturas de silicatos. A questão de composição de solos e agentes extratores foi extensamente revisada por Pickering (1986).

Apesar dos estudos envolvendo a aplicação da extração sequencial algumas limitações são intrínsecas à prática. Sabe-se que os reagentes usados não são tão seletivos e as frações não podem ser definidas com tanta certeza. Uma abordagem mais realista é que as espécies que se solubilizam com a aplicação de determinado extrator são agrupadas segundo o extrator (podendo corresponder ou não a uma determinada espécie química), por isso se diz que a extração sequencial é um fracionamento com as suas frações operacionalmente definidas. Pelas frações serem operacionalmente definidas, se a qualidade ou pureza do reagente variar de um laboratório para outro (o que é difícil de ser controlado, por erros na preparação, diferentes condições de armazenamento, etc.), isso pode ser uma fonte de erro em comparações. Além das propriedades dos extratores sobre a extração, fatores como o manuseio do sedimento anterior à extração, razão massa de sedimento: volume de reagente e tempo da extração, temperatura e modo de agitação têm efeito nos dados colhidos com a extração sequencial e podem levar a resultados inconsistentes, mesmo utilizando procedimentos similares aos descritos na literatura. A razão da não seletividade dos reagentes é a possibilidade de readsorção dos metais, pois os reagentes alteram as características químicas da superfície dos solos, e há um potencial para os metais se redistribuírem entre as frações restantes durante o procedimento de extração (Shan, 1993; Tu et. Al, 1994). Outra controvérsia relacionada à extração sequencial é o fato dela não reproduzir

as reações que ocorrem próximas às raízes das plantas, na região da rizosfera, condição que varia muito com a espécie (Mattiazzo et al., 2001).

1.4.2. Procedimento BCR de extração sequencial e materiais certificados de sedimentos (CRM-601 e CRM-701)

Numa tentativa de harmonizar procedimentos de extração a Comissão Européia lançou um programa colaborativo (na estrutura do BCR, Community Bureau of Reference, o que hoje é o IRMM, Institute for Reference Materials and Measurements) para servir de referência. Ele foi inicialmente inspirado pelo procedimento de Tessier. O procedimento de Tessier foi um dos primeiros procedimentos de extração sequencial e o mais popular, que ajudou a direcionar a pesquisa ambiental no sentido do fracionamento elementar (Sutherland, 2010), mas ele tinha inconsistências por ser um procedimento muito geral que era aplicado para muitos tipos de solo (daí o fato dele ser o mais usado) e era modificado de acordo com a necessidade dos solos, o que dificultava comparações científicas. A consolidação da extração sequencial também era impedida porque a amostra usada por Tessier et al. para desenvolver seu procedimento de extração sequencial não era caracterizada a não ser pela identificação de ser um sedimento de fundo de rio, e principalmente, porque faltava um material de referência para comparações (Zimmerman et al., 2010; Sutherland, 2010).

Subsequentes modificações do procedimento de Tessier por laboratórios especializados levaram a criação de procedimento padronizado de 3 etapas em 1993 que ficou conhecido como procedimento BCR (Ure et al., 1993). O procedimento BCR foi associado com o desenvolvimento de um material de referência certificado (CRM) em 1997, CRM-601, sedimento do Lago Maggiore, Italia (Quevauviller, 1997). A produção

desse CRM foi um divisor de águas na aplicação da extração sequencial em estudos ambientais, já que foi a primeira ferramenta disponível para verificação da exatidão de metodologia nesse campo (Sahuquillo et al., 2002) e permitiu à equipe de pesquisa verificar a viabilidade de modificações propostas. O CRM-601 tinha conteúdos certificados de Cu, Cd, Ni e Pb na primeira etapa, Cd, Ni e Zn na segunda etapa e Cd, Ni e Pb na terceira etapa. O restante dos metais não puderam ser certificados pela alta variabilidade entre resultados obtidos pelos diferentes laboratórios (Rauret et al., 2001). Mesmo com o CRM-601 e o procedimento BCR algumas dificuldades na reprodutibilidade eram reportadas na extração, o que levou a posteriores investigações (Sahuquillo et al., 1999) que resultaram no desenvolvimento do procedimento de 3 etapas BCR otimizado (melhorado), e a produção de um novo CRM, BCR-701, do sedimento do Lago Orta Piemonte, Itália (Rauret et al., 2001), um lago conhecido por séria contaminação de metais em anos anteriores. CRM-701 tem valores certificados de concentração para seis elementos (Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, e Zn) em três etapas operacionalmente definidas. Etapa 1: Extraíveis em ácido; Etapa 2: Reduzíveis; Etapa 3: Oxidáveis (Sutherland, 2010).

Para certificação do sedimento CRM-701, foram fornecidas garrafas do material seco, peneirado e homogeneizado para laboratórios especializados juntamente com soluções de calibração dos metais a serem determinados, e foi pedido que fizessem no mínimo cinco replicatas da determinação de cada elemento em pelo menos duas garrafas do CRM em dias diferentes, seguindo rigorosamente o protocolo de extração proposto. Esse procedimento permitiu testar a repetibilidade da extração levando em conta a variância da homogeneidade do material (quintuplicata em duas garrafas) e a reprodutibilidade (análise feita em dois dias diferentes). Além disso, a análise das soluções de calibração permitiu a identificação de possíveis problemas que ocorressem

na etapa de medição (assim evitando conclusões errôneas sobre os esquemas de extração). Reuniões técnicas entre os laboratórios participantes foram importantes para apontar as fontes de erros e as medidas tomadas para eliminá-los e relatar as condições experimentais para demonstrar a rastreabilidade dos resultados. Resultados de diferentes técnicas de determinação, já que aplicados em diferentes laboratórios, foram comparados para detectar possíveis fontes de erros nos métodos. Esses cuidados garantiram a exatidão requerida para uma certificação, assegurando que nenhum erro sistemático significativo fosse deixado não detectado (Rauret et al., 2001).

O procedimento de 3 etapas otimizado BCR é um protocolo muito rígido, que descreve passo a passo a preparação dos reagentes, a vidraria a ser utilizada, o tempo de extração e o tipo de agitação, temperatura de extração, entre outros parâmetros operacionais e por isso permite uma extração com poucos desvios experimentais. Entretanto, frequentemente trabalhos na literatura que citaram ter utilizado o procedimento não descrevem o quão fieis ao protocolo eles foram, dificultando quantificar a importância de desvios específicos do protocolo ou identificar as fontes de erro (Sutherland, 2010). Os desvios mais notados na literatura (mas não quantificados) foram: correção para a massa seca, massa da amostra, velocidade de centrifugação, tipo de agitador, velocidade de agitação, duração da agitação e temperatura ambiente (Sutherland, 2010). Em relação ao procedimento original de Tessier, alguns reagentes e tempos de extração foram mudados, e a principal mudança foi que as duas primeiras frações (troçável e carbonato) são removidas em uma única etapa no procedimento BCR pela utilização do ácido acético como extrator, e a fração denominada extraível em ácido. As frações passaram a ser nomeadas de acordo com o extrator, e não nomeadas de acordo com a sua forma química, para evitar o equívoco de definir erroneamente espécies que foram dissolvidas em etapas que não seriam originais.

Desde que foi desenvolvida, a extração sequencial proposta pelo BCR foi amplamente adotada em uma variedade de meios ambientais na última década, incluindo: solos aráveis, solos de floresta, solos contaminados por atividades mineradoras, solos de beira de estrada, solos contaminados por fundição, sedimentos marinhos, sedimentos de rios impactados por minas, sedimentos de rios urbanos, entre outros. A maioria dos estudos que aplicaram o procedimento de 3 etapas otimizado BCR não incorporou o CRM-701 nos seus procedimentos de controle de qualidade, ou mesmo o CRM-601 (Sutherland, 2010).

1.5.1. Determinação de metais

Alguns metais pesados causam impacto ambiental mesmo se estiverem presentes em quantidades extremamente baixas, o que acaba impulsionando o desenvolvimento de técnicas que os determinem em concentrações cada vez menores, numa espécie de corrida tecnológica em que o objetivo é ter os menores limites de detecção e quantificação. Entretanto, o entendimento do problema não depende somente da capacidade de determinação em níveis baixos, visto a importância da especificação dos metais. Métodos baseados em espectroscopia, como espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica, ou espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, apresentam os menores limites de detecção para determinar metais sendo os métodos escolhidos na maioria das vezes, mas, o alto custo da tecnologia e da instrumentação podem torná-los inviáveis considerando o custo x benefício, ou seja, considerando a relevância de determinar concentrações traço apesar do preço. Métodos eletroquímicos são uma alternativa significativamente barata, que podem apresentar sensibilidade suficientemente alta para determinação de metais para fins ambientais. Entre as técnicas eletroquímicas, existe um destaque para a voltametria de redissolução

anódica (anodic stripping voltametry, ASV). De acordo com Joseph Wang (1982), não existe técnica para análise de metais traço que pode competir com a ASV com base na sensibilidade por dólar investido.

1.5.2. Métodos eletroquímicos e ASV

Métodos eletroquímicos de análise podem ser aplicados para determinação quantitativa e qualitativa de espécies eletroativas em solução. Os métodos são divididos em potenciométricos, coulométricos, condutométricos e voltamétricos. A ASV pertence ao ramo das técnicas voltamétricas, que são baseadas na medição da resposta da corrente em função da aplicação de potencial, que é variado de forma linear, de pulso diferencial, ou de onda quadrada. Ela é uma técnica de redissolução, que ocorre em duas etapas. A primeira é a etapa de deposição, que envolve a aplicação de um potencial suficientemente catódico para deposição eletrolítica dos metais de interesse sobre a superfície do eletrodo de trabalho (usualmente de mercúrio), com objetivo de preconcentrá-los. Em seguida, é feita a etapa de redissolução, a etapa de medição, em que o potencial é variado de forma linear ou de pulsos diferenciais no sentido anódico para promover a reoxidação dos metais depositados com monitoramento simultâneo da corrente gerada. A curva corrente vs potencial é chamada voltamograma. Sob condições constantes de agitação na etapa de deposição, posicionamento de eletrodo e com uso de eletrólito suporte para garantir o transporte das espécies por difusão e convecção, a corrente de pico obtida na etapa de redissolução geralmente é proporcional à concentração do analito no seio da solução. A concentração é determinada por adição de padrão. O potencial em que o pico aparece é característico de cada metal e é relacionado ao potencial redox padrão do metal, podendo ser usado para identificação qualitativa (Wang, 1982).

A técnica é executada em uma célula eletroquímica, um recipiente simples que pode ter volume entre 50 mL e 10 μ L (com o uso de microcélulas apropriadas), que contém a solução de amostra, dissolvida em um eletrólito suporte para eliminar a migração elétrica das espécies de interesse, e um sistema de 3 eletrodos. Entre os eletrodos, um é de trabalho, um de referência (como o Ag/AgCl, KCl 3M), e um eletrodo auxiliar (por exemplo, de platina). Dentro da cela eletroquímica a corrente flui entre o eletrodo auxiliar e o de trabalho, onde as espécies sofrem eletrólise, e o eletrodo de referência apresenta um potencial constante e tabelado que serve de referência para o potencial aplicado pelo potenciostato ao eletrodo de trabalho. Cada eletrodo de trabalho tem a sua faixa de trabalho, os limites de potencial em que pode ser utilizado sem que sofra oxidação (em potenciais mais anódicos) ou sem que o solvente sofra oxidação ou redução (potenciais anódicos ou catódicos). Os eletrodos de trabalho mais populares são o de gota pendente de mercúrio e o de filme fino de mercúrio, pois formam amálgamas com vários metais facilitando a sua pré-concentração, aumentando a sensibilidade. Eles são empregados em voltametria anódica pois o mercúrio se oxida em solução no potencial próximo a +0,1 V vs Ag/AgCl (KCl 3M). O eletrodo de filme fino de mercúrio é formado pela deposição de Hg⁰ a partir de uma solução de Hg(II) sobre uma superfície de um substrato condutor, como grafite, carbono vítreo, ouro ou platina. Ele vem sendo preferido ao eletrodo de gota pendente de mercúrio pois apresenta vantagens como uma elevada relação área superficial/volume, propiciando uma maior concentração de metal no amálgama e também por utilizar menos mercúrio, que é um metal tóxico.

A sensibilidade da ASV é atribuída à etapa de deposição, que pode demorar de poucos segundos até 30 minutos de acordo com o nível de concentração que se deseja determinar (de um nível de concentração de 0,1 ppm até cerca de 1 ppt para esses dois

tempos), entretanto cuidados especiais para evitar contaminação devem ser tomados para garantir a exatidão e reprodutibilidade em níveis de concentração muito baixos, como limpeza de bancada e manipulação adequada de soluções (Wang, 1982). O modo de medição de corrente e variação do potencial também afeta a sensibilidade do método. A voltametria de onda quadrada é uma técnica de pulso que resultou de melhoras instrumentais ao longo dos anos para compensar a corrente capacitiva, retirar ruídos e aumentar a sensibilidade, por isso ela é amplamente utilizada. Nela o potencial é aplicado em forma de escada sobre uma rampa de excitação resultando em pulsos, e a medição da corrente é feita no final da aplicação dos pulsos diretos e reversos, resultando numa corrente diferencial de maior sensibilidade pela rejeição a correntes capacitivas. Com essas melhorias, apesar da ASV não ser uma técnica nova, os limites de detecção obtidos com ela podem chegar ao nível de ppb (de 1 a 0,001 ppb), podendo ser comparados aos obtidos por técnicas espectroscópicas para diversos metais, principalmente os que são facilmente reduzidos e reoxidados. Os metais mensuráveis em concentrações traço pela ASV são basicamente os que têm a capacidade de formação de amálgama com o mercúrio entre eles cádmio, chumbo, cobre, zinco, bismuto, índio, tálio, antimônio, estanho, níquel, cobalto e gálio, muitos dos quais tóxicos e de interesse ambiental. Em um único ciclo de ASV quatro a seis íons metálicos podem ser medidos simultaneamente se houver separação clara entre os picos (Wang, 1982).

As principais interferências na ASV são a sobreposição de picos, efeitos de sorção de substâncias orgânicas e a formação de compostos intermetálicos. A sobreposição dos picos causa problemas na determinação simultânea de metais com similaridades nos potenciais de oxidação, por ser mais difícil fazer a leitura do pico. Conhecidamente a determinação simultânea de chumbo com estanho/tálio ou cádmio com

bismuto/antimônio é dificultada por sobreposição de picos. A presença de matéria orgânica com propriedades tensoativas dissolvidas é uma das mais sérias interferências em águas naturais. A camada de matéria orgânica adsorvida no eletrodo pode diminuir a taxa de deposição de metal ou mudar a reversibilidade da reação de oxidação do metal, resultando em um menor pico de corrente, alargamento de pico ou mudança do potencial do pico para valores mais positivos (Wang, 1982). Para evitar a adsorção de substâncias orgânicas sobre o eletrodo o recobrimento dos mesmos por materiais poliméricos tem sido empregado (Kokkinos et al., 2011). Uma estratégia para evitar a interferência nos picos de reoxidação é a troca do meio na etapa de redissolução por uma solução adequada para servir como meio de redissolução, livre de possíveis complexantes ou adsorventes que possam causar alargamento de picos ou analitos reduzidos em solução. Tal estratégia permite obtenção de picos mais definidos e representa uma melhoria na seletividade do método. Isso pode ser feito manualmente, trocando-se as celas e lavando-se os eletrodos, o que pode gerar efeitos de oxidação da amálgama por exposição ao O_2 atmosférico, e também pode alterar o posicionamento do eletrodo entre medidas, diminuindo a precisão das medidas e a robustez do método. A troca de meio pode ainda ser feita mecanicamente em sistemas de análise por injeção em fluxo, ou injeção sequencial, o que evita a exposição ao O_2 e diminui o problema de baixa robustez. A formação de intermetálicos ocorre na etapa de deposição, quando dois metais que têm tendência a se ligarem e formarem o composto intermetálico se depositam simultaneamente no eletrodo de trabalho. Isso faz com que o sinal dos metais envolvidos seja distorcido, perdendo a proporcionalidade com a concentração ou alterando o potencial do pico, o que inviabiliza a análise. Algumas medidas podem ser tomadas para eliminar ou diminuir a interferência como o uso de um terceiro elemento

que se ligue preferencialmente a um dos metais ou trocar o potencial de deposição para que um dos íons não se deposite.

Uma vantagem de usar ASV para determinação de metais em águas naturais é que ela permite a análise direta, eliminando etapas de concentração e usando o mínimo de reagentes no pré-tratamento da amostra, o que minimiza a possibilidade de contaminação e de ocorrerem mudanças físico-químicas das espécies a serem medidas. Um tratamento básico comumente aplicado a amostras de águas naturais é a acidificação (a pH 1 ou 2) com ácido ultra puro no momento da sua coleta, para evitar perdas de metais por adsorção nas paredes do recipiente. O ácido adicionado também serve de eletrólito suporte em análises de águas continentais com pouca quantidade de sal (Wang, 1982).

Outra característica da ASV é a capacidade de diferenciar as várias formas químicas de metais traço em contraste com absorção atômica ou ativação de nêutron, que determinam apenas concentrações totais (a não ser que sejam usadas em conjunto com técnica de separação) . Basicamente o sinal gerado pela ASV corresponde somente a metais livres e lábeis, pois eles são os mais disponíveis em solução e por isso sofrem reação de transferência de elétrons no eletrodo de trabalho. Isso faz com que o sinal analítico gerado seja diferenciado de metais fortemente complexados ou ligados a componentes coloidais, que têm uma taxa de dissociação muito menor do que a escala de tempo de deposição do experimento, ou ainda coeficientes de difusão muito menores do que dos íons livres. Por essas características diversas abordagens podem ser feitas em estudos de especiação e caracterização físico-química de metais utilizando a ASV (Wang, 1982). Um dos estudos mais realizados é o pré-tratamento da amostra de duas maneiras diferentes: o primeiro tratamento com a filtração e adição de um eletrólito

suporte, e o segundo pré-tratamento envolvendo algum tratamento vigoroso, como a utilização de peróxido de hidrogênio e fotólise por luz UV ou digestão ácida da amostra. O primeiro tratamento resulta na determinação de íons metálicos livres e complexos lábeis (que são os complexos que se dissociam numa taxa tão rápida quanto a deposição dos metais livres hidratados), e o segundo corresponde à concentração total, pois o tratamento drástico dissolve os agregados de metais ligados a componentes solúveis e coloidais, liberando-os em solução para serem determinados. Fazendo a subtração de metais livres dos metais totais podem ser determinadas as frações não-lábeis ou fortemente ligadas. Essa característica da ASV pode ser estendida a estudos de titulação voltamétrica, que envolve a adição de quantidades de íons metálicos em soluções contendo ligantes que formam complexos não redutíveis. O ponto final da curva de titulação (i_p vs metal adicionado) é relacionado com a concentração dos ligantes na solução. Esse tipo de titulação permite definir a capacidade de complexação de amostras de água, e estimar constantes de formação condicional de complexos orgânicos de metais.

1.6.1. Análise por injeção sequencial (SIA)

Métodos de análise em fluxo resultaram da busca por métodos analíticos com alta frequência de amostragem, baixo consumo de amostra e reagentes e um mínimo de interferência humana. Surgiram inicialmente com a proposta inovadora de que a análise química normalmente empregada em via úmida poderia ser realizada em fluxo contínuo de amostras e reagentes ao invés de somente em batelada. Uma abordagem revolucionária foi a análise por injeção em fluxo (FIA) que tem como conceito básico deslocar a amostra introduzida num fluido transportador (que pode ser uma solução reagente) ao longo do sistema até o detector, em condições altamente reprodutíveis de

dispersão e de tempo de reação (Ruzicka e Hansen, 1989). Dentro desse sistema a amostra pode misturar-se aos reagentes (dispersão) ou passar por etapas de tratamento, tais como diálise ou pré-concentração do analito em suportes sólidos. A principal inovação do FIA frente aos métodos em batelada e mesmo em relação aos analisadores de fluxo contínuo segmentado, foi que as medidas do sinal do detector passaram a ser feitas sem a necessidade de que as reações tivessem atingido a condição de equilíbrio químico. Isso foi possível graças à elevada reprodutibilidade das condições de dispersão e o preciso controle de tempo de reação nos sistemas FIA (Ruzicka e Hansen, 1989; Reis, 1995). Apesar do sucesso para a realização de análises seriais em ambientes de laboratório, o emprego de FIA em monitoramento de processos industriais se mostrou complicado devido à necessidade de manutenção frequente nas linhas de transmissão dos fluídos além da necessidade de recalibrações frequentes. Essas dificuldades orientaram pesquisas subsequentes que resultaram na Análise por Injeção Sequencial (SIA), que com a mesma versatilidade do FIA permite pouca ou quase nenhuma reconfiguração mecânica para análises diferentes e é dotado de uma linha principal o que diminui os problemas com manutenção. Além disso, o uso de bombas de seringa no lugar das bombas peristálticas aumentou a robustez do sistema (maior reprodutibilidade da vazão ao longo do tempo de uso e, portanto, dos tempos de reação) e diminuíram a necessidade de recalibrações (Ruzicka et al., 1990).

O SIA é uma técnica que tem grande potencial para medições on-line de processos e para monitorações ambientais, devido à simplicidade e automatização das manipulações amostrais e calibrações, além de estabilidade por longos períodos, baixa necessidade de manutenção e robustez. Tem os mesmos princípios do FIA: injeção precisa de amostra, dispersão controlada e alta precisão dos tempos de reação. A Figura 1 mostra as partes principais de um sistema SIA comum. O componente central do SIA é que garante a

versatilidade da técnica é a válvula seletora rotatória (multiportas), cuja finalidade é permitir a comunicação entre cada uma das portas (indicadas com a numeração 1-8) com a porta central pela rotação da válvula. Em cada uma dessas portas secundárias podem estar conectados tubos contendo amostras, reagentes, soluções de diluição, bobinas auxiliares, reservatório para acúmulo de resíduos, câmaras de misturas e outros sistemas auxiliares dependendo do que é necessário na análise. Durante uma análise, volumes pré-determinados de amostras e reagentes conectados a essas portas são aspirados sequencialmente para o interior da bobina coletora que fica entre a porta central e o sistema de propulsão, onde são agrupados. Revertendo-se a direção do fluxo, a zona de amostra é transportada em direção à cela de detecção através de uma bobina de reação, onde a sobreposição das zonas ocorre por uma combinação de efeitos de dispersão axial, dispersão radial e difusão (Masini, 2008; Gubeli et al., 1991)). Para a movimentação bidirecional do fluxo comumente se utiliza um sistema de propulsão que consiste em uma seringa de propulsão acoplada a uma bomba de pistão que pode exercer fluxo positivo ou negativo no sistema ao se movimentar para cima ou para baixo, aspirando ou injetando soluções. Para que haja volume de trabalho na seringa no começo da análise é aspirado um volume de solução transportadora (na posição entrada da válvula seletora na Figura 1), que também serve de solução de lavagem do sistema (posição saída), quando a bomba retorna à posição inicial. Toda operação é controlada por um computador que disponha de um programa específico para o SIA, que comanda a bomba e as válvulas de modo sincronizado, assim como a aquisição de dados do detector. As partes do sistema, indicadas pela linha tracejada na Figura 1, tornam-se então gerenciáveis pelo operador, exclusivamente por intermédio de interface computadorizada.

Figura 1: Esquema típico de um sistema SIA

Para otimização de um método em SIA devem ser considerados parâmetros físicos da bobina de reação, tais como diâmetro, comprimento e geometria da mesma. Além disso, condições como grau de sobreposição de zonas de reagentes e amostra, tempo de reação e concentração de reagentes também influenciam no resultado final (dos Santos e Masini, 2010). Ao contrário dos sistemas FIA, nos quais a adição de reagentes pode ser feita por confluência, nos sistemas SIA a mistura só se dá pelos processos de dispersão e difusão, por isso o SIA enfrenta algumas dificuldades em casos em que é necessário mistura de três ou mais zonas de reagentes, sendo normalmente empregadas câmaras de mistura. Algumas estratégias de amostragem podem ser utilizadas quando a sobreposição de zonas é um fator crítico para a análise, como amostragem binária, amostragem em sanduíche ou em fluxo monossegmentado (Vieira et al., 1998). No fluxo monossegmentado a zona de reação é isolada entre duas bolhas de ar (Pasquini et al.,

1985), uma imediatamente antes e outra logo após, para isolar a zona de reação e evitar a dispersão com solução transportadora. A diluição da amostra é limitada pela mistura com reagentes envolvidos na metodologia analítica e pode ser simplesmente calculada a partir dos volumes de amostra e reagentes após homogeneização adequada (Masini et al., 2002). Vieira et al. (1998) estudaram diferentes estratégias de amostragem em SIA, verificando que o monossegmento levou à maior sensibilidade em comparação com perfis sanduíches comuns em SIA. É importante ressaltar que o monossegmento só pode ser classificado assim se for isolado por duas bolhas; se somente uma bolha estiver nos limites das zonas ele é classificado apenas como segmento.

Uma das operações mais diretamente aplicadas no SIA é a adição de padrão pela diluição em linha de um único padrão de concentração mais alta. Variando-se o volume dessa solução padrão em cada análise, mas mantendo constante o volume combinado do par solução padrão /solução de diluição e o volume de amostra é possível criar um monossegmento de volume constante que fornece por simples cálculos de diluição os pontos experimentais para a construção da curva de adição de padrão. A aspiração das zonas é feita em perfil sanduíche de modo a facilitar a homogeneização, entretanto a formação do monossegmento e a movimentação do mesmo pela bobina de reação durante a análise pode não estar sendo o suficiente para sua homogeneização. Para checar a eficiência da homogeneização do monossegmento pode ser feito um estudo dos sinais analíticos obtidos com a formação do monossegmento em linha em comparação com uma solução preparada manualmente nas mesmas concentrações. A comparação dos sinais obtidos pode apontar se o monossegmento é homogêneo e o padrão formado no monossegmento tem o valor que se espera considerando as diluições de reagentes e amostras, ou se a sobreposição de zonas não é efetiva a ponto de impedir a

homogeneização do monossegmento.

Desde seu desenvolvimento o SIA foi utilizado na análise em vários tipos de amostras, desde alimentos e defensivos agrícolas, bebidas como vinho, leite e sucos e amostras ambientais. Em amostras de água foi usada na determinação de alguns metais como cálcio, magnésio, ferro, e manganês além de metais pesados como cobre e mercúrio. A metodologia analítica de determinação simultânea de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em extratos de sedimentos de rios utilizando SIA foi demonstrada em um trabalho de da Silva e Masini (2000), sendo os diferenciais do presente trabalho o uso da amostra certificada de sedimento, uso de eletrodos impressos e o uso de reversões de fluxo; e como semelhança o uso da solução de Ga(III) online para evitar a formação de intermetálico entre Cu e Zn. Em sua revisão sobre os 20 anos da análise por injeção sequencial, dos Santos e Masini (2010) reuniram várias aplicações publicadas do SIA dando enfoque a pesquisadores brasileiros destacando em cada publicação o analito, a matriz analisada, a frequência de amostragem da metodologia analítica, a faixa linear de trabalho, o limite de detecção e o tipo de detecção. Outras revisões mais abrangentes geograficamente foram publicadas nos últimos anos, abordando mais de 1500 publicações nessa área de pesquisa. Maiores informações podem ser obtidas nessas revisões (Idris, 2010; dos Santos e Masini, 2010; Mesquita e Rangel, 2009; Perez-Olmos et al., 2005; Lenehan et al., 2002).

1.6.2. SIA-ASV

Uma das maiores características do SIA é que uma grande variedade de técnicas instrumentais pode ser acoplada e usada para detecção. Como o SIA tem uma alta capacidade de manipulação de soluções e é mais flexível para aplicar parada de fluxo e reversão de fluxo, a combinação do mesmo com métodos voltamétricos de detecção que

têm uma etapa de pré-concentração antes da etapa de medição tem um alto potencial analítico: a etapa de pré-concentração pode durar o tempo que for necessário para o nível de concentração que se deseja alcançar enquanto o SIA executa simultaneamente a reversão de fluxo da zona de amostra sobre o eletrodo de trabalho. Além disso a alta reprodutibilidade de tempo e condições de mistura levam a alta reprodutibilidade do transporte de massa do interior da solução para a superfície do eletrodo, o que aumenta a precisão das medidas em comparação com métodos em batelada.

Os eletrodos utilizados em sistemas de fluxo podem ser eletrodos de gota de mercúrio, que apresentam superfície renovável de alta reprodutibilidade, mas frequentemente são eletrodos sólidos ou eletrodos de filmes finos, como o de mercúrio, que apesar de não serem tão facilmente renováveis apresentam melhor estabilidade mecânica para suportar o fluxo da solução (Siriangkhwut et al., 2011). Para utilização desses eletrodos é necessário usar uma célula de adaptação para o fluxo, que tenha um canal de entrada, um de saída, um mínimo volume morto e geometria adequada para oferecer boa estabilidade ao eletrodo. É importante destacar que o fluxo fornecido pelo sistema de injeção não pode ser tão grande a ponto de fazer a lixiviação da superfície do eletrodo de trabalho. Na maioria dos casos os eletrodos utilizados têm um filme de mercúrio pré-depositado com uma deposição tradicional em batelada pela aplicação de um potencial que reduza o Hg(II) em solução, mas o filme de mercúrio também pode ser gerado *in situ* com a ajuda do SIA, pela aspiração de uma solução de mercúrio que é depositada durante a etapa de deposição da análise, seguida da deposição dos metais a serem quantificados. O filme de mercúrio formado assim pode ser usado para várias análises ou ser formado a cada análise, o que pode fornecer uma superfície nova em cada corrida, apesar de gerar mais resíduo contaminado de mercúrio (Ivaska et al., 1997). Recentemente a substituição do mercúrio no eletrodo por materiais menos

tóxicos, como o bismuto, têm ganhado atenção, devido à toxicidade do mercúrio e regulações restringindo seu uso. O uso do bismuto como substituinte tem sido possível devido ao seu potencial analítico já que tem apresentado alta sensibilidade, picos bem definidos e sinais de redissolução com boa repetibilidade, além de ser tolerante a oxigênio dissolvido, eliminando a etapa de desoxigenação. Os eletrodos de filme de bismuto podem ser formados *in situ* com o auxílio do SIA assim como os de mercúrio (Keawkim et al., 2013).

Outra melhoria que o SIA proporciona é a possibilidade de troca do meio, permitindo determinações seletivas, pela mudança do eletrólito somente na etapa de redissolução, por um eletrólito adequado para diminuir a interferência de sobreposição de picos de diferentes metais (Ivaska et al., 1997). O meio de redissolução é a primeira solução aspirada ficando na seringa injetora, e no final da análise é injetada para a célula de detecção onde serve de meio para a redissolução e também serve de solução de lavagem preparando o sistema para a próxima análise.

1.7. Sensores Impressos

Os eletrodos de filme fino são obtidos com a deposição do material ativo sobre um substrato de carbono, cuja superfície precisa ser frequentemente polida, comprometendo a reprodutibilidade de medidas de alta precisão e uso dos eletrodos em instrumentação de campo. Para evitar essas limitações foram desenvolvidos eletrodos impressos, baratos e descartáveis, que dispensam a necessidade da retirada, polimento e reaproveitamento do eletrodo em análises subsequentes. Esses eletrodos são preparados previamente em laboratório podendo ser usados em campo, evitando a necessidade de formação do eletrodo de trabalho no momento da análise e o transporte e descarte de soluções tóxicas como de Hg(II). Eletrodos impressos de mercúrio, ouro e grafite são

atualmente disponíveis comercialmente. Potenciostatos compactos e portáteis operados a bateria também já são disponíveis comercialmente com o objetivo de controlar esses sensores em campo (Palchetti et al., 2005).

Os eletrodos impressos são a miniaturização de uma célula eletroquímica tradicional, feitos a partir da aplicação de diferentes camadas de tintas impressas em uma superfície de plástico inerte. Os sensores propostos por Palchetti et al. (2005) são fabricados primeiramente com a aplicação da tinta de prata para formar as partes condutivas (que depois são cobertas com tintas isolantes) e também o eletrodo de pseudo-referência de prata. Depois são pintados o eletrodo de trabalho e o contra-eletrodo pela aplicação de uma camada de tinta de grafite. Para obter o sensor final o eletrodo de trabalho de grafite é modificado com uma solução de mercúrio. O eletrodo é então recoberto com uma camada de Methocel®, um material polimérico que ajuda a enclausurar o filme de mercúrio e aumentar a robustez pela estabilidade mecânica. Em outros sensores, recobrimento com materiais poliméricos variados ou modificadores que são incorporados na tinta de grafite anteriormente à impressão foram utilizados conforme a necessidade de aplicação e o material do eletrodo de trabalho, seja ele de ouro, grafite, mercúrio ou bismuto (Keawkim et al., 2013). Nafion® é um polímero trocador catiônico perfluorosulfonado que pode pré-concentrar cátions próximos ao eletrodo de trabalho e ao mesmo tempo excluir interferentes aniônicos (Keawkim et al., 2013) , entretanto em soluções muito ácidas ele tem a sua morfologia alterada e apresenta problemas de sensibilidade. Methocel®, um derivado de celulose pode ser utilizado para o recobrimento e evitar esses problemas em soluções ácidas (Palchetti et al., 2005). Éteres coroa são misturados na tinta de grafite que irá pintar o eletrodo e podem melhorar a eficiência da detecção do íon metálico porque cátions metálicos específicos podem encaixar na cavidade da estrutura em coroa escolhida (Keawkim et

al., 2013). Recentemente, sensores impressos de bismuto e ouro foram utilizados para determinação voltamétrica automatizada por SIA de As(III), Cd(II), Pb(II) e Zn(II). Apesar das propriedades interessantes do Bi como eletrodo de trabalho na ASV, a presença de Cu(II) na amostra causa interferência na determinação de Cd(II), Pb(II) e Zn(II), e como consequência eletrodos baseados em mercúrio ainda são a melhor escolha em vários casos. Algumas revisões podem ser encontradas na literatura que explicam extensamente o desenvolvimento e o uso de sensores impressos (Metters et al., 2011; Angnes et al., 1998). O uso desses sensores em SIA é recente, e poucos trabalhos os utilizaram na combinação SIA-ASV. Alguns trabalhos usaram para determinação de metais em amostras ambientais e de alimentos, entre as quais, alguns são citados na Tabela 1:

Tabela 1: Trabalhos publicados que utilizaram sensores impressos em SIA-ASV para determinação de metais

Analito	Matriz	Faixa linear de trabalho	Limite de Detecção	Sensores impressos	Referência
Pb(II), Cd(II)	Amostras de arroz	0,5-60 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,11 $\mu\text{g L}^{-1}$	Nafion/Bi-Éteres em coroas	Keawkim et al. (2013)
Pb(II), Cd(II), Zn(II)	Ervas medicinais	2-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), 2-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd), 12-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Zn)	0,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd), 11 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Zn)	Nanotubos de carbono	Injang et al. (2010)
As(III)	Amostras de água	1-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Ouro	Punrat et al. (2013)
Pb(II), Cd(II)	Água de rio	-	0,03 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), 0,34 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd)	Bi (poroso)	Chen et al. (2013)
Pb(II), Cd(II)	Amostras de água e alimentos	0,5-15 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 15-70 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb e Cd)	Bi/Nanotubos de carbono	Ninwong et al. (2012)
Pb(II), Cd(II)	Água de lago	10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	6,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd)	Bi	Siriangkawut et al. (2009)
Pb(II), Cd(II) e Zn(II)	Amostras de água potável e de rio	0-70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), 0-70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd), 75-200 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Zn)	0,89 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pb), 0,69 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd), 54 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Zn)	Bi	Chuanuwatanakul et al. (2008)

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método para determinação de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em amostras ambientais por voltametria de redissolução anódica (ASV) explorando o uso de sensores impressos em potenciostato portátil, bem como um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para automatizar as etapas de injeção e condicionamento de amostra, viabilizando a construção de curvas de adição de padrão por diluição em linha da solução padrão. Para atingir esse objetivo as seguintes etapas de trabalho foram definidas como objetivos específicos:

- Avaliar a influência da frequência de onda quadrada, vazão e número de reversões sobre o sinal analítico.
- Avaliar a homogeneização do segmento formado pelo sistema SIA na construção das curvas de adição de padrão.
- Estudar a interferência do intermetálico formado entre Cu e Zn no eletrodo de trabalho e uso de solução de Ga(III) para contorná-la.
- Estudar a interferência de substâncias possivelmente encontradas em ambientes naturais (interferentes aniônicos e ligantes heterogêneos de ocorrência natural).
- Avaliar a exatidão da método proposto por estudos de recuperação em amostras de água e por comparação de concentrações obtidas em extrato de sedimentos com os valores certificados do material de referência.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Equipamentos e soluções

O laboratório é equipado com instrumentos para fins analíticos, e para o desenvolvimento das atividades do trabalho foram utilizadas balança analítica (precisão de 0,01 mg Mettler Toledo) e semi-analítica (precisão de 0,001 g Marte®), pipetas automáticas (Gilson®) com volumes variáveis, pipetadores (Eppendorf Research), mesa agitadora (Nova Técnica – NT145), Centrífuga (Excelsa Mod. 206BL, Fanem®), tubos para centrífuga com capacidade de 50 mL (Corning®), pH metro (Metrohm, 654), banho termostático (Ética 521D), membrana filtrante de acetato de celulose de 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho de poro (Sartorius Biolab Products®), além de balões volumétricos com volume de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 mL, béqueres de diversos volumes e geladeira para estocagem de amostras diversas. Soluções foram preparadas em água de pureza elevada após a água destilada em um destilador de vidro (MA 078, Marconi) ser desionizada até resistividade > 18 MΩ em um desionizador dotado de lâmpada UV (Simplicity 185, Milipore®).

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico Merck e Sigma-Aldrich. Para preparo das soluções as vidrarias foram previamente colocadas em solução de HNO_3 1 mol L^{-1} durante um dia para descontaminação de quaisquer metais existentes previamente. Todas as soluções foram preparadas na presença de HCl 0,1 mol L^{-1} para manter a concentração de Cl^- constante, igual à da solução transportadora. Foram utilizadas soluções padrão de 1 mg L^{-1} e 0,1 mg L^{-1} de Cu(II) , Pb(II) , Cd(II) e Zn(II) (juntos) pela diluição de soluções estoque de $\text{Cu(NO}_3)_2$, $\text{Pb(NO}_3)_2$, $\text{Cd(NO}_3)_2$ e $\text{Zn(NO}_3)_2$ 1000 mg L^{-1} . Foi utilizada solução de Ga(III) 4×10^{-5} mol L^{-1} obtida pela dissolução do sal $\text{Ga(NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ da Merck. Também foram preparadas soluções em diferentes concentrações a partir de soluções estoque ou sais de Al(III) , Ca(III) , Fe(III) , Mn(II) ,

Mg(II), Cl^- , PO_4^{3-} e SiO_3^{2-} e também ácido húmico (Aldrich) e fúlvico (cuja obtenção anterior por membros do laboratório está descrita em artigo (Colombo, dos Santos, Masini 2007) na presença dos metais estudados Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) para verificar se havia interferência na determinação. Solução de HCl concentrado foi diluída para obtenção de solução estoque de HCl 1 mol L^{-1} , que foi utilizada para preparar a solução transportadora. As soluções utilizadas na extração sequencial foram: **Ácido acético $0,11 \text{ mol L}^{-1}$** , preparado pela diluição do ácido acético glacial; **Cloridrato de hidroxilamina $0,5 \text{ mol L}^{-1}$** , com dissolução do sal cloridrato de hidroxilamina em água deionizada e ajustando-se o pH da solução para 2-3 com HNO_3 concentrado; **Peróxido de hidrogênio $8,8 \text{ mol L}^{-1}$** , preparado a partir da solução de 30% de H_2O_2 , tendo o pH da solução sido ajustado entre 2-3 com HNO_3 concentrado; **Acetato de amônio 1 mol L^{-1}** , preparado pela dissolução de acetato de amônio em água deionizada e ajustando-se o pH da solução para 2-3 com HNO_3 concentrado.

Foi utilizado o potenciostato portátil PalmSens (Palm Instruments BV, Utrecht, Holanda) junto com seus cabos e acessórios para realizar os experimentos de voltametria. Aplicação de potencial, leitura de corrente, aquisição, armazenamento e tratamento de dados foram comandadas pelo software PSTrace 1.4 instalado em um netbook Hewlett-Packard. Foram utilizados sensores impressos do tipo HM-Sensor, Universidade de Florença, comercializados pela PalmSens, com cela de fluxo apropriada. Tais sensores são constituídos por um eletrodo de pseudo referência de prata, um eletrodo auxiliar de grafite e um eletrodo de trabalho de filme de Hg depositado sobre eletrodo de grafite e recoberto com filme polimérico de éter de celulose (Methocel® 90HG). O eletrodo de trabalho tem uma área de $7,065 \text{ mm}^2$ (Palchetti et al., 2005).

A manipulação das soluções foi feita com um sistema de análise por injeção sequencial montado com uma válvula seletora da Vici-Valco (Texas, EUA) Cheminert® C25-3188EMH de 8 portas acoplada a uma bomba de pistão Cavro MicroCSP3000 com um sistema seringa/êmbolo Cavro 7250XP05.0 mL de 5,0 mL capacidade e uma válvula de três-posições construída em Kel-F. Para automação dos experimentos o sistema SIA foi controlado pelo software FIALab for Windows versão 5.9.320 (FIALab Instruments, Bellevue, WA, EUA), instalado em um netbook ASUS.

3.2. Sistema para determinações voltamétricas assistidas por sistema de análise de injeção sequencial (SIA-ASV)

O arranjo experimental foi feito de modo que o equipamento de análise por injeção sequencial estivesse acoplado à cela de fluxo e consequentemente ao sensor impresso. Tal sistema está representado na Figura 2. Estão representados os componentes principais do SIA, como a válvula da seringa (VS), seringa acoplada à bomba de pistão (BP), com capacidade de 5 mL, bobina coletora 1 de 0,8 mm de diâmetro interno, 3 m de comprimento e volume interno de 1,5 mL (BC1), bobina coletora 2 (BC2) com as mesmas dimensões de BC1 e válvula rotatória de 8 portas (VR). A célula eletroquímica de fluxo (CE) é uma peça de acrílico que comporta os sensores impressos, e tem uma conexão de entrada e uma de saída. Todas as ligações entre os componentes são feitas com conectores e tubos de Teflon de 0,8 mm de diâmetro interno. A posição “IN” da válvula de seringa conecta a seringa à solução transportadora de HCl 0,10 mol L⁻¹ (ST). A ST também está conectada na porta 6 da válvula rotatória, pois é usada como solução de diluição da solução concentrada de padrão. A porta 7 conecta BC1 à CE. Ligada diretamente após a CE está a BC2, onde as zonas de mistura entre amostra, padrão e ST são coletadas após passar pela CE. Na porta 4 está a solução padrão 0,1mg L⁻¹ de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) (P). Na porta 3

está a solução de Ga(III) $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, utilizada na determinação de Zn(II). A porta 5 é reservada para a amostra. Na porta 2 nada é conectado e a porta é usada para aspirar ar dentro dos tubos condutores visando minimizar a dispersão da zona amostra em BC1.

Figura 2: Representação do sistema SIA-ASV. ST = Solução transportadora HCl 0,10 mol L⁻¹

¹, BP = Bomba de pistão acoplada à seringa, VS = válvula seletora, BC1 e BC2 = bobinas coletoras 1 e 2 respectivamente, VR = Válvula rotatória, Ga(III) = solução de Ga(III) $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, P = Mistura de padrão de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) 0,1mg L⁻¹, A = amostra, CE = célula eletroquímica de fluxo, D = descartes

3.3. Ativação do eletrodo

Primeiramente foi necessário que os sensores impressos fossem ativados, o que foi feito por voltametria cíclica na faixa de potencial em que seriam feitas as análises, de -0,1 à -1,1 V vs pseudo referência de Ag (em meio de HCl 0,10 mol L⁻¹). Nessa faixa de potencial foram realizados 10 ciclos com velocidade de varredura de 0,1 V/s após um tempo de condicionamento de 300 segundos com aplicação do potencial de -1,1 V. Essa ativação foi feita com dispensa de 5 mL da ST na cela de fluxo (sistema com as portas 7

de VR e OUT de VS selecionadas). Como o tempo total da ativação foi de 500 s, o sistema SIA foi programado para aspirar 5 mL da ST (capacidade máxima da seringa) para serem dispensados pela BP à uma vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$.

3.4. Procedimento para determinações pelo sistema SIA-ASV utilizando o método de adição de padrão em linha

Todos os procedimentos foram baseados no acionamento simultâneo do programa que controla os componentes do SIA com o programa que controla a aplicação de potencial e aquisição de dados do potenciostato. O SIA executava os processos de aspiração, dispensa de volumes e parada de fluxo sincronicamente com os tempos de aplicação de potencial de condicionamento de eletrodo, de deposição, e da etapa de redissolução realizado pelo potenciostato.

O método para quantificação foi o da adição de padrão, pela diluição em linha do padrão de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ dos metais em $\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pela ST ($\text{HCl } 0,10 \text{ mol L}^{-1}$) comandada pelo SIA, que separava porções da amostra e adicionava quantidades conhecidas de padrão diluído. A determinação dos quatro metais foi feita em duas etapas: uma para determinação de Cu(II) , Pb(II) e Cd(II) e outra para determinação de Zn(II) .

3.4.1. Determinação de Cu(II) , Pb(II) e Cd(II)

Formação da zona de mistura: Com VS na posição IN, a BP aspirou 2 mL da ST para o interior da seringa a $200 \mu\text{L s}^{-1}$. Com VS em “OUT” BP aspirou $100 \mu\text{L}$ de ar pela porta 2 a $50 \mu\text{L s}^{-1}$ em direção à BC1. Essa bolha de ar impede a dispersão da zona de mistura (amostra, padrão e diluente) na solução transportadora. Em seguida, com a VS

na posição “OUT” BP aspirou a $50 \mu\text{L s}^{-1}$ um volume combinado de $100 \mu\text{L}$ do par ST/padrão pelas portas 6 e 7 de VR em volumes predeterminados para obtenção de pontos experimentais que fornecem a curva de adição de padrão. O próximo passo foi aspirar $200 \mu\text{L}$ de amostra pela porta 5 a $50 \mu\text{L s}^{-1}$. Na sequência a zona de mistura foi completada pela aspiração de mais 3 volumes (também chamados de plugues) de $100 \mu\text{L}$ do par ST/padrão intercalados por mais 2 volumes de $200 \mu\text{L}$ de amostra, como representado na Figura 3. Vale ressaltar que cada vez que válvula rotatória muda de posição a bomba de pistão fica parada para evitar variações de pressão bruscas que podem implicar na formação de bolhas de ar não programadas na zona de mistura. Durante esse período o potenciostato aplicou um potencial de $-0,1\text{V}$ para promover a limpeza e condicionamento da célula eletroquímica pela dissolução de algum metal que ainda ficou depositado no eletrodo na análise anterior. Na Tabela 2 estão os volumes aspirados para construções dos pontos experimentais e suas respectivas concentrações dos padrões.

Figura 3: Perfil da zona de mistura na bobina coletora para determinação de Cu, Pb e Cd formado por bolha de ar, amostra (A), solução transportadora HCl $0,10\text{mol L}^{-1}$ (ST), solução padrão de $0,1\text{mg L}^{-1}$ de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em HCl $0,10\text{mol L}^{-1}$ (P)

Tabela 2: Dados complementares para a construção da curva de adição de padrão para determinação de Cu, Pb e Cd				
Ponto	Volume amostra (μL)	Volume ST (μL)	Volume padrão $0,1\text{mg L}^{-1}$ (μL)	Concentração de padrão (mg L^{-1})
1	600	400	0	0
2	600	360	40	0,0040
3	600	320	80	0,0080

*Os volumes totais aqui mostrados são divididos na zona de mistura

Envio da zona de mistura à CE e reversão de fluxo: Com o segmento de 1 mL formado na BC1, VR foi posicionada na porta 7 e BP injetou 950 μL do mesmo na CE com vazão de $10\text{ }\mu\text{L s}^{-1}$, sendo recolhido na BC2. O volume injetado foi reduzido em 50 μL para evitar que a bolha entrasse na CE. Depois disso foi feita a reversão de fluxo com a retração do pistão de BP, que aspirou 950 μL da solução em BC2 de volta a BC1 na mesma vazão, para sua passagem novamente pela superfície do eletrodo e homogeneização da mistura. Uma nova reversão foi feita dispensando novamente a zona de mistura com a mesma vazão de $10\text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ em direção à BC2 passando novamente pela CE. No total o volume do segmento passado 3 vezes sobre o eletrodo. Durante essa etapa o potenciostato aplicou o potencial de deposição de -1,0V, promovendo a redução de Cu(II), Pb(II) e Cd(II) no eletrodo de filme de Hg.

Troca do meio e redissolução: Ainda com aplicação do potencial de -1V, a bomba de pistão eliminou a bolha de ar dispensando 400 μL à vazão de $200\text{ }\mu\text{L s}^{-1}$ (volume da bolha e da zona de mistura não injetada em CE mais um pequeno volume da ST) pela porta 8, para que a bolha não entrasse na CE. Então a VR foi conectada novamente na

porta 7 e BP injetou 450 μL da ST que estava na seringa, à vazão de 100 $\mu\text{L s}^{-1}$, fazendo com que o restante da zona de mistura fosse enviada ao descarte e a CE fosse preenchida com ST, seguindo-se uma etapa de parada de fluxo. Com o fluxo parado e solução de HCl 0,10 mol L^{-1} na CE, o potenciostato fez a varredura de potencial de -1V à -0,1V. A técnica para medição de corrente foi a voltametria de onda quadrada com degrau de potencial 6mV, amplitude de pulso 40 mV e frequência de 100Hz. Após o tempo de parada de fluxo suficiente para a obtenção do voltamograma todo o volume restante de ST foi dispensado através da porta 7 da VR, esvaziando a seringa e deixando todo o sistema pronto para realizar mais uma análise.

3.4.2. Determinação de Zn(II):

O procedimento para determinação de Zn(II) foi similar ao descrito para determinação dos outros metais, com a diferença que após aspirar o padrão, solução de diluição e amostra, foi aspirada uma zona de solução de Ga(III). Como a solução de Ga(III) foi a última a ser aspirada, na reversão do fluxo essa zona foi a primeira a chegar a CE, onde ocorreu a redução de Ga(III) a Ga^0 , que por sua vez formou um intermetálico estável com Cu^0 e evitou a formação do intermetálico Zn-Cu, que distorceria o sinal referente aos dois metais. O potencial aplicado foi de -1,3 V e a varredura foi de -1,3 à 0,9 V.

Formação da zona de mistura: Com VS na posição IN, a BP aspirou 2 mL da ST para o interior da seringa a 200 $\mu\text{L s}^{-1}$. Com VS em “OUT” BP aspirou 100 μL de ar pela porta 2 a 50 $\mu\text{L s}^{-1}$ em direção à BC1 que formou a bolha que impede a dispersão da zona de mistura na ST. Em seguida, com a VS na posição “OUT” BP aspirou a 50 $\mu\text{L s}^{-1}$ um volume combinado de 100 μL do par ST/padrão pelas portas 6 e 7 em volumes predeterminados para obtenção dos pontos experimentais da curva de adição de padrão.

Então aspirou-se 200 μL de amostra pela porta 5 a $50 \mu\text{L s}^{-1}$. A zona de mistura continuou a ser formada pela aspiração de mais 3 plugues de 100 μL do par ST/padrão intercalados por mais 2 volumes de 200 μL de amostra assim como no procedimento da determinação dos outros metais. A zona de mistura foi completada pela aspiração de 200 μL da solução de $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Ga(III) pela porta 3, formando uma zona de mistura de 1200 μL , assim como mostrado na Figura 4. Durante esse período o potenciostato aplicou um potencial de -0,1V para condicionamento do eletrodo. Na Tabela 3 estão os volumes aspirados para construções dos pontos experimentais e suas respectivas concentrações dos padrões.

Figura 4: Perfil da zona de mistura na bobina coletora para determinação do Zn, formado por bolha de ar, amostra (A), solução transportadora HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (ST), solução padrão de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) em HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (P) e solução $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Ga(III) (Ga)

Tabela 3: Dados complementares para a construção da curva de adição de padrão da zona de mistura de 1200 μL (200 μL de Ga(III)) para determinação do Zn(II)				
Ponto	Volume amostra (μL)	Volume ST (μL)	Volume padrão $0,1\text{mg L}^{-1}$ (μL)	Concentração de padrão (mg L^{-1})
1	600	400	0	0
2	600	360	40	0,0033
3	600	320	80	0,0066

Envio da zona de mistura à CE e reversão de fluxo: Com o segmento de 1,2 ml formado na BC1, VR foi posicionada na porta 7 e BP injetou 1150 μL do mesmo na CE com vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$, sendo recolhido na BC2. Depois disso foi feita a reversão de fluxo com a retração a BP, que aspirou 1150 μL da solução em BC2 de volta a BC1 na mesma vazão. Uma nova reversão foi feita dispensando novamente a zona de mistura com a mesma vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$ em direção à BC2 passando novamente pela CE. Durante essa etapa o potenciostato aplicou o potencial de deposição de -1,3V, um potencial suficiente para reduzir o Zn(II) no eletrodo de filme de Hg, juntamente com o Cu(II), Pb(II) e Cd(II), apesar de não serem os íons de interesse. Os outros metais tiveram sua análise na etapa anterior em que o potencial aplicado não foi suficiente para depositar o Zn garantindo que não haja interferência no sinal.

Troca do meio e redissolução: Ainda com aplicação do potencial de -1,3 V, a bomba de pistão eliminou a bolha de ar conforme descrito no item anterior, dispensando 400 μL à vazão de $200 \mu\text{L s}^{-1}$ pela porta 8 de VR. Então a VR foi conectada novamente na porta 7 e BP injetou 450 μL da ST que estava na seringa, à vazão de $100 \mu\text{L s}^{-1}$, fazendo com que a solução de amostra misturada ao padrão fosse enviada ao descarte e

a CE fosse preenchida com ST, seguindo-se uma etapa de parada de fluxo. Com o fluxo parado e solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ na CE, o potenciostato fez a varredura de potencial de -1,3V à -0,9V. A medição de corrente foi feita do mesmo modo da determinação dos outros três metais, com voltametria de onda quadrada como técnica com degrau de potencial 6 mV, amplitude de pulso 40 mV e frequência de 100Hz. Após o tempo de parada de fluxo suficiente para a obtenção do voltamograma todo o volume restante de ST foi dispensado através da porta 7 da VR, esvaziando a seringa e deixando todo o sistema pronto para realizar mais uma análise.

3.5. Amostras

A metodologia de determinação de metais foi aplicada em 3 tipos de amostras de águas e em extratos obtidos pela extração sequencial da amostra certificada de sedimento CRM-701. Foram analisadas uma amostra de água de torneira, uma amostra de água de nascente do Parque Jaraguá, localizado na serra da Cantareira na cidade de São Paulo, e uma amostra sintética de água deionizada para verificação do funcionamento do sistema (volume de amostragem, diluição automática, funcionamento do eletrodo, tempos de aspiração e dispensa sincronizados com aplicações dos potenciais). A amostra de sedimento CRM-701, é preparada e fornecida pelo Programa de Testes, Medidas e Padrões da Comissão Europeia e tem a concentração de alguns metais certificada, inclusive de Cu, Pb, Cd e Zn, os metais que foram estudados. Os extratos e amostra da nascente do Parque Jaraguá foram filtrados em filtro de membrana de 0,45 µm antes de serem analisados. Todas as amostras e extratos foram preparados em meio de HCl 0,10 mol L⁻¹.

3.6. Procedimento de extração sequencial para o material certificado de sedimento CRM-701

O procedimento da extração sequencial foi feito em triplicata e é descrito a seguir:

Primeira etapa: Uma massa de 0,5 g ($\pm 0,01$ mg) do sedimento CRM-701 foi pesada em balança analítica e transferida para um tubo de centrífuga de 50 mL onde foram adicionados 20 mL da solução de ácido acético $0,11 \text{ mol L}^{-1}$. Então o tubo foi tampado e a extração foi feita com a agitação do tubo fixado em mesa agitadora por 16 horas com velocidade rotação de 100 rpm. Após esse tempo o extrato foi separado do resíduo sólido por centrifugação por 20 minutos e coleta do líquido sobrenadante. O extrato foi filtrado em filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e analisado. O resíduo foi lavado pela adição de 20 mL de água desionizada, agitação por 15 minutos na mesa agitadora e centrifugação à 5000 rpm por 20 minutos, com descarte do sobrenadante. Com o resíduo foi feita a segunda etapa da extração.

Segunda etapa: Ao resíduo da primeira etapa da extração ainda no tubo de centrífuga de 50 mL foram adicionados 20 mL da solução de cloridrato de hidroxilamina $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Com o tubo tampado e fixado na mesa agitadora foi feita a extração com a agitação por 16 horas na rotação de 100 rpm. Após esse tempo o extrato foi separado do resíduo sólido por centrifugação à 5000 rpm por 20 minutos. O extrato foi filtrado em filtro de membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e analisado. O resíduo foi lavado pela adição de 20 mL de água deionizada, agitação por 15 minutos na mesa agitadora e centrifugação por 20 minutos, com descarte do sobrenadante. Com o resíduo foi feita a terceira etapa da extração.

Terceira etapa: Adicionou-se 5 mL de peróxido de hidrogênio $8,8 \text{ mol L}^{-1}$ ao resíduo em pequenas alíquotas para evitar perdas devido a possível reação violenta. O frasco foi

coberto com a tampa solta para permitir a liberação de gases e então foi feita a digestão à temperatura ambiente. Continuou-se a digestão por mais uma hora em banho-maria a 85°C e em seguida o volume foi reduzido para menos de 3 mL por manutenção do aquecimento do tubo. Foi adicionado mais 5 mL de peróxido de hidrogênio 8,8 mol L⁻¹ seguindo-se novo aquecimento por 1 hora a 85°C e, após isso, até o volume ser reduzido para aproximadamente 1 mL, tomando cuidado para não secar totalmente. Adicionou-se 25 mL da solução de acetato de amônio 1 mol L⁻¹ ao resíduo resfriado e agitou-se por 16 horas à temperatura ambiente com a fixação do tubo na mesa agitadora com rotação de 100 rpm. Separou-se o extrato do resíduo sólido por centrifugação e decantação como nos dois primeiros passos de extração. O extrato foi filtrado em filtro de membrana de 0,45µm e analisado.

3.7. Tratamento de dados

3.7.1. Determinação dos metais na amostra ou solução extratora usando curva de adição de padrão

A curva de adição de padrão pode ser representada por

$$i = k(C_p + C)$$

Onde i é a corrente de pico, C_p é a concentração de padrão adicionado à solução da amostra, C é a concentração do analito que se quer determinar e k é uma constante que engloba o número de elétrons envolvidos, área de eletrodo, constante de Faraday, coeficiente de difusão, espessura da camada de difusão, além do tempo de deposição e dos parâmetros inerentes à técnica de voltametria onda quadrada. A elevada reprodutibilidade dos padrões de fluxo fornecida pelo bombeamento do sistema SIA

garante elevada reprodutibilidade da espessura da camada de difusão e dos tempos de deposição. Como todos os outros parâmetros são mantidos constantes de uma medida para outra, o valor de k se mantém constante.

A equação pode ser reescrita como:

$$i = kC_p + kC$$

De onde se deduz que um gráfico de i em função de C_p deve fornecer uma linha reta (Figura 5) cujo coeficiente angular fornece k . Mais importante, quando $i = 0$, os valores de C_p e C se igualam em módulo, permitindo obter o valor da concentração do analito na matriz da amostra.

Figura 5: Curva de adição de padrão dos experimentos

3.7.2. Determinação dos metais no sedimento

Sabendo-se a concentração dos metais nos extratos, a concentração dos metais na amostra sólida de sedimento é encontrada segundo a seguinte equação:

$$C_{sed} (mg\ kg^{-1}) = \frac{C_{ex}(mg\ L^{-1}) \times V_{ex} (L)}{m_{sed} (kg)}$$

Onde, C_{sed} = concentração do metal no sedimento;

C_{ex} = concentração do metal na solução extratora;

V_{ex} = Volume utilizado da solução extratora;

m_{sed} = massa da amostra de sedimento

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ativação do Eletrodo

A ativação do eletrodo de filme de Hg foi necessária no sentido de obter um baixo nível de corrente de fundo (residual) e voltamogramas reprodutíveis com alta relação sinal/ruído na presença dos analitos. A aplicação de potencial de -1,1V foi feita por 300 segundos para reduzir o Hg(II) do acetato de mercúrio remanescente no filme de Methocel[®] a Hg metálico (Palchetti et al., 2005), que é a espécie capaz de formar amálgama com os metais. Em seguida foi executada a voltametria cíclica entre -1,1V e -0,1V até obter sinais baixos e estáveis, o que se percebe nos últimos voltamogramas obtidos (Figura 6). Nos primeiros voltamogramas uma variação de potencial provocou uma grande variação na corrente por volta de -0,6 V, já nos últimos a variação foi pequena e a corrente de fundo baixa e estável, o que implicaria em limites de quantificação e detecção menores (Palchetti et al., 2005). Tanto o potencial inicial de -1,1V aplicado por 300 s como as varreduras de potencial influenciam no tamanho das gotículas de Hg depositadas sobre a base de grafite levando à formação de um filme estável, o que confere reprodutibilidade e sensibilidade às medidas (Zakharchuk et al, 1999). Outro importante fenômeno relacionado com o desempenho do sensor é a

hidratação da película de Methocel® que ocorre na etapa de ativação (Palchetti et al, 2005). Esse procedimento foi feito em HCl 0,10 mol L⁻¹ como eletrólito suporte por ser o meio usado na determinação eletroquímica dos metais, e mais importante, por fornecer uma concentração constante de cloreto que é necessária no eletrólito suporte para manter o potencial do eletrodo de pseudo referência de Ag constante ao longo das medidas (Palchetti et al., 2005). A ativação sob condições de fluxo contínuo de HCl 0,10 mol L⁻¹ ajuda a eliminar impurezas que venham a ser lixiviadas do filme de Methocel®, ou liberadas do sensor durante o processo, diminuindo a chance de contaminação. A faixa de ciclagem de potencial foi escolhida por ser a mesma faixa de trabalho que o eletrodo foi utilizado nos experimentos. A ativação foi feita em todos os eletrodos utilizados, e com pouca variação, resultaram em voltamogramas mostrados na Figura 6.

Figura 6: Típicos voltamogramas da ativação do eletrodo por voltametria cíclica

4.2 Homogeneização da zona de mistura

A aspiração de solução padrão, solução de diluição e amostra dentro do sistema de fluxo é caracterizada por não resultar em concentrações uniformes na zona de mistura, mas em gradientes de concentração, especialmente no caso de sistemas de linha única como no caso da injeção sequencial. Em função disso a determinação de analitos por adição de padrão em linha requer a determinação dos coeficientes de dispersão em tempos bem determinados em uma região que contém apenas amostra e em outra região que contém a mistura (interdispersão) da solução de amostra com a solução padrão (Ruzicka e Hansen, 1989). Alternativamente, a associação das técnicas de análise por injeção sequencial e análise em fluxo monossegmentado (Pasquini et al., 1985) permite a formação de segmentos de solução com concentração que pode ser calculada facilmente pela simples diluição de um volume conhecido da solução padrão no volume total do monossegmento, o qual atuaria como um pequeno balão volumétrico desde que a solução fosse homogeneizada (Masini et al., 2002). A passagem da zona de amostra pelos conectores do sistema (com diferentes diâmetros internos) gera turbilhões que ajudam a homogeneizar a solução sem fragmentar o monossegmento. Além disso, a reversão de fluxo inerente à análise por injeção sequencial (Gubeli et al., 1991) acentua esse efeito. Mesmo assim se a homogeneização não for suficiente o segmento pode ser enviado a um recipiente auxiliar com agitação antes de ser injetado no detector.

Silva e Masini (2002) estudaram a aplicação da adição de padrão em linha em soluções de azul de bromotimol (BTB) com detecção fotométrica num sistema com arranjo mecânico similar ao da presente dissertação. Utilizando a formação de um monossegmento com um perfil de sanduiche pela aspiração intercalada das soluções, Vieira et al. (1998), provaram que o mesmo estava completamente homogeneizado. A estratégia usada foi a comparação entre sinais analíticos de soluções de mesma

concentração nominal de BTB preparadas, ou pela diluição automática de um padrão em linha, ou manualmente (em um balão volumétrico conectado a todas as portas da VR), e analisadas pelo mesmo procedimento. Monossegmento se define como um volume bem definido isolado por duas bolhas para evitar a dispersão com a solução transportadora em ambas as extremidades. No presente estudo não foi formado um monossegmento propriamente dito já que foi aspirada somente uma bolha no sistema, e não duas, de modo que uma das extremidades da zona de mistura dispersou limitadamente na solução transportadora contida na cela de fluxo e bobina coletora BC2 (Figura 2).

Uma abordagem semelhante à realizada por Silva e Masini (2002) foi realizada, comparando o sinal de corrente de soluções preparadas de modo automático em linha com o sinal obtido de soluções preparadas manualmente em um balão volumétrico e conectando todas as portas ao balão. Para formar a zona de mistura em linha um segmento de perfil igual ao da Figura 3 foi formado aspirando-se solução transportadora no lugar da amostra e plugues da solução padrão para chegar nas concentrações iguais a dos balões volumétricos. Para a concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ foram aspirados 4 plugues de 25 μL da solução padrão 1 mg L^{-1} . Para chegar na concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, como não dava número exato se dividido por 4, os volumes dos 4 plugues foram 12, 13, 13 e 12 μL , com o padrão de 1 mg L^{-1} . Para chegar na concentração de $0,005 \text{ mg L}^{-1}$, uma concentração 10 vezes menor que a anterior, os volumes dos plugues foram de 12, 13, 13 e 12 μL com o padrão diluído 10 vezes, ou seja, um padrão de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Pôde-se provar que as soluções geraram sinais de intensidade similares (Figura 7) e o procedimento de reversão de fluxo no arranjo mecânico proposto para os experimentos foi suficiente para a homogeneização da zona de amostra (ou deposição de quantidades de matéria similares no eletrodo de trabalho). Na Tabela 4 está a comparação dos

valores de corrente de pico das soluções assim como o fator de correção entre as soluções preparadas em linha e manualmente, notando-se que todos os valores ficaram próximos de 1.

Figura 7: Voltamogramas obtidos para soluções preparadas em linha e manualmente em três concentrações diferentes, sob as seguintes condições: tempo de condicionamento de 100 s; volume da zona de mistura de 1000 µL; vazão de 10 µL s⁻¹; empregando-se 3 reversões de fluxo; tempo de deposição 315 s; frequência de pulsos de 100 Hz

Tabela 4: Comparação dos valores de corrente de pico (Ip) de soluções preparadas em linha e manualmente									
Concentração (mg L ⁻¹)		Cu (μA)	Pb (μA)	Cd (μA)	Zn (μA)	Fator de correção (Ip manual ÷ Ip em linha)			
						Cu	Pb	Cd	Zn
0,005	manualmente	1,228	3,217	1,208	0,684	0,945	1,107	1,05	1,05
	Em linha	1,360	2,905	1,150	0,647				
0,05	manualmente	32,07	27,084	17,476	2,832	1,026	1,027	0,956	0,936
	Em linha	31,23	26,364	18,272	3,087				
0,1	manualmente	40	37,651	22,255	7,498	0,998	0,998	1,01	1,120
	Em linha	40,065	37,716	21,875	6,689				

Embora não seja possível dizer que a zona de mistura formada esteja completamente homogeneizada, com esse teste é possível afirmar que durante o experimento a mesma quantidade de metal depositada é similar àquela obtida de um segmento de mesmo volume perfeitamente homogêneo, e que a dispersão na extremidade em contato com a solução transportadora é limitada, o que aumenta a confiança das medidas.

4.3. Desenvolvimento do método

Com o sistema montado pela associação das técnicas SIA e ASV, foi avaliada a variação de alguns parâmetros operacionais e seu efeito direto na magnitude dos sinais analíticos medidos pelo sistema. Enquanto o parâmetro avaliado era variado em alguns valores os outros permaneciam constantes (abordagem univariada). O valor do parâmetro que resultava em maior sinal era escolhido para a realização das análises.

Foram avaliados a frequência de aplicação de pulsos de potencial de onda quadrada, a vazão da zona de mistura e o número de reversões de fluxo. Foi utilizado uma solução padrão de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ dos metais como amostra para formar uma zona de mistura com volume de $1000 \mu\text{L}$.

4.3.1. Frequência de onda quadrada

Com o objetivo de encontrar a frequência de aplicação de pulsos que resultasse no maior sinal de corrente foram feitas medidas voltamétricas empregando frequências de pulsos de 25, 50, 75 e 100 Hz, com a vazão de $50 \mu\text{L s}^{-1}$ e utilizando uma reversão de fluxo. A importância da frequência de pulso vem do fato que se ela for muito baixa, ruídos provenientes de circuitos eletrônicos passam a interferir nas respostas voltamétricas, e se for muito alta, da ordem de 1000 Hz, pode sofrer desvios de linearidade em função da resistência da própria solução. Souza *et al.* (2003) em sua revisão explica teoricamente que o aumento da frequência de aplicação de pulsos de potencial normalmente causa um aumento na resposta de corrente. Na Figura 8 estão os resultados da influência da frequência de aplicação de pulsos nas medidas voltamétricas. Pode se ver que a maior frequência, de 100 Hz, resultou em maiores picos de corrente, sendo essa a frequência escolhida para as medidas voltamétricas.

Figura 8: Variação da corrente de pico para as frequências de aplicação de pulsos avaliadas (25, 50, 75 e 100 Hz) sob as seguintes condições: tempo de condicionamento de 100 s; tempo de deposição de 70 s, utilizando vazão de $50 \mu\text{L s}^{-1}$ e uma reversão de fluxo.

4.3.2. Vazão

A vazão no sistema em fluxo tem marcante influência na intensidade do sinal analítico de um detector voltamétrico, pois determina o tempo de contato entre solução da amostra e o eletrodo, portanto o tempo da etapa de deposição. Uma vazão baixa durante a etapa de deposição proporciona maior tempo de contato. Por outro lado, baixas vazões proporcionam baixa agitação mecânica da solução na cela de fluxo, o que aumenta a espessura da camada de difusão diminuindo a eficiência do transporte de massa do íon metálico do seio da solução para a superfície do eletrodo. Portanto, deve existir uma vazão que balanceie esses dois efeitos e resulte em um sinal de maior intensidade. No presente trabalho a menor vazão testada foi a que proporcionou o maior sinal de corrente, mostrando que o que prevaleceu foi a influência do maior tempo de contato do analito com o eletrodo. Utilizando-se uma reversão de fluxo e frequência de

aplicação de pulsos de 100 Hz, foram feitas medidas voltamétricas a vazões de 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L s}^{-1}$, com tempo de condicionamento de 100 s e tempos de deposição de 280, 180, 90, 63 e 55 s respectivamente. Como se pode ver na Figura 9, a vazão de 10 $\mu\text{L s}^{-1}$ proporcionou o maior sinal de corrente para todos os metais, sendo a vazão escolhida para o procedimento de determinação dos mesmos.

Figura 9: Variação da corrente de pico para as vazões avaliadas (10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{L s}^{-1}$) sob as seguintes condições: tempo de condicionamento de 100 s; tempos de deposição de 280, 180, 90, 63 e 55 s; frequência de pulsos de 100 Hz.

4.3.3. Número de reversões de fluxo

A reversão de fluxo, além de auxiliar na homogeneização da zona de mistura é um meio de aumentar o tempo de deposição da amostra antes de enviá-la ao descarte, aumentando assim a quantidade de metal depositada e o pico de corrente quando feita a redissolução dos metais. Após a amostra passar pelo detector uma vez, sem interromper a aplicação do potencial, a direção do fluxo é revertida pelo SIA e a zona de mistura é

colocada em contato com o eletrodo novamente, à medida que retorna para a bobina coletora BC1 (Figura 2). Com a vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$ durante a etapa de deposição foram avaliadas as correntes de pico dos metais estudados utilizando-se uma reversão (ou seja, somente uma passagem no eletrodo, considerando que a primeira reversão ocorre ao enviar a zona de amostra recém-formada na bobina coletora ao detector), três reversões, cinco reversões e sete reversões da zona de mistura, e tempos de deposição de 280, 315, 550 e 730 s respectivamente. Pode-se ver pela Figura 10 que existe um aumento quase linear da intensidade de pico com o número de reversões (mais para o Cu do que para os outros metais). Esse gráfico mostra que se pode aumentar o número de reversões com o objetivo de aumentar a intensidade da corrente de pico dentre o número de reversões avaliadas. Se forem feitas muitas reversões é provável que o eletrodo chegue a um ponto de saturação devido à um tempo de deposição muito grande, e o aumento da corrente devido à deposição de maior quantidade de metal deixaria de ser linear, portanto a partir desse ponto não faria sentido fazer mais reversões. Para escolher o número de reversões que seria utilizada no procedimento foi necessário encontrar um compromisso entre tempo de análise e intensidade de sinal, já que com a vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$ duas reversões de fluxo a mais representam um aumento no tempo de cada injeção de aproximadamente 200 segundos para uma zona de amostra de $1000 \mu\text{L}$ (na determinação do Cu, Pb e Cd) e de 240 segundos para uma zona de amostra de $1200 \mu\text{L}$ (na determinação do Zn). O tempo de cada injeção não corresponde somente ao tempo de deposição, pois a aspiração da ST, formação da zona de mistura, eliminação da bolha e troca do meio também tem de ser considerados (e são constantes, independentemente do número de reversões utilizado). Sendo assim ao se utilizar 3 reversões sob a vazão de $10 \mu\text{L s}^{-1}$ a determinação de Cu, Pb e Cd tem um tempo de análise de 415 s resultando em 8,6 injeções por hora. Para a determinação do Zn o

tempo de análise é de 480 s o que resulta em 7,5 injeções por hora, havendo um ganho no sinal em comparação com somente 1 reversão de 127% (8,761 μA a 19,88 μA para o Cu). Se fossem utilizadas 5 reversões esses tempos seriam de aproximadamente 515 s para a determinação de Cu, Pb e Cd e 700 s para a determinação de Zn, resultando em 6,9 e 5,14 injeções por hora respectivamente, com um ganho no sinal de 52% para o Cu (19,88 μA a 30,22 μA), ou seja, um ganho menor no sinal com um acréscimo ainda maior no tempo de análise. Ao utilizar três reversões há um aumento considerável no sinal e o tempo de deposição não fica tão longo a ponto de inviabilizar a análise, por isso foi o número de reversões utilizadas no procedimento.

Figura 10: Variação da corrente de pico para o número de reversões avaliadas (1, 3, 5 e 7) sob as seguintes condições: tempo de condicionamento de 100 s; tempos de deposição de 280, 315, 550, 730 s, utilizando vazão de 10 $\mu\text{L s}^{-1}$; frequência de pulsos de 100 Hz.

4.3.4. Parâmetros Analíticos

Com o procedimento do método estabelecido foram determinados os seguintes parâmetros analíticos para a determinação dos metais: faixa de resposta linear, limite de detecção e limite de quantificação.

Para se avaliar a extensão da faixa de resposta linear primeiramente foram variadas as concentrações dos metais (preparados em HCl 0,10 mol L⁻¹) na faixa de 0,01 a 0,5 mg L⁻¹, e obteve-se a curva mostrada na Figura 11. Como se pode ver, houve uma baixa linearidade a partir da concentração de 0,1 mg L⁻¹, provavelmente devido à saturação do eletrodo, exceto para o Zn, que apresentou uma resposta linear em toda a faixa de trabalho analisada.

Figura 11: Variação das correntes de pico em função da concentração dos íons metálicos sob as seguintes condições experimentais: volume de amostra = 1000 μL ; número de reversões = 3; vazão = 10 $\mu L s^{-1}$; tempo de deposição = 315 s; tempo de condicionamento = 100 s; frequência de onda quadrada = 100 Hz; amplitude do pulso de potencial = 40 mV; incremento de varredura de potencial = 6 mV.

Como nessa faixa de concentração a linearidade foi baixa, foi estudada uma faixa de concentração mais baixa, de $0,0025 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, obtendo-se os voltamogramas para cada nível de concentração, apresentados na Figura 12, a partir dos quais foram construídas as curvas analíticas da Figura 13. As regressões lineares das curvas analíticas da Figura 13 estão na Tabela 5.

Figura 12: Voltamogramas obtidos na faixa de concentrações de $0,0025$ a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ sob as seguintes condições experimentais: volume de amostra = $1000 \text{ } \mu\text{L}$; número de reversões = 3; vazão = $10 \text{ } \mu\text{L s}^{-1}$; tempo de deposição = 315 s; tempo de condicionamento = 100 s; frequência de onda quadrada = 100 Hz; amplitude do pulso de potencial = 40 mV; incremento de varredura de potencial = 6 mV.

Figura 13: Curvas analíticas obtidas a partir de medidas de corrente de pico dos voltamogramas da figura 12.

Tabela 5: Coeficientes angular, linear e de correlação obtidos a partir das curvas analíticas da Figura 13			
Íon	Coeficiente linear (μA)	Coeficiente angular (μA L mg ⁻¹)	R ²
Cu	0,9±0,6	351 ± 13	0,9938
Pb	1,1 ± 0,6	271 ± 12	0,9919
Cd	0,0 ± 0,2	168 ± 5	0,9965
Zn	0,3 ± 0,1	68 ± 3	0,9916

Os limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) de cada metal foram calculados pela multiplicação de 3 e 10 vezes o desvio padrão das correntes de pico de 10 voltamogramas correspondentes a concentração mais baixa estudada (0,0025 mg L⁻¹), dividido pelo coeficiente angular da curva analítica, e estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: LQ e LD do método				
	Cu	Pb	Cd	Zn
LD (mg L ⁻¹)	0,0013	0,0014	0,0006	0,0042
LQ (mg L ⁻¹)	0,0043	0,0046	0,0018	0,014

A faixa de concentração apresentou linearidade para os quatro metais, evidenciado pelo alto valor de R^2 . Entretanto não pode se considerar que a faixa linear começa no menor valor de concentração da curva, de 0,0025 mg L⁻¹, porque esse valor é menor do que o LQ dos metais, exceto para o Cd. Portanto conclui-se que para o Cd a faixa linear é de 0,0025 mg L⁻¹ a 0,1 mg L⁻¹ e para os outros metais a faixa linear começa nos seus respectivos LQ e vai até 0,1 mg L⁻¹.

4.3.5. Repetibilidade

A repetibilidade é um importante parâmetro a ser avaliado, pois mostra a precisão do método em análises seguidas, feitas em um mesmo laboratório, sob as mesmas condições (temperatura, umidade, pressão, reagentes, vidraria e condição de equipamento e operador). A repetibilidade foi avaliada com o cálculo do desvio padrão relativo das alturas de pico de 10 medidas voltamétricas em dois níveis de concentração: um nível baixo, de 0,0025 mg L⁻¹ dos metais e um nível alto, de 0,08 mg L⁻¹ dos metais. Para avaliar a repetibilidade do método em amostras de extrato de sedimento, que foram empregadas nessa dissertação, a amostra da primeira etapa da extração BCR também teve 10 medidas realizadas pelo método voltamétrico e o desvio padrão relativo das alturas de pico de corrente calculado. Os resultados dos desvios padrões relativos estão na tabela 7.

Tabela 7: Desvios padrões relativos de 10 medidas voltamétricas				
	Cu	Pb	Cd	Zn
0,0025 mg L ⁻¹ (%)	15	18,5	4,7	8,6
0,08 mg L ⁻¹ (%)	2	2	2,4	7
Extrato de sedimento (%)	6,5	6,95	8,82	5,61

4.4. Estudo de interferentes

Para o estudo de interferentes, mantendo o enfoque em amostras naturais, foi feito o estudo da interferência de algumas das substâncias mais comumente encontradas no meio ambiente sobre o sinal dos metais, caso estiverem presentes no momento da amostragem. Como referência foram consultadas as resoluções do CONAMA de 2012 para os padrões de qualidade da água doce, no caso em que ela é enquadrada como mais poluída de acordo com a resolução, ou seja, o caso em que os íons poderiam interferir com mais intensidade nas medidas. O tipo de água mais carregada de possíveis interferentes, desse modo, são as Águas Doces tipo III (que de acordo com o estabelecido no capítulo II da classificação dos corpos de águas da resolução do CONAMA nº 357 de 2005, seção I, são as águas que podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado, são adequadas para irrigação de culturas, para recreação de contato secundário e dessedentação de animais). Foram tomadas as concentrações máximas permitidas para as Águas Doces tipo III (no Capítulo III, Seção I e Art. 16 do Livro de resoluções do CONAMA 2012) para os cátions Al(III), Ca(II), Fe(III), Mn(II), Mg(II) e os ânions Cl⁻, PO₄³⁻, SiO₃²⁻ e preparados na presença de 0,05 mg L⁻¹ de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II), os metais estudados (um balão para cada possível interferente). O valor de corrente obtido foi comparado com os sinais das soluções dos metais sem os interferentes. Também foi avaliada a interferência de ácido húmico (AH) e ácido fúlvico (AF) como modelos de componentes da matéria orgânica natural (MON). Essas substâncias não são

citadas na resolução CONAMA, mas tiveram algumas concentrações avaliadas por causa de seu conhecido efeito de complexação de íons metálicos. As concentrações avaliadas e suas diferenças percentuais nas correntes de pico estão na Tabela 8.

Tabela 8: Estudo de íons interferentes					
Íon	Concentração (mg L ⁻¹)	Desvio em I _p (%)			
		Cu	Pb	Cd	Zn
Al(III)	0,2	-0,35	-0,7	-2,5	+3,6
Ca(II)	12,9	+2,1	+0,62	-4,3	+1,4
Fe(III)	5	-4,4	+9,4	+1,17	-20
Mn(II)	0,5	+0,35	+7,04	+9,1	+13
Mg(II)	7,9	-2,8	-8	-8	-5
Cl ⁻	250	-6,3	-16,3	-12,8	-10,2
PO ₄ ³⁻	0,15	+4,6	-6,5	-7,8	-9,9
SiO ₃ ²⁻	1	+3,7	-7,6	-8	-16,7

Os resultados mostram que de maneira geral os íons não interferiram muito na intensidade do sinal dos metais estudados, somente no caso do Zn na presença de Fe(III), Mn(II), PO₄³⁻ e SiO₃²⁻. A exceção é o cloreto, que afetou o sinal dos quatro metais. Como as soluções são preparadas em meio constante de cloreto, um acréscimo de 250 mg L⁻¹ deve alterar o equilíbrio no pseudo eletrodo de Ag, onde é formada a interface de Ag/AgCl, e a intensidade do sinal pode ter sido mudada por esse fator.

Substâncias húmicas sempre estão presentes em águas naturais e sua capacidade de interferir nos resultados do método foi estimada para diferentes concentrações tomando como base a distribuição de carbono orgânico dissolvido em águas de rios dos Estados Unidos (Malcolm, 1985). De acordo com o autor (Malcolm, 1985), a concentração média de substâncias húmicas dissolvidas em águas de superfície

visualmente incolores é de $4,4 \text{ mg L}^{-1}$, e sabendo-se que substâncias húmicas têm aproximadamente 50% da sua massa em carbono, o teor de carbono orgânico dissolvido (COD) de substâncias húmicas é em torno de $2,2 \text{ mg C L}^{-1}$. No presente trabalho, a concentração de COD testada mais próxima de $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ foi a concentração de ácidos húmicos e fúlvicos de 5 mg L^{-1} (Tabela 9). Nesse caso os maiores erros foram observados para o AF, com desvios de corrente de pico de até -16,7% (Pb) em relação ao valor de corrente obtido para a mesma concentração na ausência do potencial interferente.

Tabela 9: Estudo de interferência da MON					
Componente de MON	Concentração (mg L^{-1})	Desvio em Ip (%)			
		Cu	Pb	Cd	Zn
AF	5	-11,5	-16,7	-16	-4,7
	10	-9,7	-16	-12,8	-12,85
	20	-4,5	-13	-11,2	-33,2
	50	-0,6	-5,6	-3,4	-33,5
AH	5	-1,2	-5,7	-3,3	+7,3
	10	-9,2	-5,2	-7,4	-10,4
	20	-6,5	+6,9	+5,8	+39,4
	50	-9,2	+3,1	+16,5	+23,0

No caso de águas organicamente coloridas, como no Rio Negro no Brasil e no Rio Swanee nos Estados Unidos, a distribuição do COD é muito mais variável do que nas águas incolores. Para o rio Negro, Pérez e colaboradores (Pérez et al., 2011) encontraram concentrações de COD variando de 7 a 89 mg L^{-1} , dependendo do local de amostragem. O rio americano tem um teor médio de COD de 40 mg C L^{-1} , sendo 80% de substâncias húmicas, portanto uma concentração de substâncias húmicas próxima de 64 mg L^{-1} foi estimada (Malcolm, 1985). Das substâncias húmicas aquáticas, cerca de 90% são ácidos fúlvicos (Malcolm, 1985). A concentração mais próxima a 64 mg L^{-1} de COD testada no presente trabalho foi 50 mg L^{-1} de ácidos húmico e fúlvico, em que um

desvio de até 30% foi observado. Para baixas concentrações foi observado o efeito complexante dos ligantes, pois a presença deles diminui a intensidade do sinal (com exceção de Zn na presença de 5 mg L^{-1} de AH), mostrando que complexos inertes ou com difusão limitada são formados. Entretanto, o esperado seria que nas maiores concentrações de ligantes, maior seria a diminuição no sinal, pois maior quantidade do metal estaria complexada e menor quantidade chegaria ao eletrodo, mas vemos que para a maioria dos casos a intensidade do sinal é crescente com o aumento da concentração de ligante (exceto para o Zn) chegando em alguns casos a ser maior do que o sinal do metal sem os ligantes na mesma concentração (Pb, Cd na presença de AH). Uma possível explicação para isso é que durante a medida esses ligantes adsorvem sobre o eletrodo de trabalho, e como possuem propriedades tenso-ativas eles capturam os metais na solução, fazendo aparecer um efeito de pré-concentração dos metais pela acomodação dos mesmos mais próximos ao eletrodo, o que resulta num sinal maior. Esse efeito de pré-concentração sugere que o filme de celulose depositado sobre o eletrodo de trabalho não elimina completamente o efeito de adsorção de substâncias húmicas sobre o referido eletrodo.

Com isso é possível deduzir que a metodologia pode ser aplicada para determinação de metais em águas superficiais, desde que desvios de $\pm 30\%$ possam ser aceitos, chamando a atenção para o fato de que para Cu, Pb e Cd, os íons com maior problema de toxicidade, os desvios causados pela matéria orgânica natural não excederam 17%. Portanto, a metodologia proposta tem aplicabilidade na triagem de amostras, com potencial para realização de análises em campo, sem a necessidade de um tratamento de amostra elaborado.

4.4.1. Teste de acidulação da zona de mistura

Ao se retirar amostras da natureza, algumas podem estar contidas em meio complexante, dependendo da composição de ânions inorgânicos (Cl^- , CO_3^{2-} , PO_4^{3-}), condição de decomposição de matéria orgânica (substâncias húmicas, alginatos e outros polissacarídeos) ou presença de surfactantes. Os ligantes presentes nesses meios interagem com os íons metálicos. O abaixamento do pH provoca a protonação de ânions de ácidos fracos e sítios ionizáveis de substâncias húmicas e outros ligantes de ocorrência natural, diminuindo os valores das constantes de complexação condicionais com os íons metálicos (Feng et al., 2005). No procedimento de determinação dos metais em linha, a amostra é acidulada pela aspiração da solução transportadora de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ na etapa de diluição e da solução padrão estoque dos metais, o que coloca a amostra numa concentração de HCl de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$, por isso é necessário entender se essa acidulação é suficiente para destruir possíveis complexos que possam estar na amostra, no momento da coleta. Para estudar a acidulação em linha, foi preparada uma solução concentrada de metais e ácido húmico (AH) em meio aquoso, que após passar pela diluição em linha do procedimento formou uma zona de mistura com concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ dos metais, na presença de 10 mg L^{-1} de ácido húmico (e concentração de HCl de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$). A intensidade dos sinais obtidos pela análise dessa solução foi comparada com os sinais obtidos da análise de uma solução preparada diretamente nessas mesmas concentrações, mas em meio de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e de uma solução preparada na ausência de ácido húmico e em meio de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Com a comparação da intensidade dos sinais na presença de complexante obtidos nos diferentes meios é possível entender se a zona de mistura formada pelo procedimento padrão em que a amostra é diluída com ácido, pela adição de volumes de $100 \mu\text{L}$ de ST/padrão, gera uma concentração de íons hidrogênio suficiente para destruir possíveis

complexos naturais contidos na amostra na mesma extensão que a amostra preparada manualmente. Esse experimento permitiria avaliar se as análises poderiam ser feitas diretamente com a amostra, sem manipulação, ou se seria necessária uma etapa de acidulação prévia a análise. O resultado está apresentado na Figura 14.

Figura 14: Voltamogramas de soluções preparadas manualmente (verde) e em linha (azul) com concentração de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) na presença de 10 mg L^{-1} de AH e uma preparada manualmente na ausência de AH (vermelho), sob as seguintes condições: tempo de condicionamento de 100 s; volume da zona de mistura de $1000 \text{ }\mu\text{L}$; vazão de $10 \text{ }\mu\text{L s}^{-1}$; empregando-se 3 reversões de fluxo; tempo de deposição 315 s; frequência de pulsos de 100 Hz.

Pode-se notar que a os sinais obtidos pela análise da amostra preparada sem acidulação são significativamente menores do que os obtidos com a amostra preparada em meio de HCl (30% para o Cu, 35% para o Pb, 17% para o Cd e para o Zn não foi significativa), o que é um indicativo que o procedimento de acidulação não é suficiente para destruir os complexos, no caso de substâncias húmicas na concentração de 10 mg L⁻¹. A menor intensidade de sinal da amostra preparada em meio não acidulado é devido à formação de complexos inertes ou com coeficientes de difusão muito menores do que dos íons hidratados. Além disso, há uma semelhança do voltamograma da zona de mistura preparada manualmente em meio de HCl 0,10 mol L⁻¹ na presença e na ausência de ácido húmico, mostrando que nesse caso há uma destruição efetiva dos complexos. Esse teste (aliado com a necessidade de haver uma concentração constante de cloreto para manter o equilíbrio no eletrodo de pseudo referência de Ag) evidenciou a necessidade de preparar todas as amostras em meio de HCl 0,10 mol L⁻¹. Alternativamente, poder-se-ia usar uma solução de diluição acoplada à válvula rotatória (porta 6, Figura 2) com concentração maior do que 0,10 mol L⁻¹, de modo que essa concentração fosse atingida após os processos de diluição em linha.

4.5. Formação de intermetálico entre Zn e Cu

Ao se determinar simultaneamente Cu e Zn utilizando eletrodos de mercúrio na voltametria de redissolução anódica, uma limitação conhecida é formação de intermetálico entre os dois metais durante a etapa de deposição na fase de mercúrio. Esse intermetálico se oxida num potencial próximo ao do Cu na etapa de redissolução, e como resultado o pico do Cu aumenta e o pico de Zn diminui, se comparado aos picos obtidos de soluções contendo esses íons separadamente (Tysczuk, 2007). O problema é

mais evidente quando empregados eletrodos de filme de mercúrio do que em eletrodos de gota de mercúrio, devido a maior concentração de metal dissolvido em filmes de mercúrio (Bretta, 1997). Algumas estratégias podem ser utilizadas para eliminar a formação do intermetálico como a utilização de dois eletrodos (um para depositar Cu exaustivamente e outro para deposição de Zn, fazendo uma separação física dos elementos), a adição de um agente complexante com Cu, impedindo que o Cu se deposite e analisando somente o Zn, e a adição de um cátion de outro metal em solução, que reage preferencialmente com um dos metais deixando o outro livre. Isso é comumente feito com Ga(III) (potencial de deposição de 0,8 V) e forma um intermetálico mais estável com o Cu do que com o Zn (Brett, 1997). Com isso o sinal do Zn gerado na etapa de redissolução é livre de intermetálico, permitindo a determinação apropriada do metal na amostra. Se o interesse for a análise do Cu uma segunda etapa é realizada em que é aplicado um potencial menor, insuficiente para depositar o Zn, também garantindo o sinal do Cu livre de intermetálico. No presente trabalho foi utilizado o Ga(III) para reduzir a interferência de intermetálicos, mas ele não foi adicionado diretamente na amostra, pois foi utilizado o sistema SIA para aspirar a solução $4 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Ga(III) com o segmento que continha a amostra, padrões e ST, resultando numa zona de mistura de 1200 μL (200 μL de Ga(III) e 1000 μL da zona contendo amostra, padrões e ST). A solução de Ga(III) foi a última a ser aspirada para a bobina coletora, de modo que com a reversão do fluxo em direção, a zona contendo Ga(III) é a primeira a chegar à cela de fluxo, onde ocorre a redução a Ga^0 no eletrodo de trabalho e posterior formação de intermetálico com o cobre. Quando o objetivo foi determinar Cu, Pb e Cd não foi utilizado Ga(III) e a zona de mistura continha somente amostra, padrões e ST, tendo volume de 1000 μL . A formação do intermetálico depende da razão das concentrações de Zn e Cu na amalgama, sendo mais intensa com maiores

concentrações de Cu. Por isso é mais frequente em amostras de extratos de sedimento e de solos do que em amostras de água, que normalmente têm concentrações de Zn maiores que a de Cu (Gardiner, 1974).

A formação de intermetálico pode ser observada se for comparada uma série de adição de padrão em que foi utilizado o Ga(III) e o procedimento em duas etapas com uma série em que não foi utilizado o Ga(III) e os quatro metais foram determinados numa única etapa (Figuras 15 e 16). Os voltamogramas são de uma série de adição de uma amostra de extrato de sedimento (extrato de sedimento da primeira etapa do procedimento BCR) feita das duas maneiras. Pode se ver pela Figura 15 e pela curva de adição de padrão do Zn contida nela, que a determinação feita em uma etapa e sem utilização do Ga(III) resulta em pouca linearidade entre concentração adicionada de Zn e a intensidade de pico do mesmo ($R^2=0,7422$), o que impossibilita uma medição confiável para construir uma curva de adição de padrão para o metal. Isso ocorre provavelmente devido à formação do intermetálico entre Cu e Zn que foram depositados simultaneamente no eletrodo de mercúrio. O sinal do Cu, por também estar sofrendo essa interferência, não pode ser utilizado para a determinação do metal na amostra.

Figura 15: Voltamogramas de uma adição de padrão de uma amostra de extrato de sedimento sem a utilização do Ga(III) e determinação dos 4 metais estudados em uma etapa. Condições experimentais: volume do segmento = 1000 μL (600 μL de amostra e 400 μL de padrão/diluyente); número de reversões = 3; vazão = 10 $\mu\text{L s}^{-1}$; tempo de deposição = 315 s; tempo de condicionamento = 100 s; frequência de onda quadrada = 100 Hz; amplitude do pulso de potencial = 40 mV; incremento de varredura de potencial = 6 mV.

Na Figura 16 vemos os voltamogramas da análise em duas etapas, em que numa etapa foi depositado Ga(III) juntamente com a zona de amostra com o objetivo de determinar o Zn, e na outra etapa foi aplicado o potencial de -1V para deposição de Cu, Pb e Cd (insuficiente para depositar o Zn, garantindo a análise do Cu sem interferência

do intermetálico). Pode se notar que a utilização do Ga(III) possibilita a medição de correntes que fornecem uma curva de adição de padrão com maior linearidade ($R^2=0,9964$), o que se deve à diminuição da interferência do intermetálico formado para o Zn. Entretanto com a comparação dos voltamogramas não é possível afirmar que o pico do Cu aumenta e do Zn diminui pela formação do intermetálico assim como afirmou Tysczuk (2007). O efeito benéfico da deposição do Ga(III) na determinação do Zn em presença de Cu e o procedimento em duas etapas para determinação dos quatro metais tem sido descrito na literatura (Bretta, 1997; Tysczuk, 2007; Masini e da Silva, 2000). O emprego do SIA traz facilidade na inserção da zona de Ga(III) no segmento, permitindo uma rápida mudança do procedimento de determinação do Zn para a determinação do Pb, Cd e Cu e vice versa, sem reconfiguração mecânica (Masini e da Silva, 2000) e por isso foi oportuno na análise das amostras.

Figura 16: Voltamogramas de uma adição de padrão de uma amostra de extrato de sedimento com a utilização do Ga(III) e determinação dos quatro metais estudados em duas etapas. Condições experimentais: volume do segmento para o Cu, Pb e Cd = 1000 μ L (600 μ L de amostra e 400 μ L de padrão/diluyente); volume do segmento para o Zn= 1200 μ L (600 μ L de amostra, 400 μ L de padrão/diluyente e 200 μ L de solução de Ga(III)); número de reversões = 3; vazão = 10 μ L s⁻¹; tempo de deposição = 380 s (para o Zn) e 315 s (para Cu, Pb e Cd); tempo de condicionamento = 100 s; frequência de onda quadrada = 100 Hz; amplitude do pulso de potencial = 40 mV; incremento de varredura de potencial = 6 mV.

4.6. Aplicação da metodologia a amostras

A metodologia foi aplicada em amostras de água e sedimentos para a determinação de metais, tendo sua exatidão avaliada inicialmente com estudos de recuperação e posteriormente por comparação com valores certificados da amostra. As amostras foram analisadas em triplicata conforme o procedimento experimental descrito no item 3.4.1 e 3.4.2 e os dados foram tratados conforme o item 3.7 obtendo-se a concentração dos metais por adição de padrão. Um exemplo de voltamograma típico

dessas análises está apresentado na Figura 16 do item anterior (4.5), em que foi discutido formação do intermetálico.

4.6.1 Amostras de água

Foram analisadas amostras de água de torneira e água de nascente do Parque Jaraguá e também foi analisada água deionizada como branco analítico do método. Dessas a única que sofreu tratamento foi a do Parque Jaraguá, que passou por filtração em membrana de celulose com 0,45µm de diâmetro de poro. Os resultados obtidos após subtração do branco estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Concentrações obtidas com a aplicação da metodologia de determinação de metais nas amostras de água e no branco analítico				
Amostra	Concentração (mg L ⁻¹)			
	Cu	Pb	Cd	Zn
Branco	0,0032 ± 0,0008	0,0007 ± 0,0001	0,00050 ± 0,00025	0,0036 ± 0,0007
Água de torneira	0,028 ± 0,005	0,0060 ± 0,0013	0,0012 ± 0,0003	0,050 ± 0,024
Água do Jaraguá	0,010 ± 0,003	0,0002 ± 0,0002	0,005 ± 0,004	0,055 ± 0,028

Para avaliar a exatidão do método as amostras foram fortalecidas com 0,01 mg L⁻¹ de padrão dos metais e feito o ensaio de recuperação dessa quantidade também por adição de padrão. A quantidade esperada desse modo deve ser igual à quantidade obtida nas amostras considerando as concentrações de branco mais a quantidade incrementada. O resultado está apresentado na Tabela 11.

Tabela 11: Taxas de recuperação da concentração de 0,01 mg L ⁻¹ dos metais nas amostras de água e no branco analítico					
Amostra		Analito			
		Cu	Pb	Cd	Zn
Branco	C esperada (mg L ⁻¹)	0,0132	0,0107	0,0105	0,0136
	C obtida (mg L ⁻¹)	0,0143	0,00982	0,0106	0,014
	% Recuperação	109	91	101	103
Água de torneira	C esperada (mg L ⁻¹)	0,038	0,0160	0,0112	0,060
	C obtida (mg L ⁻¹)	0,045	0,0162	0,0112	0,068
	% Recuperação	119	102	100	114
Água do Jaraguá	C esperada (mg L ⁻¹)	0,020	0,0102	0,0150	0,065
	C obtida (mg L ⁻¹)	0,021	0,0097	0,0147	0,074
	% Recuperação	105	95	98	113

Os ensaios de recuperação mostraram que o sistema desenvolvido tem exatidão adequada para realizar as análises de água, sendo encontradas recuperações próximas a cem por cento, com desvio máximo próximo de 20%.

4.6.2 Amostra de sedimento certificado

A exatidão do método também foi avaliada pela análise da amostra de sedimento certificado CRM-701, fornecida pelo Programa de Testes, Medidas e Padrões da Comissão Europeia, que passou pela extração sequencial BCR descrita no item 3.6 em triplicata. Com a obtenção dos extratos dos sedimentos em cada uma das três etapas da extração foi aplicada a metodologia de determinação dos metais em cada réplica por adição de padrão. Transformando os dados de concentração de metais nos extratos para a concentração de metais na amostra sólida de sedimento (de acordo com o item 3.7.2) obteve-se valores de concentração em mg kg⁻¹ que foram comparados com os valores

certificados da amostra de sedimento. A seguir estão exemplos de voltamogramas de adições de padrão obtidos pela análise voltamétrica do extrato de cada etapa:

Figura 17: Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra da primeira etapa da extração do sedimento certificado. Condições experimentais: volume do segmento para o Cu, Pb e Cd = 1000 μ L (600 μ L de amostra e 400 μ L de padrão/diluyente); volume do segmento para o Zn= 1200 μ L (600 μ L de amostra, 400 μ L de padrão/diluyente e 200 μ L de solução de Ga(III); número de reversões = 3; vazão = 10 μ L s⁻¹; tempo de deposição = 380 s (para o Zn) e 315 s (para Cu, Pb e Cd); tempo de condicionamento = 100 s; frequência de onda quadrada = 100 Hz; amplitude do pulso de potencial = 40 mV; incremento de varredura de potencial = 6 mV.

Figura 18: Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra da segunda etapa da extração do sedimento certificado. As condições experimentais são as mesmas descritas na Figura 17.

Figura 19: Voltamogramas de adição de padrão de uma amostra da terceira etapa da extração do sedimento certificado. As condições experimentais são as mesmas descritas na Figura 17.

As soluções extratoras não são perfeitamente seletivas, por isso é mais correto apresentar os metais presentes como extraíveis nas determinadas soluções extratoras (o que define a extração sequencial como um fracionamento). Os resultados desse modo foram operacionalmente definidos pela natureza do extrator, ou seja, a primeira etapa da

extração, em que foi utilizado o ácido acético $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ como solução extratora definiu os metais extraíveis em meio ácido, a segunda etapa da extração em que foi utilizado cloridrato de hidroxilamina $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ como solução extratora forneceu os metais extraíveis em meio redutor e a terceira etapa, em que foi usado peróxido de hidrogênio $8,8 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de amônio 1 mol L^{-1} forneceu os metais extraíveis em meio oxidante (assim como descrito no item 3.6 em que está detalhado o procedimento e as soluções extratoras utilizados na extração sequencial). A média das triplicatas das concentrações obtidas e seus desvios estão apresentados a seguir juntamente com os valores certificados (Tabela 12):

Tabela 12: Comparação das concentrações de metais obtidas com as concentrações certificadas para a amostra CRM-701

Meio de Extração	Concentrações e Recuperações	Analito			
		Cu	Pb	Cd	Zn
Extraíveis em ácido acético	Certificada (mg kg^{-1})	$49,3 \pm 1,7$	$3,18 \pm 0,21$	$7,34 \pm 0,35$	205 ± 6
	Obtida (mg kg^{-1})	$51,1 \pm 8,7$	$3,2 \pm 1,3$	$7,22 \pm 0,76$	147 ± 13
	Recuperação (%)	103,6	100	98,3	71,7
Extraíveis em meio redutor	C certificada (mg kg^{-1})	124 ± 3	126 ± 3	$3,77 \pm 0,28$	114 ± 5
	C obtida (mg kg^{-1})	127 ± 32	137 ± 11	$4,1 \pm 1,1$	85 ± 15
	Recuperação (%)	102,4	108,7	109,8	74,7
Extraíveis em meio oxidante	C certificada (mg kg^{-1})	$55,2 \pm 4$	$9,3 \pm 2$	$0,27 \pm 0,06$	$45,7 \pm 4$
	C obtida (mg kg^{-1})	62 ± 14	$9,2 \pm 3,2^a$	$0,30 \pm 0,041^a$	48 ± 13
	Recuperação (%)	112,4	98,9	111	106,1

^a: Para obtenção dessas concentrações o extrato foi diluído 10 vezes. Os demais extratos foram diluídos 100 vezes.

Os resultados mostraram taxas de recuperação de 71,7 a 112,4%. Os resultados mais discrepantes, de 71,7 e 74,7 % são do Zn extraível em ácido acético e extraível em meio redutor, o que indica que a utilização do Ga(III) não foi totalmente eficiente para evitar a formação de intermetálico com o Cu nesses dois casos. O restante dos ensaios resultaram em taxas de recuperação de 98,9 a 112,4 % para o Cu, Pb e Cd. Ao se realizar a extração é importante pensar nos erros envolvidos. Os erros podem ser aleatórios ou sistemáticos. O protocolo de extração foi criado por laboratórios especializados para que outros laboratórios o utilizem e assim tenham parâmetros de comparação interlaboratorial. Por isso quando o procedimento é feito por laboratórios não especializados erros aleatórios e sistemáticos podem estar mais propensos a ocorrer já que não possuem a mesma técnica e a mesma instrumentação. Erros aleatórios aumentam o desvio padrão, pois os resultados experimentais podem estar dispersos em torno do valor real da amostra, resultando em um valor médio exato (elevada exatidão, mas baixa precisão). Como foram observados altos valores nas incertezas das concentrações, mas os valores médios ficaram próximos aos certificados, é possível que as extrações tenham sofrido com erros aleatórios. Considerando o estudo de repetibilidade em que foi apontado um desvio padrão relativo de baixa magnitude para a amostra de extrato de sedimento (de no máximo 10%) os altos desvios observados podem ser explicados mais por baixa reprodutibilidade da extração do que por uma eventual baixa repetibilidade das medidas voltamétricas. A determinação feita por adição de padrão também deve resultar em um desvio padrão maior em comparação com determinação por curva analítica, já que é feita por uma extrapolação.

Erros sistemáticos causam desvios sistemáticos positivos ou negativos do valor real da amostra mesmo quando erros aleatórios são pequenos. Erros sistemáticos, assim como os aleatórios, são indesejados, pois afetam sistematicamente a exatidão em todos

os resultados, mas, se identificados, podem ser corrigidos. Para auxiliar na avaliação da exatidão do método SIA-ASV foi feito o teste-t de Student de significância para comparar as médias de concentrações certificadas e obtidas pelo método proposto. Inicialmente avaliou-se através do teste F se os desvios padrões do método usado e o do valor certificado diferiam significativamente, considerando 2 graus de liberdade no caso do método usado na presente dissertação e de 12 a 15 graus de liberdade no caso dos valores certificados (two –tailed test). Os valores de F críticos para essas condições e 95% de confiança variam entre 39,41 e 39,43 (Miller e Miller, 1998). Apenas para Cu em meio redutor o valor de F obtido (114) superou o valor de F crítico, de modo que o teste t de significância foi aplicado aos resultados da Tabela 12.

O teste t pode dizer se os valores certificados e obtidos podem ser considerados hipoteticamente da mesma amostra (mesma média considerando os desvios), o que implicaria em aceitar que a extração e a etapa de medição foram eficientes já que equivaleriam ao procedimento certificado e à determinação dos laboratórios que a certificaram. Se houver diferença estatística significativa calculada pelo teste t, considerando os graus de liberdade do método certificado e o método proposto, dificilmente essa hipótese poderia ser aceita. Para isso é assumida uma hipótese nula em que os resultados obtidos pelos dois métodos não têm diferença significativa. A hipótese nula é aceita se o t experimental for menor que o t crítico, sugerindo que não há evidência estatística entre os resultados. O cálculo de t é feito pela seguinte equação:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

em que s (desvio padrão) é igual a:

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{GL}}$$

e n_1 e n_2 são o número de replicatas das análises (realizada e certificada), $\bar{x}_1$ e $\bar{x}_2$ médios são os valores obtidos e certificados, respectivamente, e os seus desvios padrões são s_1 e s_2 (obtido e certificado). GL é o número de graus de liberdade, igual a n_1+n_2-2 .

Os experimentos foram realizados em triplicata para a determinação pelo método proposto, portanto $n_1=3$. Na certificação da amostra CRM-701 o número de dados experimentais varia, pois alguns resultados na certificação foram eliminados se houvesse algum erro aparente ou se apresentassem um desvio padrão alto. No artigo que descreve a certificação (Pueyo et al., 2001) é dado o número de repetições de amostras para cada elemento (n_2), que aqui será apresentado na Tabela 13 juntamente com o valor de t calculado e o valor de t crítico, para cada grau de liberdade no nível de confiança de 95% ($P=0,05$).

Tabela 13: Valores de n_1 , n_2 e valores de t crítico e calculado para o nível de confiança de 95% ($P=0,05$)

Meio de Extração		Analito			
		Cu	Pb	Cd	Zn
Extraíveis em ácido acético	n_1	3	3	3	3
	n_2	14	14	14	14
	GL	15	15	15	15
	t crítico ($P=0,05$)	2,1315	2,1315	2,1315	2,1315
	t calculado	0,79715	0,061234	0,4407	12,4367
Extraíveis em meio redutor	n_1	3	3	3	3
	n_2	14	11	14	12
	GL	15	12	15	13
	t crítico ($P=0,05$)	2,1315	2,1788	2,1315	2,1603
	t calculado	0,3925	3,5342	0,12887	6,2434
Extraíveis em meio oxidante	n_1	3	3	3	3
	n_2	13	12	13	11
	GL	14	13	14	12
	t crítico ($P=0,05$)	2,1447	2,1603	2, 1315	2,1788
	t calculado	1,654	0,0695	0,8121	0,5481

Os valores de t calculados foram em sua maioria menores do que o t crítico, o que sugere que estatisticamente os resultados obtidos com as amostras analisadas não diferem das certificadas. Diferenças estatisticamente significativas foram apontadas somente em três casos, em que os valores de t resultaram num valor maior que o t crítico, que foram para o Zn extraível em ácido acético e em meio redutor e o Pb em meio redutor (que estão em vermelho na Tabela 13). Entretanto, avaliando criticamente o método, de 12 resultados obtidos somente 3 indicaram diferença estatística, sendo que 2 deles são do Zn que têm a explicação de provavelmente não ter sido possível contornar a formação do intermetálico. Portanto, somente um resultado aponta problemas na exatidão do método que é o Pb em meio redutor, mas é muito pouco provável que o método apresente esse tipo de problema se para o mesmo elemento nas outras etapas da extração não foi apontada diferença estatisticamente significativa.

5. Conclusões

O método desenvolvido para determinações de Cu(II), Pb(II), Cd(II) e Zn(II) por voltametria de redissolução anódica assistida por análise de injeção sequencial pode ser classificado como adequado para triagens de amostras ambientais pelos seguintes motivos: os limites de quantificação são da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$, podendo ser aumentados ou diminuídos apenas manipulando-se parâmetros como vazão e número de reversões de fluxo. Tais parâmetros são alterados de modo simples, a partir do teclado do computador, alterando-se o software de controle do sistema SIA e do tempo de deposição no potenciostato. Os limites de detecção e quantificação foram comparáveis à técnicas de espectrometria atômica com detecção óptica, cujos custos instrumentais e de manutenção são significativamente maiores; o método apresentou repetibilidade adequada para análise em níveis de traço; o teste de recuperação em amostras de água

de torneira não resultou em desvios significativos; segundo o teste t de Student as diferenças entre os valores certificados e os valores obtidos são em sua maioria estatisticamente não significativas.

As interferências de substâncias possivelmente encontradas no meio ambiente se mostraram de pequena magnitude para interferentes aniônicos e catiônicos. A presença de componentes da matéria orgânica natural como ácidos húmico e fúlvico provocou alterações irregulares nos sinais dos analitos, indicando que o eletrodo de trabalho é suscetível à interferência de ligantes heterogêneos de ocorrência natural. Isso implica que o método é melhor aplicado em amostras de águas superficiais incolores, e que águas organicamente coloridas são melhor analisadas após fazer um tratamento de amostra mais elaborado como a destruição das substâncias orgânicas.

6. Propostas futuras

Devido à alta portabilidade dos componentes (potenciostato, sistema de injeção sequencial e computadores portáteis modernos, alimentados por bateria, sensores impressos, cela de fluxo e qualquer recipiente que contenha solução transportadora) uma etapa futura desse trabalho seria a avaliação da aplicabilidade da metodologia para determinação dos metais em amostras de águas em trabalhos de campo, minimizando possíveis erros que podem ocorrer nos processos de amostragem, condicionamento, transporte e estocagem das amostras.

7. Referências Bibliográficas

- Angnes, L., Nascimento, V. (1998) Eletrodos fabricados por “Silk-Screen”. *Quimica Nova* 21(5), 614-629.
- Alloway, B.J. (1990) The origin of heavy metals in soils. In: Alloway, B.J. (Ed) *Heavy metals in soils* 29-39
- Bradl, H.B. (2004) Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents *Journal of Colloid and Interface Science* 277, 1-18
- Brett, M. A., Garcia, M. B. Q., Lima, J. L. F. C. (1997) On the suppression of zinc-copper interactions in square wave anodic stripping voltammetry in flowing solution by addition of gallium ions. *Analytica Chimica Acta* 339, 167–172.
- Cavallaro, N., McBride, M.B. (1980) Activities of Cu and Cd in soil solution as effected by pH. *Soil Science Society of America Journal* 44, 729-732
- Caruso, J.A., Klaue, B., Michalke, B., Rocked, D.M. (2003) Group assessment: elemental speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 32–44
- Chen, C., Niu, X., Chai, Y., Zhao, H., Lan, M. (2013) Bismuth-based porous screen-printed carbon electrode with enhanced sensitivity for trace heavy metal detection by stripping voltammetry. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 178, 339–342
- Chuanuwatanakul, S., Dungchai, W., Chailapakul, O., Motomizu, S. (2008) Determination of trace heavy metals by sequential injection-anodic stripping voltammetry using bismuth film screen-printed printed carbon electrode. *Analytical sciences : the International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 24(5), 589–94
- da Silva, C. L., Masini, J. C. (2000) Determination of Cu, Pb, Cd, and Zn in river sediment extracts by sequential injection anodic stripping voltammetry with thin mercury film electrode. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 367(3), 284–90
- Davies, J.A., Leckie, J. O. (1978) Effect of absorbed complexing ligands on trace metal uptake by hydrous oxides *Environmmetal Science Technology* 12, 1309-1315
- dos Santos, A. C. V., Masini, J.C. (2010) Análise por injeção sequencial (SIA): Vinte anos em uma perspectiva brasileira. *Química Nova*, 33(9), 1949–1956
- dos Santos, A. C. V.; Masini, J. C. (2006) Development of a sequential injection anodic stripping voltammetry (SI-ASV) method for determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in wastewater samples from coatings industry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*., 385, 1538

- Elliot, H.A., Dennemy, C. M. (1982) Soil adsorption of cadmium from solutions containing organic ligands *Journal of Environmental Quality*, 11, 658-663
- Fergusson, J.E. (1991) The heavy elements: chemistry, environmental impact, and health effects. Great Britain: Pergamon Press,
- Fernbach, S. K., Tucker, G. F. (1986) Coin ingestion: unusual appearance of the penny in a child. *Radiology*, 158, 512
- Gardiner J., Stiff, M. J. (1974). The determination of Cadmium, Lead, Copper and Zinc in ground water, estuarine water, sewage and sewage effluent by anodic stripping voltammetry. *Water Research*, 9, 517–523
- Gubeli, T., Christian, G. D., Ruzicka, J. (1991). Fundamentals of sinusoidal flow sequential injection spectrophotometry. *Anal. Chem.*, 63, 2407-2413
- Gupta, M., Cuypers, A., Vangrosveld, J., Clijsters, H. (1999) Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol.Plant.*106 262-267
- Idris A.M. (2010) An Overview of the Generations and Recent Versions of Flow Injection Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 40 (3) 150-158
- Injang, U., Noyrod, P., Siangproh, W., Dungchai, W., Motomizu, S., Chailapakul, O. (2010) Determination of trace heavy metals in herbs by sequential injection analysis-anodic stripping voltammetry using screen-printed carbon nanotubes electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 668(1), 54–60
- Ivaska, A., Kubiak, W. W. (1997) Application of sequential injection analysis to anodic stripping voltammetry. *Talanta* 44 713-723
- Ivaska, A., Kubiak, W.W. (1997) Application of sequential injection analysis to anodic stripping voltammetry. *Talanta*, 44, 713–723
- Keawkim, K., Chuanuwatanakul, S., Chailapakul, O., Motomizu, S. (2013) Determination of lead and cadmium in rice samples by sequential injection/anodic stripping voltammetry using a bismuth film/crown ether/Nafion modified screen-printed carbon electrode. *Food Control*, 31(1), 14–21
- Kokkinos, C., Economou, A. (2011) Disposable Nafion-modified micro-fabricated bismuth-film sensors for voltammetric stripping analysis of trace metals in the presence of surfactants. *Talanta*, 84(3), 696–701
- Lenahan C.E., Barnett N.W., Lewis S.W. (2002) Sequential injection analysis. *The Analyst* , 127 (8), 997-1020
- Lima V. F.; Merçon F. (2011) Metais pesados no ensino de química *Química Nova na Escola*, 33, 199-205

- Masini, J.C. (2008) Demonstrando os fundamentos, potencialidades e limitações da Análise por Injeção Sequencial *Quimica Nova*, 31(3), 704–708.
- Mattiazzo, M.E., Andrade, C.A. (2000) Aplicabilidade do bio sólido em plantações florestais: lixiviação de N orgânico e toxicidade de metais pesados In: Wagner Berttiol, W., Camargo, O. A. (Ed.). *Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 203-213
- Mattiazzo, M.E., Berton, R.S., Cruz, M.C.P. (2001) Disponibilidade e avaliação de metais pesados potencialmente tóxicos. In: FERREIRA, M.E. (Ed.). *Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura*. Jaboticabal: CNPq; FAPESP; POTAFOS, cap. 9, p. 213-234
- McBride, M.B. (1989) Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science* 10, 1-56
- Mesquita R.B.R., Rangel A. (2009) A review on sequential injection methods for water analysis. *Analytica Chimica Acta*, 648 (1), 7-22.
- Metters, J. P., Kadara, R. O., Banks, C. E. (2011) New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. *The Analyst*, 136(6), 1067–1076
- Miller, J. N., Miller, J. C. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th Ed Ellis Horwood Ltd, 2010
- Nriagu, B.O., Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 12, 134–139
- Ninwong, B., Chuanuwatanakul, S., Chailapakul, O., Dungchai, W., Motomizu, S. (2012) On-line preconcentration and determination of lead and cadmium by sequential injection/anodic stripping voltammetry. *Talanta*, 96, 75–81
- Palchetti, I., Laschi, S., Mascini, M. (2005). Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals. *Analytica Chimica Acta*, 530(1), 61–67
- Pasquini, C., de Oliveira, W. A. (1985) Monosegmented system for continuous flow analysis. Spectrophotometric determination of chromium(VI), ammonia, and phosphorous *Analytical Chemistry* 1985, 57, 2575-2579
- Pérez, M.A.P., Moreira-Turcq, P., Gallard, H., Allard, T., Benedetti, M. F. (2011) *Chemical Geology* 586, 158-168
- Perez-Olmos, R., Soto, J.C., Zarate, N., Araujo, A.N., Montenegro M. (2005) Sequential injection analysis using electrochemical detection: A review. *Analytica Chimica Acta*, 554 (1-2), 1-16
- Quevauviller, Ph., Rauret, G., Lopez-Sanchez, J.F., Rubio, R., Ure, A., Muntau, H. (1997) The Certification of the EDTA-Extractable Contents (Mass Fractions) of

Cd, Cr, Ni, Pb and Zn in Sediment Following a Three-Step Sequential Extraction Procedure, CRM 601, European Commission, EUR 17554 EN, Brussels, Belgium, 1997.

Pickering W.F. (1986), Metal ion speciation — soils and sediments (a review). *Ore Geology Reviews*, 1, 83-146

Pierzynski, G.M., Sims, J. T., Vance, G.F. (1994) Relation of Trace Metals to Human Health Effects *Soil and environmental quality* 313

Pueyo, M., Rauret, G., Lück, D., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, P., López-Sánchez, J. F. (2001). Certification of the extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a freshwater sediment following a collaboratively tested and optimised three-step sequential extraction procedure. *Journal of Environmental Monitoring*, 3(2), 243–250

Punrat, E., Chuanuwatanakul, S., Kaneta, T., Motomizu, S., & Chailapakul, O. (2013). Method development for the determination of arsenic by sequential injection/anodic stripping voltammetry using long-lasting gold-modified screen-printed carbon electrode. *Talanta*, 116, 1018-1025

Ratuzny, T., Gong Z., Wilke. B-M. (2009) Total concentrations and speciation of heavy metals in soils of the Shenyang Zhangshi Irrigation Area, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 156(1–4), 171–180

Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Luck, D., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, Ph. (2001) The Certification of the Extractable Contents (Mass Fractions) of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in Freshwater Sediment Following a Sequential Extraction Procedure, BCR-701, European Commission, EUR 19775 EN, Luxembourg, Belgium, (2001).

Rauret, G., López-Sánchez, J. F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C., Ure, A., & Quevauviller, P. (1999) Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring*. 1(1), 57–61

Reis, B. F. (1995) Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento. *Quimica Nova*, 19, 51-58

Ruzicka, J., Elo, H. (1989) Flow Injection Analysis, 2nd Ed John Wiley& Sons, New York, p.69

Ruzicka, J., Marshall, G.D. (1990) Sequential injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, 237, 329-343

Sahuquillo, A., Lopez-Sanchez, J.F., Rubio R., Rauret, G., Thomas, R.P.,Davidson, C.M., Ure, A. (1999) Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* 382 317-327

- Sastre, I., Vicente, M.A., Lobo, M.C. (2001) Behaviour of cadmium and nickel in a soil amended with sewage sludge. *Land degradation and Development*, 12, 27-33
- Scheidegger, A.M., Sparks, D.L. (1996) A critical assessment of sorption-desorption mechanisms at the soil mineral/water interface *Soil Science*, 161, 813-831
- Schroeder, H. A., Darrow, D. K. (1973) Relation of Trace Metals to Human Health Effects *Chemical Analysis of the Environment and Other modern Techniques: Progress in Analytical Chemistry*, 5, 81-104
- Sahuquillo, A., Lopez-Sanchez, J.F., Rauret, G., Ure, A.M., Muntau, H. (2002) Sequential extraction procedures for sediment analysis, Methodologies in Soil and Sediment Fractionation Studies: Single and Sequential Extraction Procedures, Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Shan, X., Chen, B. (1993) Evaluation of sequential extraction for speciation of trace metals in model soil containing natural minerals and humic acid. *Analytical Chemistry*. 65(6), 802–807
- Silva, M. S. P., Masini, J. C. (2002) Exploiting monosegmented flow analysis to perform in-line standard additions using a single stock standard solution in spectrophotometric sequential injection procedures. *Analytica Chimica Acta*, 466(2), 345–352
- Siriangkhwut, W., Pencharee, S., Grudpan, K., Jakmunee, J. (2009) Sequential injection monosegmented flow voltammetric determination of cadmium and lead using a bismuth film working electrode. *Talanta*, 79(4), 1118–24
- Siriangkhwut, W., Grudpan, K., & Jakmunee, J. (2011) Sequential injection anodic stripping voltammetry with monosegmented flow and in-line UV digestion for determination of Zn(II), Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in water samples. *Talanta*, 84(5), 1366–73
- Sparks, D.L., (1995) *Environmental Soil Chemistry* 267
- Sutherland, R. (2010). BCR®-701: a review of 10-years of sequential extraction analyses. *Analytica Chimica Acta*, 680(1-2), 10–20
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L., Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Lobinski, R., (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1453–1470
- Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry*, 51, 844-851
- Thompson, M., Ellison, S.R., Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis, *Pure and Applied Chemistry*, 74, 835-855

- Tu, Q., Shan, X-Q., Qian, J., Ni, Z-M. (1994) Trace metal redistribution during extraction of model soils by acetic acid/sodium acetate. *Analytical Chemistry*, 66(21), 3562–3568
- Tyszczuk, K., Korolczuk, M., Grabarczyk, M. (2007) Application of gallium film electrode for elimination of copper interference in anodic stripping voltammetry of zinc. *Talanta*, 71, 2098–2101
- Ure, A., Quevauviller Ph., Muntau, H., Griepink, B. (1993) Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 51, 135–151
- Ure, A. (1996) Single extraction schemes for soil analysis and related applications. *Science of The Total Environment*, 178 (1-3), 3–10
- Vieira, J. A., Raimundo, I. M., Reis, B. F., & Zagatto, E. A. G. (1998) Sampling strategies in sequential injection analysis : Exploiting the monosegmented approach, *Analytica Chimica Acta*, 366, 257–262.
- Wang, J. (1982) Anodic stripping voltammetry as an analytical tool. *Environmental Science & Technology*, 16(2), A104 – A109
- Zimmerman, A. J., Weindorf, D. C. (2010) Heavy metal and trace metal analysis in soil by sequential extraction: a review of procedures. *International Journal of Analytical Chemistry*, Article ID 387803, doi:10.1155/2010/387803