

Trabalho de Formatura

Curso de Graduação em ENGENHARIA AMBIENTAL

**DETERMINAÇÃO DE Cd, Cu, Ni, Pb E Zn EM ÁGUAS MARINHAS ORIUNDAS DA
BACIA POTIGUAR UTILIZANDO A TÉCNICA DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS
POR GRADIENTES DE CONCENTRAÇÃO (DGT)**

Guilherme Favoreto Pescim

Rio Claro (SP)

2011

GUILHERME FAVORETO PESCIM

**DETERMINAÇÃO DE Cd, Cu, Ni, Pb E Zn EM ÁGUAS
MARINHAS ORIUNDAS DA BACIA POTIGUAR
UTILIZANDO A TÉCNICA DE DIFUSÃO EM FILMES
FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT)**

*Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio
Claro (SP), da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de Engenheiro Ambiental.*

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

Rio Claro (SP)
2011

543.31 Pescim, Guilherme Favoreto
M473d Determinação de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em águas marinhas
oriundas da Bacia Potiguar utilizando a técnica de difusão em
filmes finos por gradiente de concentração (DGT) /
Guilherme Favoreto Pescim. - Rio Claro : [s.n.], 2011
51 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Engenharia
Ambiental) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Geociências e Ciências Exatas

Orientador: Prof. Dr. Amauri Antonio Menegário

1. Água – Composição. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3.
Difusão. 4. Lei de fick. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

GUILHERME FAVORETO PESCIM

DETERMINAÇÃO DE Cd, Cu, Ni, Pb E Zn EM ÁGUAS MARINHAS
ORIUNDAS DA BACIA POTIGUAR UTILIZANDO A TÉCNICA DE
DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE
CONCENTRAÇÃO (DGT)

*Trabalho de Formatura apresentado ao Instituto
de Geociências e Ciências Exatas, Campus de Rio
Claro (SP), da Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho, para obtenção do grau
de Engenheiro Ambiental.*

Comissão Examinadora
Prof. Dr Amauri Antonio Menegário
Prof. Dr Roberto Domingos Naves
Dr. Carlos Alfredo Suárez

Rio Claro, 21 de novembro de 2011.

assinatura do(a) aluno(a)

assinatura do(a) orientador(a)

Resumo

A técnica DGT tem sido utilizada para determinação e melhor compreensão da dinâmica e biodisponibilidade de metais em águas marinhas sujeitas a emissários.

Neste trabalho, a DGT foi avaliada para a determinação de Pb, Cd, Cu, Zn e Ni em amostras de água marinhas da Bacia Potiguar na sua vertente convencional (agente ligante: Chelex-100 e agente difusivo: Gel de Poliacrilamida Difusivo (D) e Restritivo (R)) e determinação de Pb e Cd através de sua vertente alternativa (agente ligante: *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em géis de agarose e agente difusivo: Papel Cromatográfico 3MM). As curvas de imersão para longos períodos na amostra apresentaram boa correlação linear na vertente convencional para Zn (D: $R^2=0,9586$; R: $R^2=0,9444$), Ni (D: $R^2=0,9789$; R: $R^2=0,9286$) e Cu (D: $R^2=0,764$; R: $R^2=0,8143$), e alternativa para Pb ($R^2=0.9228$) e Cd ($R^2=0.9673$).

Os resultados da análise da composição orgânica e inorgânica na vertente convencional, demonstraram que para todos os elementos não há fração significativa de compostos orgânicos na amostra. Além disso, para vertente alternativa, a comparação das massas obtidas e esperadas sugerem que parte do Pb não encontra-se lábil e que o principal mecanismo de sua retenção pela *S. Cerevisiae* ocorre através de troca iônica.

Palavras-Chave: DGT. *Saccharomyces cerevisiae*. Águas marinhas, Difusão. Lei de Fick.

Abstract

The DGT technique has been used to determine and better understand the dynamics and bioavailability of metals in the sea near to marine outfalls.

In this work, the DGT was assessed for the determination of Cd, Pb, Cu, Zn and Ni in marine water samples from Potiguar Basin in its conventional aspect (binding agent, Chelex-100 and diffusive agent: Diffusive polyacrylamide gel (D) and restrictive (R)) and determination of Pb and Cd through its alternative aspect (binding agent: *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gels and diffusive agent: 3MM Chromatography Paper). The deployment curves for long periods of immersion in the sample, showed a good linear correlation for the conventional aspect to Zn (D: $R^2=0.9586$, R: $R^2=0.9444$), Ni (D: $R^2=0.9789$, R: $R^2=0.9286$) and Cu (D: $R^2=0.764$, R: $R^2=0.8143$), and alternative to Pb ($R^2=0.9228$) and Cd ($R^2=0.9673$).

The results of the organic and inorganic composition analysis in conventional aspect, showed that for every element there is no significant fraction of organic compounds in the sample. In addition, considering the alternative aspect, the comparison of obtained and expected masses suggests that some of the Pb is not labile and that the main retention mechanism of Pb for *S. Cerevisiae* occurs through ion exchange.

Keywords: DGT. *Saccharomyces cerevisiae*. Marine waters. Diffusion. Fick's Law.

Agradecimentos

Agradeço a oportunidade de aprendizado para minha formação e para a vida à todas as pessoas e amigos do Centro de Estudos Ambientais (CEA) e da UNESP de Rio Claro.

Muito Obrigado a todos vocês!

*Dedico este trabalho aos meus pais Antonio Edison
Pescim e Neusa Maria Favoreto Pescim, os quais me
deram força e sempre me apoiaram durante toda a minha
vida.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquematização da técnica DGT	14
Figura 2 - Dispositivo da técnica DGT.....	15
Figura 3 - Curva de imersão de Cd para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	28
Figura 4 - Curva de imersão de Pb para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	29
Figura 5 - Curva de imersão de Zn para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	29
Figura 6 - Curva de imersão de Cu para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	30
Figura 7 - Curva de imersão de Ni para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	30
Figura 8 - Curva de imersão de Cd para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	31
Figura 9 - Curva de imersão de Pb para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	31
Figura 10 - Curva de imersão de Zn para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	32
Figura 11 - Curva de imersão de Cu para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.....	32

Figura 12 - Curva de imersão de Ni para agente restritivo (períodos longos).	
Temperatura=23°C.....	33
Figura 13 - Curva de imersão de Cd para agente difusivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	34
Figura 14 - Curva de imersão de Pb para agente difusivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	34
Figura 15 - Curva de imersão de Zn para agente difusivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	35
Figura 16 - Curva de imersão de Cu para agente difusivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	35
Figura 17 - Curva de imersão de Ni para agente difusivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	36
Figura 18 - Curva de imersão de Cd para agente restritivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	36
Figura 19 - Curva de imersão de Pb para agente restritivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	37
Figura 20 - Curva de imersão de Zn para agente restritivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	37
Figura 21 - Curva de imersão de Cu para agente restritivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	38
Figura 22 - Curva de imersão de Ni para agente restritivo (períodos curtos).	
Temperatura=23°C.....	38

Figura 23 - Curva de imersão contendo a massa total de Pb (esperada), massa obtida de Pb e massa de $PbCl^+$ função do tempo de imersão para água do mar contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb (pH = 7,66). Os amostradores foram montados utilizando-se 2 discos de Papel Cromatográfico 3MM (0,92 mm) e discos contendo 20% (m / v) de *S. cerevisiae* e 3% (m/v) de agarose. Temperatura=23°C.....40

Figura 24 - Curva de imersão contendo a massa total (esperada) e obtida de Cd função do tempo de imersão para água do mar contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd (pH = 7,66). Os amostradores foram montados utilizando-se 2 discos de Papel Cromatográfico 3MM (0,92 mm) e discos contendo 20% (m / v) de *S. cerevisiae* e 3% (m/v) de agarose. Temperatura=23°C.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de eluição dos analitos (f_e) nos agentes difusivo e restritivo.....	25
Tabela 2 - Coeficientes de difusão dos analitos D ($10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, 23°C) nos agentes difusivo e restritivo.....	26
Tabela 3 - Coeficientes de difusão (D) de Pb e Cd no Papel Cromatográfico 3MM.....	26
Tabela 4 - Concentrações de Cd em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT.....	42
Tabela 5 - Concentrações de Pb em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT... ..	43
Tabela 6 - Concentrações de Zn em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT.....	43
Tabela 7 - Concentrações de Cu em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT.....	44
Tabela 8 - Concentrações de Ni em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT.....	44
Tabela 9 - Comparação entre as concentrações totais dos analitos na amostra e as obtidas com o DGT.....	46

SUMÁRIO

1–INTRODUÇÃO.....	13
2–OBJETIVOS.....	17
3–REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4–MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 – Materiais.....	22
4.1.1 – Equipamentos e acessórios.....	22
4.1.2 – Reagentes e soluções.....	22
4.1.3 – Amostra.....	23
4.2 – Métodos.....	23
4.2.1 – Princípios da técnica DGT.....	23
4.2.2 – Procedimento de montagem e experimentos de imersão dos dispositivos.....	24
4.2.3 – Procedimento para recuperação e determinação das massas dos analitos retidas no agente ligante.....	25
4.2.4 – Cálculo das massas retidas (obtidas e esperadas) nos dispositivos.....	26
4.2.5 – Determinação da Concentração total dos analitos na amostra	27
4.2.6 – Preparo do gel ligante de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> imobilizada em agarose.....	27

5–RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 – Curvas de imersão de Cd, Pb, Zn, Cu e Ni para o agente ligante convencional.....	28
5.2 – Curvas de imersão de Pb e Cd para o agente ligante alternativo.....	39
5.3 – Comparação entre concentrações de Cd, Pb, Zn, Cu e Ni obtidas com gel difusivo e restritivo na amostra de água de mar.....	42
5.4 – Comparação entre concentrações de Cd, Pb, Zn, Cu e Ni obtidas para a técnica DGT utilizando e através da determinação da concentração total.....	46
 6–CONCLUSÕES.....	 48
 7–REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 49

1. INTRODUÇÃO

O meio ambiente marinho pode ser contaminado por uma ampla gama de atividades antrópicas. As áreas costeiras são afetadas diretamente pela inserção de diversos tipos de poluentes trazidos pelos emissários de efluentes marinhos que, conjuntamente com o transporte marítimo e exploração de recursos minerais da plataforma continental representam de 20 a 30 % da carga de poluentes inseridas nos oceanos por atividades antrópicas (SHERWOOD et al., 2009).

Dentre os principais contaminantes gerados por emissários marinhos encontram-se: nutrientes, compostos orgânicos sintéticos, sedimentos, petróleo, hidrocarbonetos e metais.

A determinação da concentração total de metais e metalóides em águas naturais marinhas se mostra muito importante, possibilitando a obtenção de conhecimento de base para a tomada de decisões para o controle da poluição e monitoramento ambiental das regiões costeiras. No entanto, apesar de importantes, determinações elementares não fornecem todas as informações necessárias para tomar decisões apropriadas ou, em algumas situações, conduzem a interpretações errôneas. Em frente a diversos problemas ambientais que o mundo moderno tem enfrentado, é preciso o desenvolvimento de novas técnicas para a determinação de espécies químicas principais resultantes da poluição.

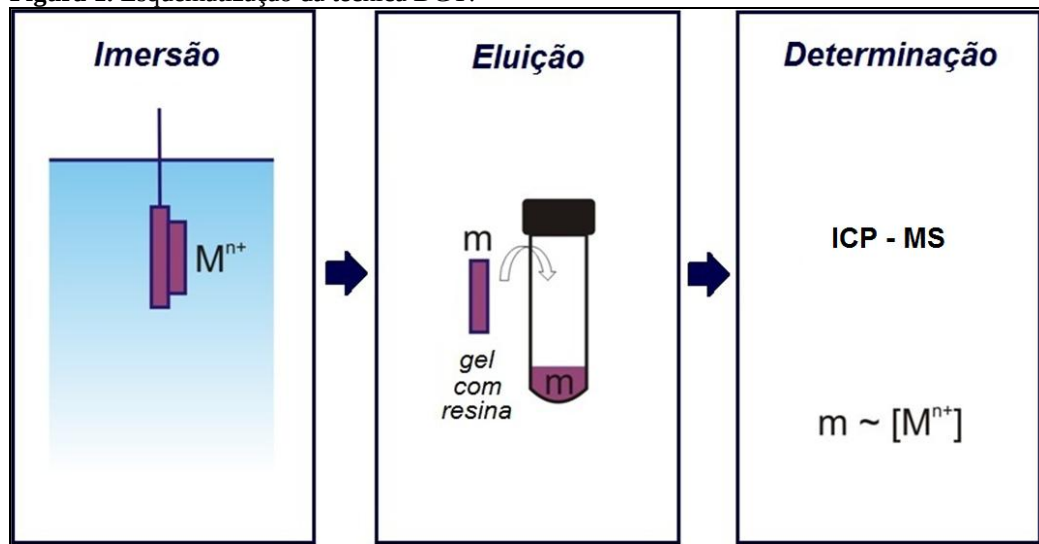
A técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) tem sido utilizada para a determinação de metais em águas marinhas tanto para análise de sua composição, como para a avaliação de poluição em determinadas áreas sujeitas a emissários ou atividades potencialmente poluidoras.

A técnica DGT foi desenvolvida por Zhang e Davison (1995), e tem se mostrado promissora na determinação de espécies lábeis *in situ* em meios aquáticos, solos ou sedimentos. Por ser uma técnica capaz de pré-concentração, a DGT permite a determinação desta fração em quantidades traços ou ultra-traços, dependendo da técnica de determinação em que foi associada. Quando associada a técnicas analíticas como a espectrometria de emissão óptica (OES) ou de massas (MS) com plasma acoplado indutivamente (ICP), também permite determinações multielementares.

Outra vantagem da DGT é que a técnica fornece a concentração média por tempo e não apenas a concentração da espécie de interesse no momento da coleta (ZHANG e DAVISON, 1995).

Nesta técnica, um dispositivo é imerso em sistema a ser monitorado (por exemplo, no mar ou em um rio) durante um intervalo de tempo definido. A quantidade dos íons acumulados é recuperada do dispositivo, através de um procedimento de eluição dos metais retidos no agente ligante, e posteriormente determinada por uma técnica analítica apropriada e usada para quantificar as concentrações das espécies lábeis no sistema. Quando o dispositivo DGT é imerso em regimes de convecção descontrolados, como águas de rios e mares, as medidas são independentes das variações do fluxo (Figura 1).

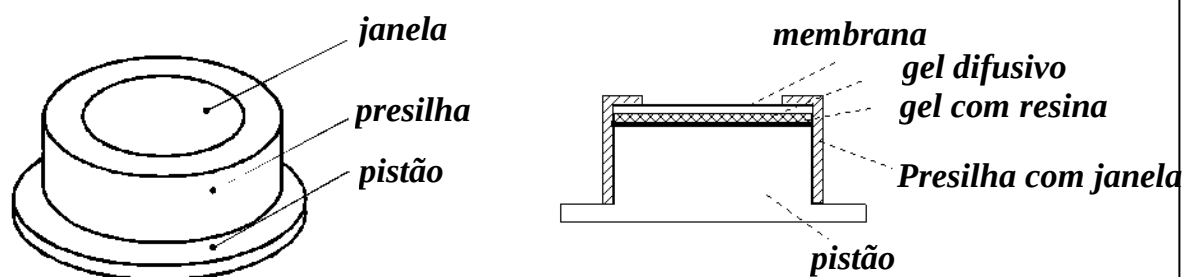
Figura 1. Esquematização da técnica DGT.



Fonte: Centro de Estudos Ambientais (CEA) UNESP

O dispositivo DGT consiste basicamente de um pistão de polipropileno, sobre o qual é colocada uma camada de um gel ligante, convencionalmente a resina Chelex-100 imobilizada em um gel de poliacrilamida-agarose, um gel difusivo, também de poliacrilamida-agarose e uma membrana de filtragem respectivamente (Figura 2). Essas camadas são fixadas ao pistão por uma presilha de polipropileno, a qual possui uma janela de 20 mm de diâmetro para que ocorra a difusão dos íons da solução para o interior do dispositivo.

Figura 2. Dispositivo da técnica DGT



Fonte: Centro de Estudos Ambientais (CEA) UNESP

O desempenho da resina Chelex-100 como agente ligante convencional da DGT foi avaliado por Garmo et al. (2003) para determinação de 55 elementos, sendo a resina capaz de reter quantitativamente, pelo menos, 24 dos elementos estudados (Pb, Zn, Co, Ni, Cu, Cd, Al, Mn, Ga, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Lu, Y). Apesar de relativamente abrangente a resina é inadequada para Li, Na, K, Rb, Mg, Ca, B, Tl, P, S, As, Bi, Se, Si, Sn, Sb, Te, Zr, Nb, Hf, Ta, W, Th, Ag.

Visando obter agentes ligantes complementares, de custo mais baixo ou com melhor desempenho que a resina Chelex-100, novos materiais tem sido propostos para serem utilizados na DGT.

Estudos preliminares realizados nos laboratórios do Centro de Estudos Ambientais da UNESP - Rio Claro e dois trabalhos recentes realizados por Tonello et al. (2010) e Pescim et al. (2011) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em agarose, mostraram a potencialidade de sua utilização como agente ligante na técnica DGT para a determinação, respectivamente, de Cd e Pb. Também, testes preliminares realizados na Instituição evidenciaram que o agente ligante desenvolvido foi efetivo para retenção de Pb, Cr, Cu, Ni e Zn.

Deste modo, considerando a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* para reter as espécies químicas descritas acima e a ampla gama de metais que podem ser retidos pela resina Chelex-100, pode-se considerar que o uso da levedura imobilizada em agarose, e da resina convencional Chelex-100, podem ser ampliados para a determinação de metais em águas marinhas.

Com este foco, o presente trabalho foi desenvolvido para avaliar a técnica DGT para a determinação de Pb, Cd, Cu, Zn e Ni em amostras de água de mar da Bacia Potiguar (Rio Grande do Norte e Ceará) na sua vertente convencional (agente ligante: Chelex-100 e agente difusivo: Gel de Poliacrilamida Difusivo e Restritivo) e determinação de Pb e Cd através de sua vertente alternativa (agente ligante: *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em géis de agarose e agente difusivo: Papel Cromatográfico 3MM Chr). O agente ligante alternativo foi preparado segundo procedimento previamente desenvolvido, contendo 20 % (m/v) de *S. cerevisiae* e 3,0 % (m/v) de agarose (PESCIM et al., 2011).

Os testes visaram avaliar a performance dos agentes ligantes convencional e alternativo na captação de Pb, Cd, Cu, Zn e Ni em amostras de água do mar no laboratório.

2. OBJETIVOS

Este estudo tem como principal objetivo a avaliação da técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração (DGT) em suas vertentes alternativa, para determinação de Cd e Pb, e convencional para determinação de Pb, Cd, Cu, Zn e Ni em água marinhas sujeitas a contaminação por atividades exploratórias de petróleo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Devido ao grande potencial de aplicação da técnica DGT em águas naturais, durante e anteriormente ao período de elaboração deste trabalho, diversos estudos foram realizados para a avaliação da técnica DGT na determinação de metais em água doce e marinha utilizando agentes ligantes na vertente convencional e alternativa. Além disso, paralelamente a esses estudos alguns trabalhos foram desenvolvidos no Centro de Estudos Ambientais da Unesp de Rio Claro para a avaliação da aplicação da técnica DGT em sua vertente alternativa (agente ligante de levedura imobilizada em agarose e agente difusivo Papel Cromatográfico 3MM) na determinação de metais em águas naturais.

Sherwood et al. (2009) realizaram imersões de dispositivos da técnica DGT para avaliar o risco ambiental de um emissário de rejeitos em águas marinhas profundas. As medidas das concentrações totais, filtráveis e lábeis de nove metais (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni e Zn) foram conduzidas em cinco sítios diferentes localizados a 4,2 km do emissário e em três profundidades diferentes (50-70; 105-130; 135-155 m) por 4 a 7 dias. Os resultados mostraram que as concentrações lábeis de metais determinados usando a DGT ficaram abaixo das diretrizes australianas de qualidade da água (para a proteção de 99 % dos organismos marinhos) a 0,13 km dos emissários para Cd, Cr e Ni. Também ficaram abaixo do padrão (para a proteção de 95 % dos organismos marinhos) a 0,4, 0,7 e 3,6 km para Pb, Zn e Cu, respectivamente.

A especiação e biodisponibilidade de Cd, Cu, Ni e Pb na costa Bulgara do Mar Negro foi avaliada por Slaveykova et al. (2009) através da técnica DGT e HF-PML. Foram constatadas pelos autores a potencialidade das duas técnicas para especiação e avaliação da biodisponibilidade dos analitos em ambientes complexos, informações importantes necessárias para a compreensão do papel das diferentes espécies químicas na biodisponibilidade de metais em águas marinhas.

Wallner-Kersanach et al. (2009) utilizaram a DGT para determinar a fração lábil de metais (Cd, Co, Cu, Mn, Ni e Zn) durante diferentes condições hidrológicas no Estuário da Lagoa dos Patos. Segundo os autores, os resultados demonstraram a sensibilidade da DGT para especiação de metais e a viabilidade do uso da técnica em águas estuarinas altamente dinâmicas para a obtenção da concentração de metais traço lábeis.

Ding et al. (2010) realizou a mensuração de fósforo reativo dissolvido através da técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração usando um novo agente ligante. Óxido de zircônio amorfo meio-seco (5% de teor de água) foi misturado com solução de acrilamida para a preparação da nova fase de ligação. O gel ligante resultante teve uma alta capacidade de ligação (223 mg P cm^{-2}) para o fosfato. Uma solução de NaOH (1 M) foi utilizada para eluição de fosfato a partir do gel, e uma eficiência de eluição de 0,95 foi obtida. Um teste de captação da DGT com esse gel mostrou a sua dependência da temperatura, e não houve influência do pH (3-10) e da força iônica (10 nM a 0,1 M). A sua capacidade para a resposta da DGT foi superior a 100 ug P cm^{-2} , correspondendo a uma concentração de fósforo reativo dissolvido de mais de 20 mg L^{-1} para uma imersão de 24 h com um dispositivo DGT padrão a 25°C , que foi, pelo menos, 50 vezes a mais que o do gel de óxido de ferro comumente usados na DGT técnica. Esta técnica foi demonstrada de maneira satisfatória em imersões *in situ* em regiões dominadas por algas e macrófitas aquáticas do Lago Taihu.

Panther et al. (2010) avaliaram um novo método que usa dióxido de titânio como base absorvente (Metsorb) comparando-o com o já bem estabelecido método da DGT que utiliza o mineral $(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ ($(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ com gel de poliacrilamida). Experimentos da DGT em séries temporais mostraram que a massa de fósforo acumulada por Metsorb e pelo mineral $(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ foi linear com o tempo, quando imerso em soluções simples.

Ambos os métodos da DGT mostraram as variações das captações previstas para o pH (4,0-8,3) e força iônica ($0,0001-1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3) e a capacidade total da fase ligante Metsorb ($\sim 40\,000 \text{ P ng}$) foi 2,5-5 vezes superior à capacidade total relatada da fase ligante do mineral $(\text{Fe}_{3+})_2\text{O}_3 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$. Imersões *in situ* de dispositivos da DGT contendo o Metsorb com várias espessuras de camada difusora permitiram a mensuração exata de ambas as camadas limite difusivas e concentração *in situ* de fósforo reativo dissolvido. O método DGT utilizando o Metsorb tem performance similar ao do hidreto de ferro para água doce mas se mostra mais precisa que para a determinação de fósforo reativo dissolvido em águas marinhas.

Schintu et al. (2010) avaliaram a determinação de metais (Cd, Cu, Pb e Zn) em áreas marinhas próximas a uma fundição de zinco e chumbo no sudoeste de Sardinia (Itália) utilizando a técnica DGT e espécies de algas verdes, vermelhas e marrons. No estudo foram encontrados relações significativas entre o conteúdo de Pb em *P. Pavonica* e no obtido através do DGT, sugerindo que as concentrações de elementos não essenciais como o Pb nos tecidos de algas são aparentemente controlados pela quantidade das espécies de metais dissolvidas nas águas marinhas. Os estudos demonstraram que tanto a técnica DGT, como os métodos utilizando algas, podem ser utilizados para um melhor entendimento da disponibilidade de metais traço nas águas marinhas.

Outro estudo de maior abrangência foi realizado por Schint et al. (2008) para avaliar as concentrações de Cd, Cu, Ni e Pb em diferentes áreas das águas da costa de Sardinia (Itália), utilizando mexilhões (*Mytilus galloprovincialis*) e a técnica DGT. Os dispositivos da técnica DGT forneceram maior sensibilidade na determinação de diferenças de concentrações entre os locais de estudo, enquanto a interpretação dos dados do biomonitoramento revelaram dificuldades relacionadas aos fatores bióticos e abióticos que podem influenciar as mensurações. Análises de regressão mostraram correlações significantes entre as concentrações de Pb e Cd nos tecidos dos mexilhões e biodisponível nas águas marinhas. Os mexilhões não apresentaram acumulação de Cu e Ni, entretanto a técnica DGT apresentou concentrações lábeis significativas destas espécies biodisponíveis nas águas marinhas. Os resultados mostraram a potencialidade de utilização dos dois métodos discutidos para o estudo da disponibilidade de metais traço em águas costeiras.

Stark et al. (2006) avaliaram a qualidade da água de uma enseada marinha (“Brown Bay”) durante o período de remediação de um local de disposição de resíduos abandonado no site da Casey Station, Leste da Antártida. Neste estudo foram utilizados uma combinação de biomonitoramento com métodos químicos analíticos. Foram dispostas *in situ* uma espécie de anfípodo da Antártida, *Paramoera walkeri*, e dispositivos da técnica DGT, durante o mesmo período. Não houve nenhuma diferença de mortalidade da espécie de anfípodo imersa no local de estudo se comparadas com outros locais de referência. Entretanto, houveram diferenças significativas nas concentrações de metais presentes nos anfípodos da “Brown Bay” (maiores concentrações de antimônio, cobre, cádmio, chumbo, ferro e estanho) com relação a mesma espécie em outros locais de referência. As diferenças de concentração dos metais nos locais de estudo obtidas através da técnica DGT foram menos sensíveis do que as determinadas através dos anfípodos indicando que as ligações dos metais em partículas suspensas na água configuraram-se como uma forma potencial de contaminação. Os resultados indicaram que apesar da remediação da área estar sendo bem sucedida na prevenção de efeitos tóxicos, a qualidade da água do local de estudo foi reduzida, aumentando a biodisponibilidade de metais que podem levar a efeitos crônicos na biota aquática.

A *Saccharomyces cerevisiae* é um substrato biológico utilizado anteriormente como material sorvente em vários métodos de extração em fase sólida para a separação e pré-concentração de diversos metais, como o Fe, Ni, Cd, Zn, Cu e Pb (BAG et al., 1998; BAG et al., 1999; MAQUIEIRA et al., 1994; BISCARO et al., 2007). O material é barato e facilmente encontrado na forma desidratada. Mais recentemente, a aplicação analítica da levedura foi expandida para a determinação seletiva de espécies de metais e metalóides (SMICHOWSKI, et al., 2000; KOH et al., 2005; MENEGÁRIO et al., 2007; BAG et al., 2000; MENEGÁRIO et al., 2005; MADRID et al., 1995; PÉREZ-CORONA et al., 1998; MENEGÁRIO et al., 2006; PÉREZ-CORONA et al., 1997; CALDORIN et al., 2006). Por exemplo, espécies de As(III), Cd(II), Cr(III), metilmercúrio, Sb(III), Se(IV), e Sn(IV) na presença de As(V), Cd-MT, Cr(VI), Hg(II), Sb(V), Se(VI) e Sn(II), respectivamente, são retidas quantitativamente e seletivamente pela levedura.

Estudos recentes realizados no Centro de Estudos Ambientais da UNESP - Rio Claro utilizando *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em agarose mostraram a potencialidade de sua utilização como agente ligante na técnica DGT para a determinação de Cd e Pb.

Tonello et al. (2010) propuseram a utilização de um agente ligante de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em agarose para a técnica DGT. No estudo foram realizados alguns testes de retenção de Cd com diferentes composições de *S. Cerevisiae* (4,5 % - 20% m/v) e agarose (1,5-5,0% m/v). A composição com melhores resultados foi a de 20% m/v de levedura e 1,5% de agarose. Resultados muito consistentes, para retenção de Cd, foram obtidos para uma faixa de pH de 4,5 a 7,5 e para forças iônicas $\geq 0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e o material proposto foi utilizado para a análise de águas de mar e de rios. Para a determinação de Cd, houve uma excelente concordância entre os resultados obtidos com o material proposto e os resultados obtidos para o material convencional (Chelex-100), validando assim, o uso dos géis de levedura-agarose como agente ligante da técnica DGT.

Pescim et al. (2011) desenvolveram um estudo sobre a retenção de Pb utilizando o agente ligante de levedura imobilizada em agarose com composição diferente (20% m/v *S. Cerevisiae* e 3,0% m/v de agarose) do estudo de Tonello et al. (2010). Alguns parâmetros da DGT como fator de eluição, tempo de imersão, força iônica e pH, foram testados. A curva de imersão obtida foi caracterizada por boa correlação linear ($R^2=0,9878$), demonstrando uma excelente concordância com a curva teórica prevista. Com relação às variáveis do sistema, o Pb foi eluído efetivamente com HNO_3 12,5% (v/v) e os resultados para retenção de chumbo foram consistentes com forças iônicas $\geq 0,005 \text{ mol L}^{-1}$ e com uma faixa de pH de 4,5 a 8,5. Além disso, a determinação de Pb em águas de rio utilizando a DGT apresentou concordância com o total dissolvido de Pb e a combinação de ICP OES com as imersões *in situ* durante 72 horas, utilizando a técnica DGT, possibilitaram a determinação da fração lábil de Pb em águas de rio.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos e acessórios

Foram utilizados um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (GBC modelo integra XL) equipado com câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion) e nebulizador ultra-sônico (CETAC - U5000AT⁺) e um espectrômetro de massas (ICP-MS).

Outros equipamentos utilizados foram:

- Vidrarias e acessórios de laboratório;
- Os pistões e as luvas dos dispositivos DGT foram obtidos da DGT Research ® Ltd.
- Agitador Orbital
- Equipamentos de uso rotineiro em laboratórios de química analítica, como sistemas purificadores de água, medidores de pH, termômetro, agitadores e balanças analíticas;
- Estufa projetada para análise de DBO com temperatura controlada (Tecnal – TE-391)
- Tubos de centrífuga;

4.1.2 Reagentes e Soluções

Para a vertente convencional, o agente ligante utilizado foi o gel de poliacrilamida-agarose com resina quelante Chelex-100. O agente difusivo foi o gel de poliacrilamida-agarose, e a membrana filtrante foi de acetato de celulose.

Para a vertente alternativa o agente ligante utilizado foi o gel de levedura-agarose e como agente difusivo o Papel Cromatográfico Chr 3MM (Whatman).

Os principais reagentes e soluções utilizados foram: Resina Chelex 100 (200-400 *mesh*), HNO₃ sub-boiling, ácido acético e solução padrão multielementar.

Todas as soluções foram preparadas usando água purificada a uma resistividade de 18 Ωcm.

4.1.3 Amostras

As amostras de água de mar utilizadas são provenientes de regiões sujeitas a descargas de emissários marinhos na Bacia Potiguar, Rio Grande do Norte.

3.2 Métodos

4.2.1 Princípios da técnica DGT

A técnica DGT se baseia na 1ª lei de difusão de Fick. O fluxo (F) dos íons que difundem da camada do gel difusivo para a resina é dado pela equação (I):

$$F = D(C_b - C') / \Delta g \quad (I)$$

onde D é o coeficiente de difusão do gel, C_b é a concentração do íon lábil na solução externa, C' é a concentração do íon livre na resina e Δg é a espessura do gel difusivo. Se os íons estiverem em rápido equilíbrio com a resina e apresentarem uma forte ligação, a concentração C' será zero, caso não ocorra à saturação da resina, assim temos a equação (II):

$$F = DC_b / \Delta g \quad (II)$$

Sendo a definição de fluxo $F = M / At$, onde M é a massa do íon, A a área da janela do dispositivo e t o tempo, podemos reescrever a equação (III):

$$M = DC_b tA / \Delta g \quad (III)$$

Determina-se a massa M do íon e calcula-se a concentração C_b do metal na solução externa (solução onde dispositivo foi imerso) com a equação (IV):

$$C_b = M \Delta g / DtA \quad (IV)$$

A massa do íon acumulada M no disco de gel com resina é obtida através da equação (V):

$$M = C_e (V_{eluyente} + V_{bgel}) / f_e \quad (V)$$

onde C_e é a concentração do íon determinada no eluido, $V_{eluyente}$ é o volume de eluente adicionado ao gel com resina, V_{gel} é o volume do gel com resina e f_e é o fator de eluição para cada íon.

4.2.2 Procedimento de montagem e experimentos de imersão dos dispositivos

O dispositivo DGT consiste basicamente em um pistão de polipropileno, sobre o qual é colocada uma camada de um gel ligante, posteriormente um gel difusivo, e uma membrana filtrante (Figura 1). Essas camadas são fixadas ao pistão por uma presilha de polipropileno, a qual possui uma janela de 20 mm de diâmetro para que ocorra a difusão dos íons da solução para o interior do dispositivo. A camada difusiva assegura que, mesmo quando o dispositivo DGT é imerso em sistemas com regimes de convecção descontrolados (como águas de rios e mares), as medidas sejam independentes das variações do fluxo.

As imersões dos dispositivos foram realizadas em amostras de água de mar, condicionadas em temperatura de 4 °C.

Durante as imersões, as temperaturas de imersão foram mantidas constantes ($T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$) para que não houvesse variação dos coeficientes de difusão dos analitos (D). As soluções foram mantidas sob agitação para que uma camada, denominada DBL (*Diffusive boundary layer*), que se forma na frente do dispositivo e se comporta como sendo uma extensão do agente difusivo, fosse reduzida o máximo e não retardasse a difusão dos analitos para a superfície do ligante.

Os experimentos consistiram na realização de imersões de curtos (4, 6, 8 horas) e longos períodos (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 14 dias) dos dispositivos da DGT, para vertente convencional, e de longos períodos (1, 4, 5 e 7 dias) para a vertente alternativa. As curtas e longas imersões foram conduzidas em recipientes contendo 7 L de amostra.

Na vertente alternativa o gel de levedura imobilizada em agarose foi avaliado com relação a retenção e fracionamento químico de Cd e Pb na amostra. As curvas de imersão para massas teóricas e massas obtidas foram comparadas de modo a avaliar o agente ligante alternativo com relação a efetividade na determinação de frações lábeis na amostra marinha.

Na vertente convencional foram utilizados agentes difusivos e restritivos (possui menor porosidade restringindo a passagem de algumas espécies químicas) com a finalidade de avaliar a presença de frações orgânicas dos analitos na amostra de água de mar da região de estudo.

4.2.3 Procedimento para recuperação e determinação das massas dos analitos retidas no agente ligante

A recuperação dos analitos do agente ligante convencional foi realizada através da eluição, adicionando-se 2 mL de HNO₃ 2 Molar (%) ao material. A solução foi mantida sob agitação durante 4 horas e em seguida foi introduzida no ICP MS.

O procedimento de eluição utilizado para o agente ligante alternativo foi realizado adicionando-se 0,5 mL de HNO₃ concentrado ao material para a dissolução da agarose e, posteriormente, diluição da solução para 4 mL. A solução foi mantida sob agitação durante 4 horas. Em seguida a solução foi levada a centrífuga para separação das fases líquida e sólida e posterior introdução no ICP MS.

O fator de eluição dos analitos (f_e) foi calculado segundo a equação (VI):

$$f_e = m_{elu} / m_{ret} \quad (VI)$$

Onde, m_{elu} é a massa eluída no agente ligante e m_{ret} é a massa retida. Os fatores de eluição dos analitos para os agentes difusivo e restritivo, determinados previamente no Centro de Estudos Ambientais da Unesp (CEA) encontram-se apresentados na Tabela 1. O fator de eluição utilizados para Pb e Cd no agente ligante alternativo foi $f_e = 0,90$ (PESCIM et al., 2011).

Tabela 1. Fatores de eluição dos analitos f_e para agentes difusivo e restritivo

Analitos	Difusivo
Ni	0,81
Cu	0,75
Zn	0,89
Cd	0,86
Pb	0,53

4.2.4 Cálculos das massas retidas (esperada e obtida) nos dispositivos

As determinações das massas retidas esperadas nas amostras de imersão para cada tempo (t) foram realizadas através da equação (III):

$$M = DC_b tA / \Delta g \quad (\text{III})$$

As determinações das massas retidas esperadas nas amostras de água do mar, para cada tempo (t), foram realizadas através da eq. (2) e considerando uma espessura de 0,46 mm para o agente difuso (Δg) uma área de 3,14 cm². Os coeficientes de difusão (D) para cada metal no agente difusivo e restritivo e para o Papel Cromatográfico 3MM foram previamente determinados (MENEGÁRIO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2008) e são apresentados respectivamente nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Coeficientes de difusão dos analitos D (10⁻⁶ cm² s⁻¹, 23°C) nos agentes difusivo e restritivo

Analitos	Difusivo	Restritivo
Ni	5,47	3,83
Cu	5,9	4,13
Zn	5,76	4,03
Cd	5,77	4,04
Pb	7,61	5,32

Fonte: DGT Research ®

Tabela 3. Coeficientes de difusão D (10⁻⁶ cm² s⁻¹, 23°C) de Cd e Pb no Papel Cromatográfico 3MM

Analitos	Coeficientes de Difusão (D)
Cd	1,51
Pb	3,18

Para o cálculo da massa retida obtida utilizou-se a equação (VII):

$$M = C_e \cdot V_f / f_e \quad (\text{VII})$$

Onde M é a massa do analito determinada, C_e é a concentração determinada através do ICP OES, V_f é o volume final do tubo de centrífuga após o tratamento com HNO_3 e diluição em água e f_e é o fator de eluição do analito.

4.2.5 Determinação da Concentração total dos analitos na amostra

As concentrações totais dos analitos na amostra foram determinadas através de inserção direta (com diluição de 10 vezes) da amostra no ICP MS. As concentrações totais obtidas foram comparadas com as concentrações médias determinadas através da técnica DGT. Essa comparação foi realizada com a finalidade de validar a efetividade da técnica DGT.

4.2.6 Preparo do gel ligante de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em agarose

O gel ligante foi preparado conforme procedimento realizado por Pescim et al. (2011):

Dissolveu-se a agarose (1,50g) em 50 mL de água e na solução adicionou-se a *Saccharomyces cerevisiae desidratada* (10 g) em banho-maria (80 °C) sob agitação com bastão de vidro. A mistura foi então transferida para uma placa de vidro, permanecendo em repouso até atingir a temperatura ambiente para adquirir consistência na forma de gel.

A lâmina de gel formada (1 mm de espessura) foi cortada em discos de 2,5 cm de diâmetro. Os discos foram lavados e preservados em água purificada (4 °C).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curvas de imersão de Cd, Pb, Zn, Cu e Ni para o agente ligante convencional

Abaixo são apresentadas as curvas de imersão dos analitos para os agentes difusivos (Figuras 2 a 6) e restritivos (Figuras 7 a 11) em períodos longos de imersão; e para os agentes difusivos (Figuras 12 a 16) e restritivos (Figuras 17 a 21) em períodos curtos de imersão:

Figura 3. Curva de imersão de Cd para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

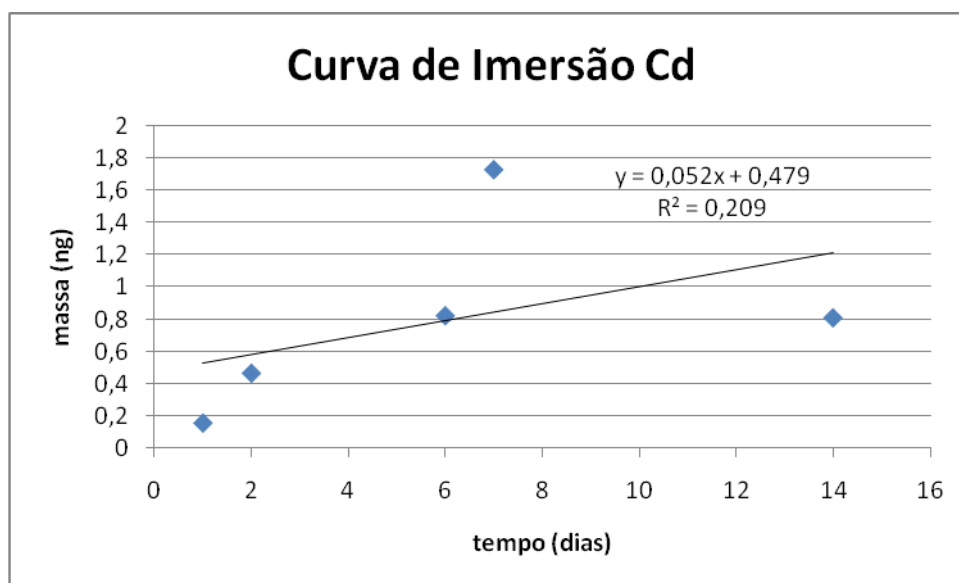


Figura 4. Curva de imersão de Pb para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

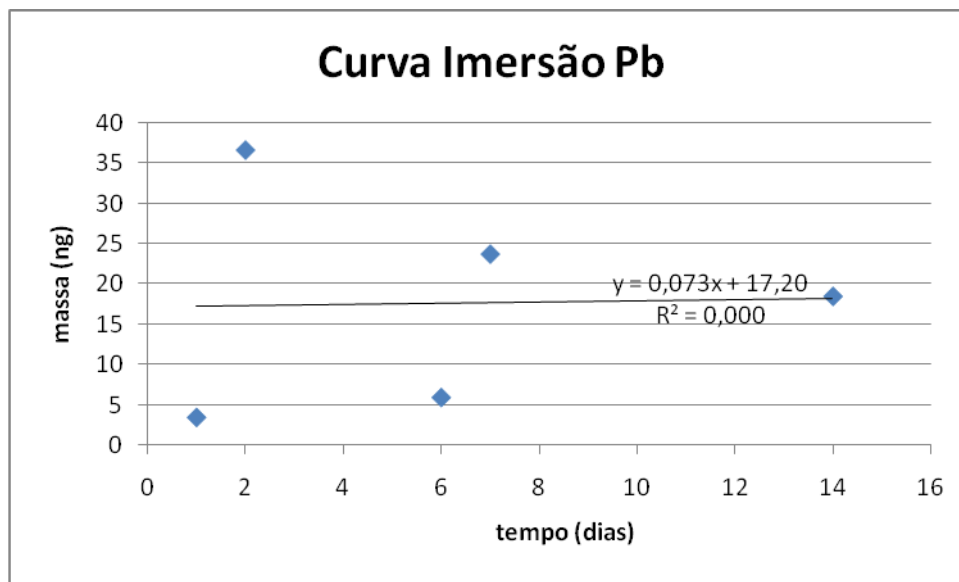


Figura 5. Curva de imersão de Zn para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

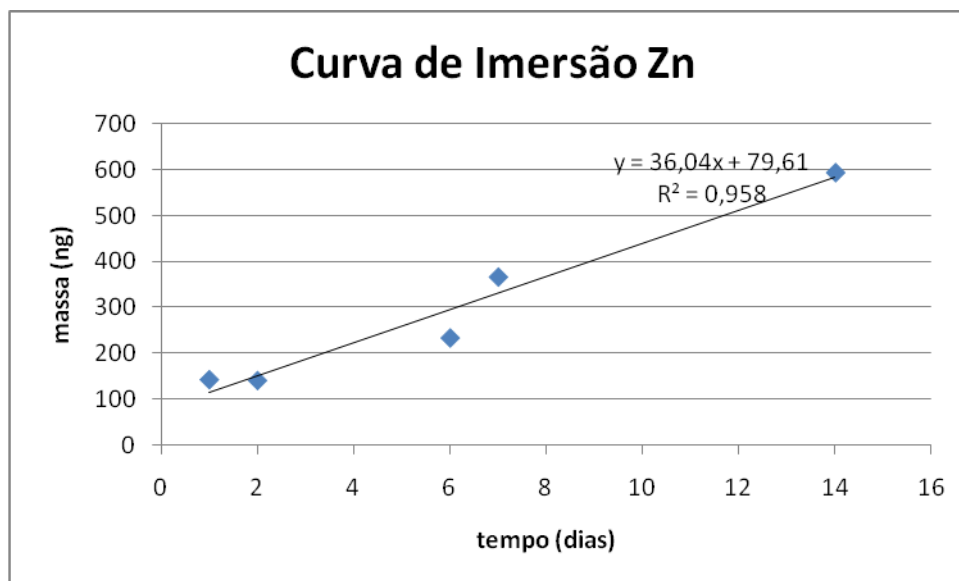


Figura 6. Curva de imersão de Cu para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

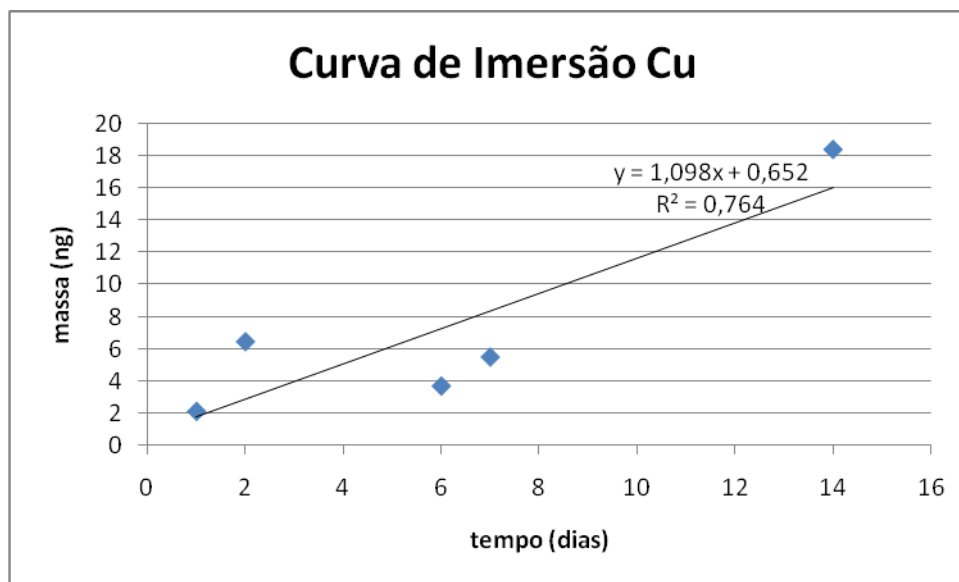


Figura 7. Curva de imersão de Ni para agente difusivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

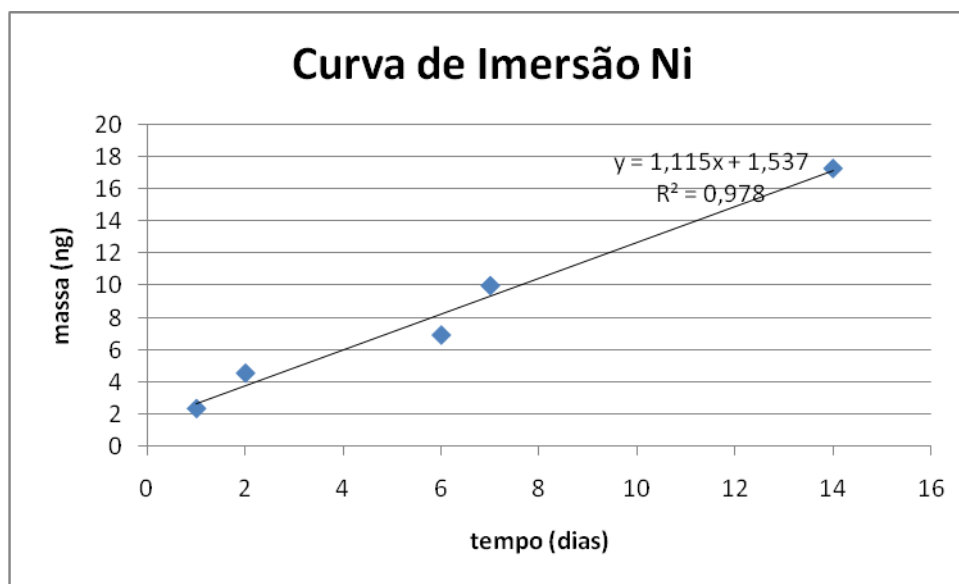


Figura 8. Curva de imersão de Cd para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

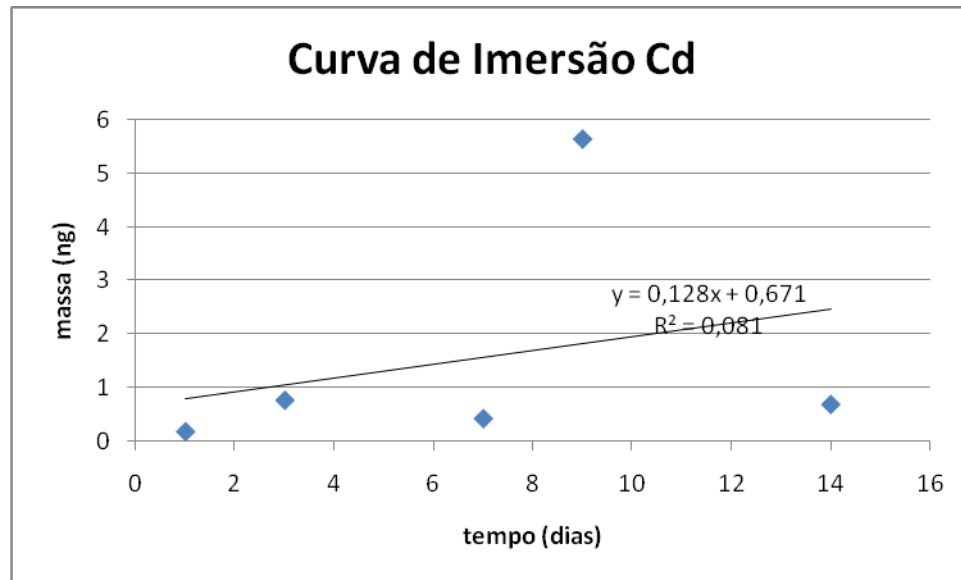


Figura 9. Curva de imersão de Pb para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

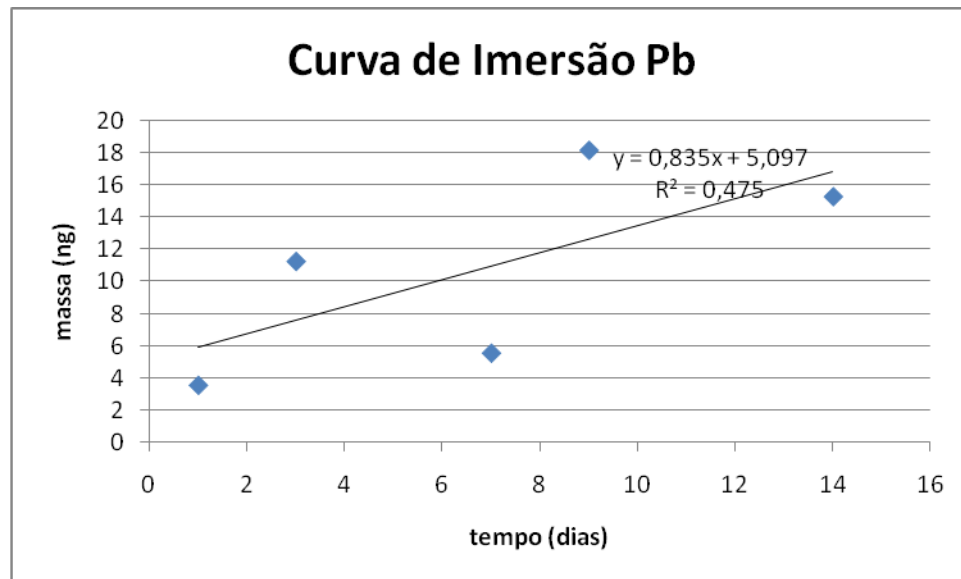


Figura 10. Curva de imersão de Zn para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

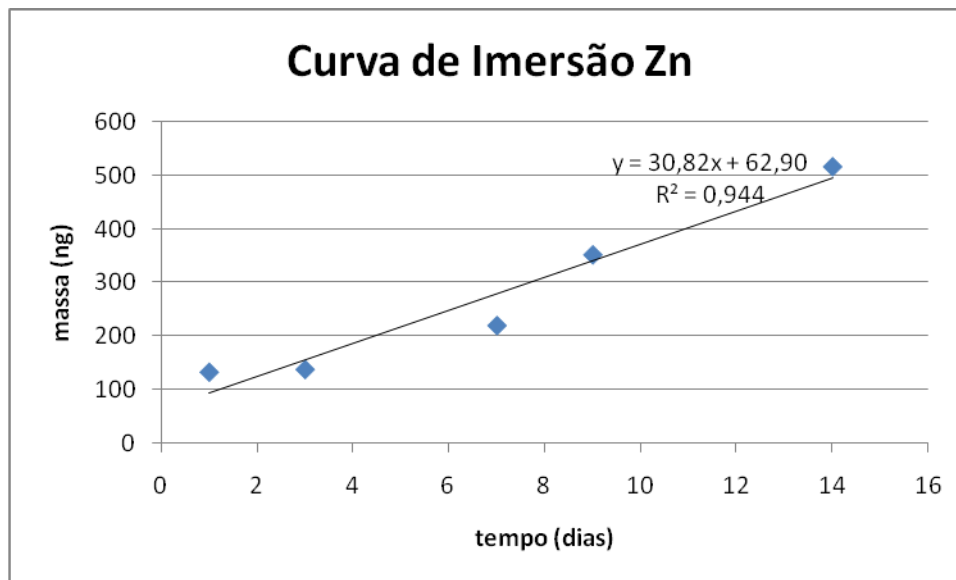


Figura 11. Curva de imersão de Cu para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.

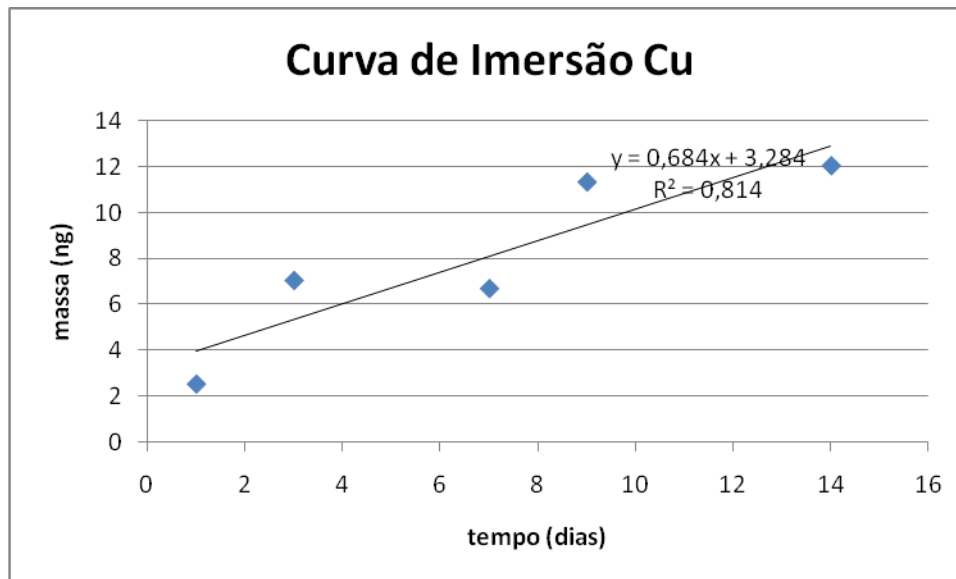
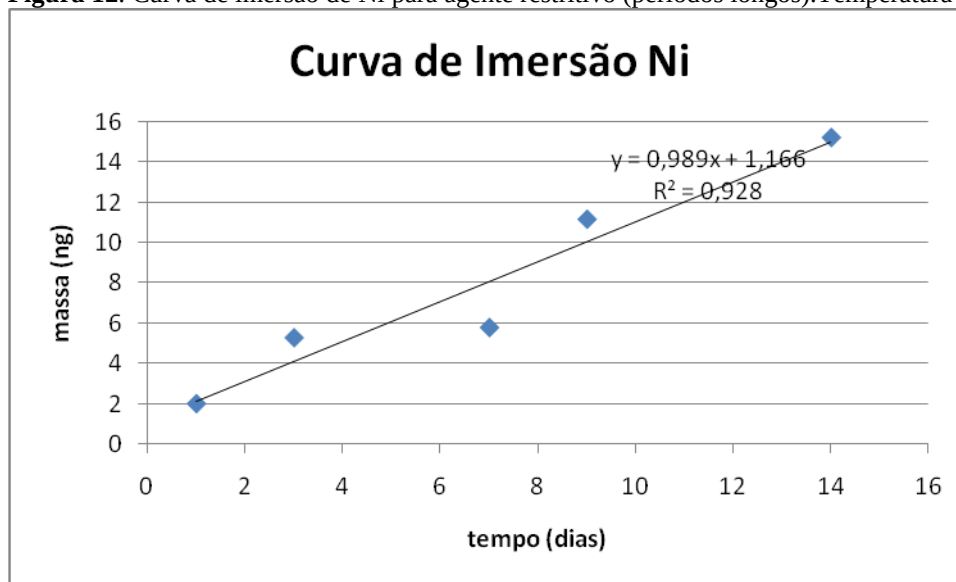


Figura 12. Curva de imersão de Ni para agente restritivo (períodos longos). Temperatura=23°C.



Foram observados bons resultados para os elementos Zn, Ni e Cu. As curvas de imersão desses elementos apresentaram boa correlação linear respectivamente para os géis difusivos e restritivos: Zn ($y=36,047x+79,613$ $R^2 = 0,9586$), Ni ($y=1,1155x+1,5378$; $R^2 = 0,9789$) e Cu ($y=1,0984x+0,6525$; $R^2 = 0,764$); Zn ($y=30,824x+62,909$; $R^2 = 0,9444$), Cu ($y=0,6847x+3,2843$; $R^2 = 0,8143$) e Ni ($y=0,9893x+1,1662$; $R^2 = 0,9286$), denotando que a técnica foi utilizada com sucesso para a determinação desses metais para longos períodos de imersão na amostra de água marinha.

Apesar disso, foi observado baixa correlação linear para as curvas de imersão de Cd e Pb. As variações de massa obtidas para as curvas de imersão de Cd e Pb podem ser atribuídas à contaminação dos metais provenientes do ácido nítrico (HNO_3) utilizado para a eluição dos analitos e do manuseio dos agentes ligantes e difusivos.

Devido às baixas concentrações dos analitos na amostra, o sistema apresenta-se sensível a contaminação, o que pode influenciar significativamente os resultados das massas retidas pelo agente ligante.

Para obtenção de resultados mais concordantes, foram retirados das curvas de imersão, os valores de massas obtidas nos dias 3, 8 e 9 para agente difusivo, e 2, 6 e 8 para agente restritivo.

Especificamente para esses pontos foram identificadas contaminações significativas para todos os analitos, as quais poderiam interferir no padrão de distribuição das massas obtidas ao longo do período considerado e afetar significativamente o resultado final.

Figura 13. Curva de imersão de Cd para agente difusivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

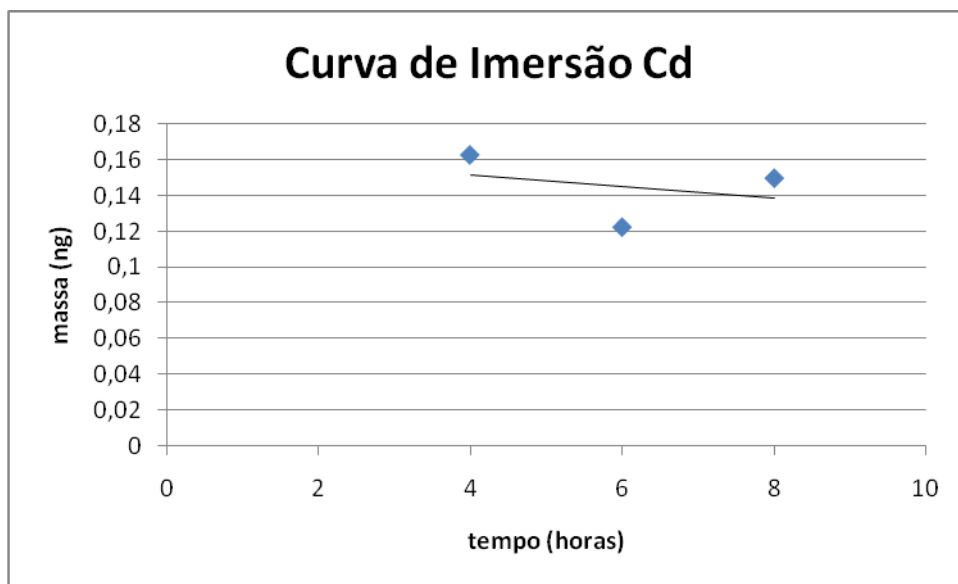


Figura 14. Curva de imersão de Pb para agente difusivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

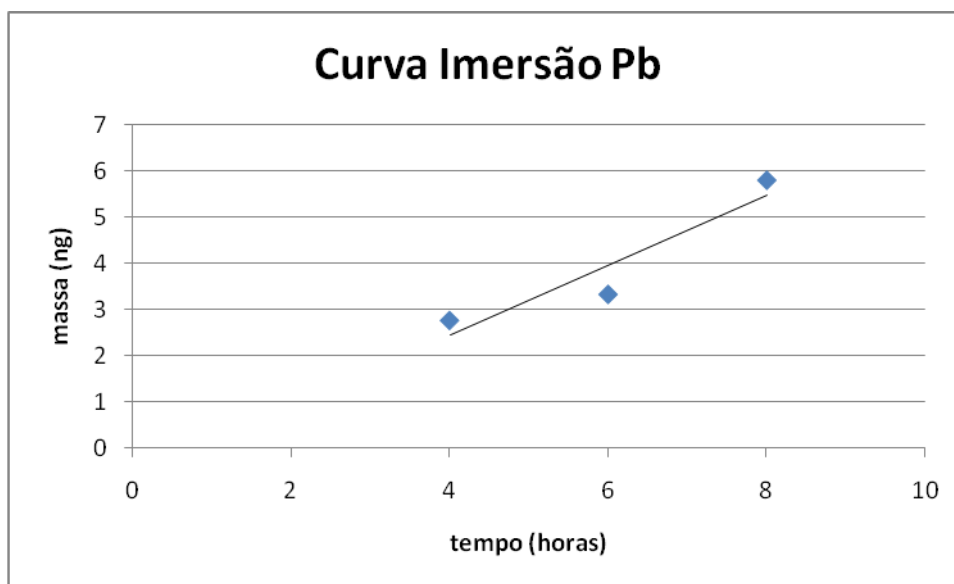


Figura 15. Curva de imersão de Zn para agente difusivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

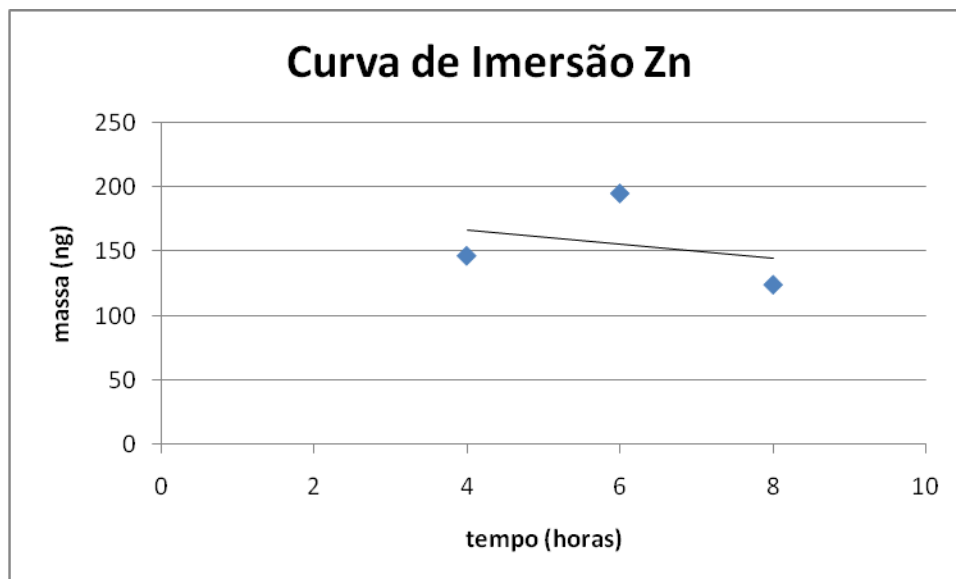


Figura 16. Curva de imersão de Cu para agente difusivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

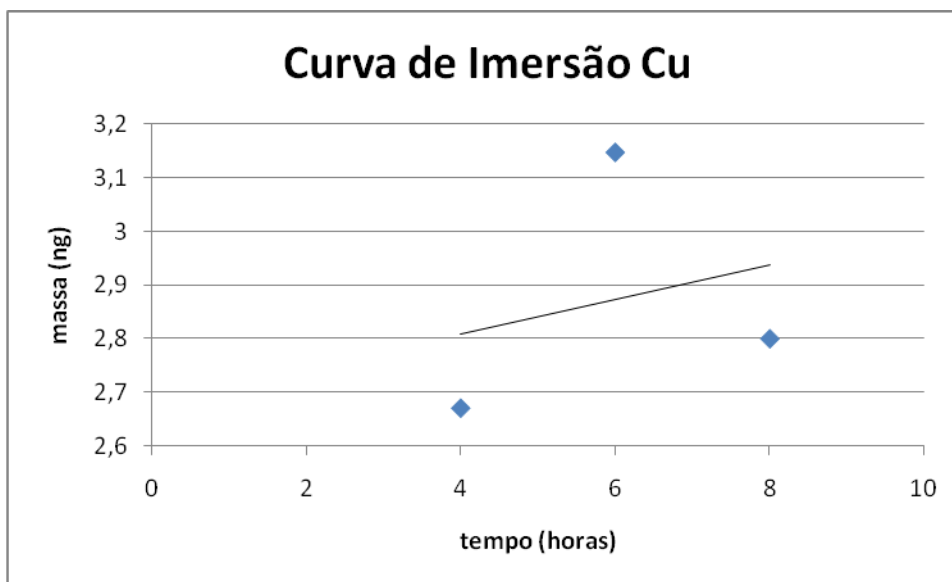


Figura 17. Curva de imersão de Ni para agente difusivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

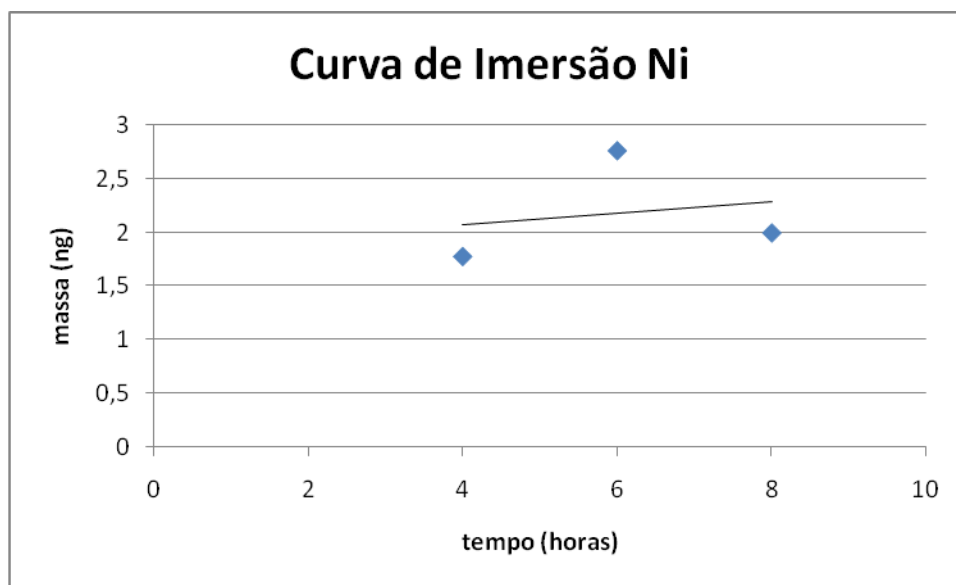


Figura 18. Curva de imersão de Cd para agente restritivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

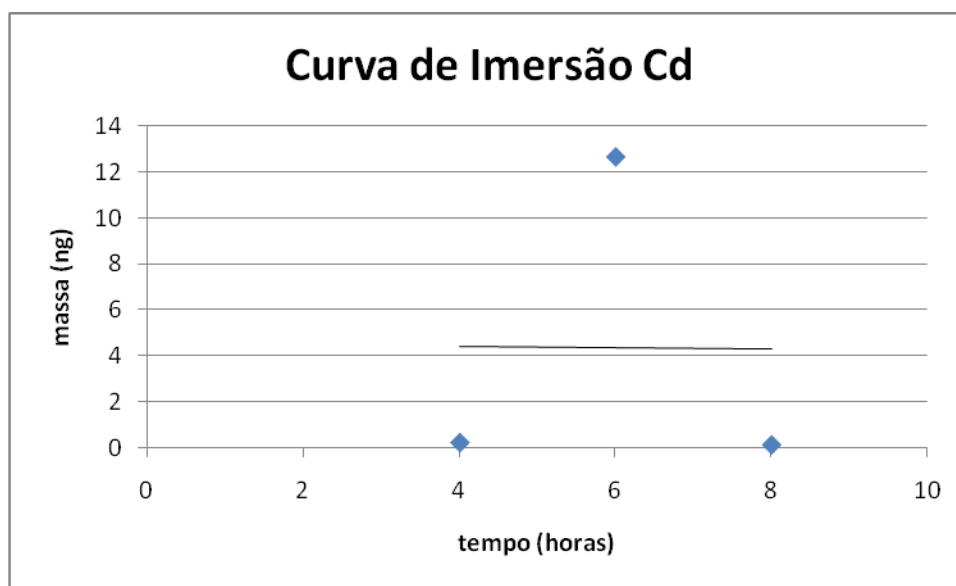


Figura 19. Curva de imersão de Pb para agente restritivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

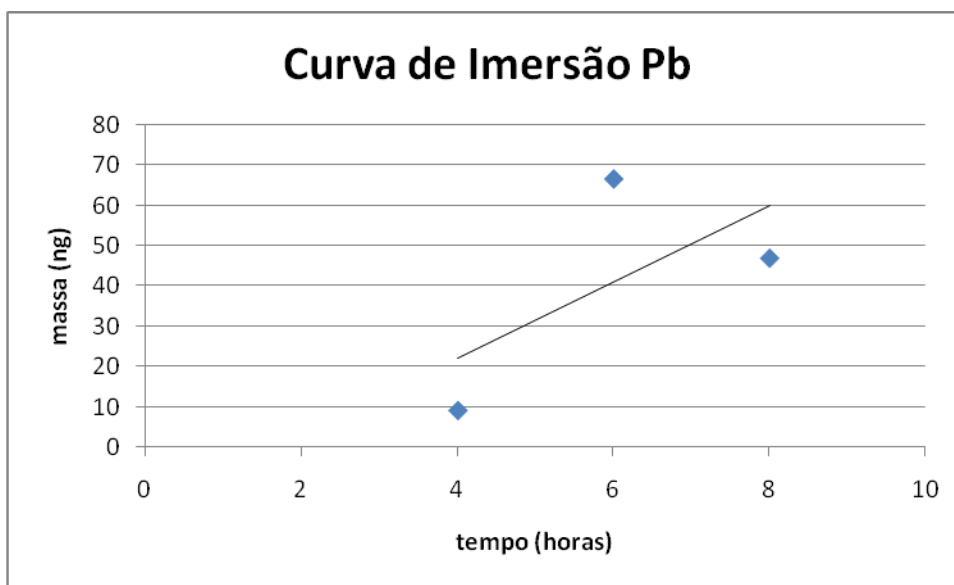


Figura 20. Curva de imersão de Zn para agente restritivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

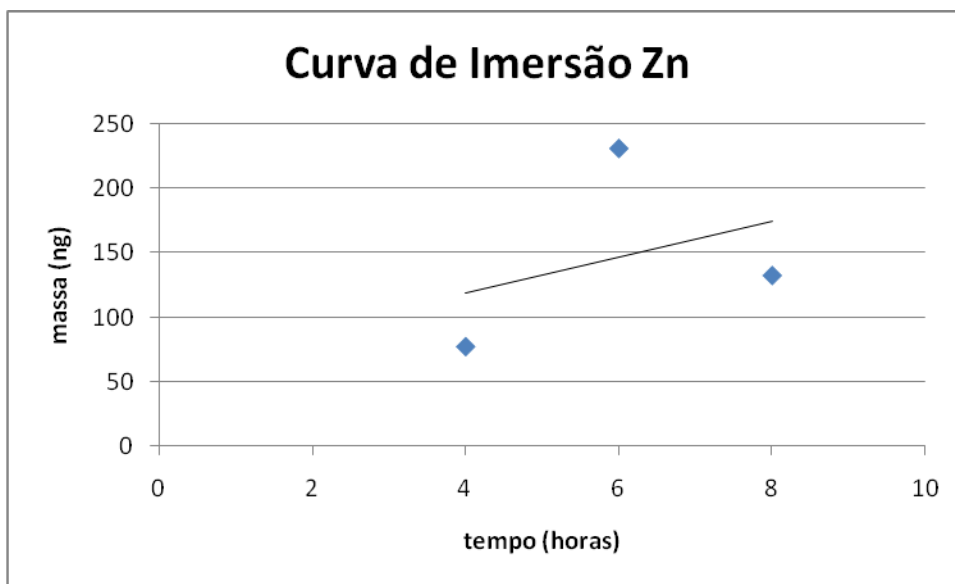


Figura 21. Curva de imersão de Cu para agente restritivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.

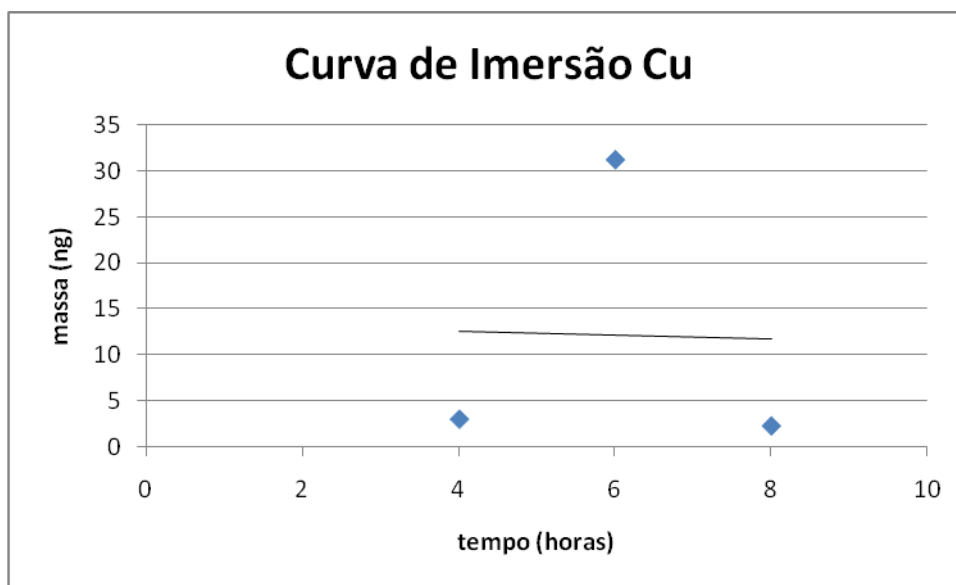
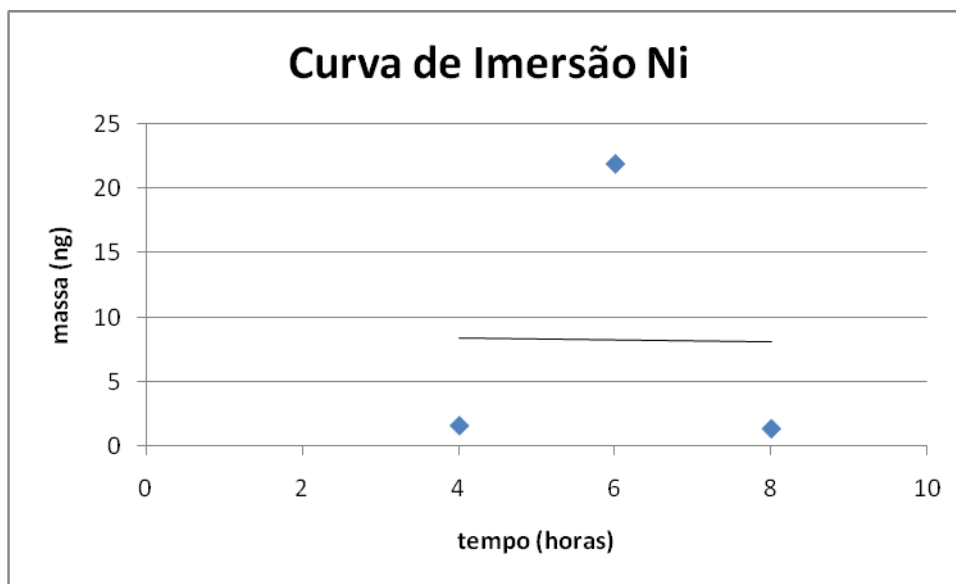


Figura 22. Curva de imersão de Ni para agente restritivo (períodos curtos). Temperatura=23°C.



A baixa correlação linear obtida para os analitos nas curvas de imersão de curtos períodos de 4, 6 e 8 horas (Figuras 12-21), tanto para o agente difusivo quanto para o restritivo, pode ser atribuída ao curto período de imersão adotado, que associado a baixa concentração dos analitos presentes na amostra, não permitiu que houvesse significativo acúmulo de massa no agente ligante.

Outro fator a ser considerado, e que também pode ser associado a baixa concentração de analitos, é a ocorrência aparente de contaminação para os dispositivos no período de 6 horas. Essa contaminação pode ser percebida para todos os analitos, quando considerado o agente restritivo (Figuras 17-21), e para Cu e Ni no agente difusivo (Figuras 15 e 16).

5.2 Curvas de imersão de Pb e Cd para o agente ligante alternativo

A performance do agente ligante de levedura imobilizada em agarose e o papel Cromatográfico 3 MM Chr (agente difusivo) foi avaliada durante 7 dias através de imersões em amostras de água de mar.

As Figuras 22 e 23 apresentam as massas de Pb e Cd retidas pelos dispositivos em uma amostra de água de mar com “spike” ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb e Cd) e a curva de imersão esperada para uma solução contendo $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb e Cd. Os resultados sugerem que parte Pb contido na solução apresenta-se não lábil, ou seja, não disponível para a retenção pelo agente ligante proposto.

A análise realizada através do software CHEAQS mostrou que as espécies principais de Pb na amostra de água de mar são: PbCl^+ (26.2 %) , $\text{Pb}(\text{SO}_4)_2^{2-}$ (24.9 %), $\text{PbCl}_{2(\text{aq})}$ (15.4%), $\text{Pb}(\text{SO}_4)$ (9%), PbCl_3^- (6.0 %). A especiação do Pb em amostra de água de mar (pH=7,66) foi realizada considerando a presença de Cl^- (19,700 mg l^{-1}), Na^+ (10,900 mg l^{-1}), Mg^{2+} (1,290 mg l^{-1}), SO_4^{2-} (2,760 mg l^{-1}), Ca^{2+} (420 mg l^{-1}), K^+ (400 mg l^{-1}) and CO_3^{2-} (135 mg l^{-1}).

As Figuras 22 e 23 demonstram uma boa concordância entre a massa de Pb e Cd retida pelo gel ligante de levedura e a massa esperada em uma solução de $2.5 \mu\text{L}^{-1}$ Pb e Cd, sendo para Pb, considerado somente a espécie PbCl^+ . Os dados obtidos para o tempo de imersão de 7 dias sugere a saturação do agente ligante. Estes resultados sugerem que o mecanismo de adsorção do Pb pela *S. Cerevisiae* ocorre principalmente devido a troca iônica e através dos grupos Tiol para Cd. Deste modo, o material proposto oferece uma diferente forma para o fracionamento do chumbo se comparado com a resina Chelex-100 (ZHANG e DAVISON, 1995).

Figura 23. Curva de imersão contendo a Massa total de Pb (esperada), Massa obtida de Pb e massa de PbCl^+ em função do tempo de imersão para água do mar contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb ($\text{pH} = 7,66$). Os amostradores foram montados utilizando-se 2 discos de Papel Cromatográfico 3MM (0,92 mm) e discos contendo 20% (m / v) de *S. cerevisiae* e 3% (m/v) de agarose. Temperatura= 23°C

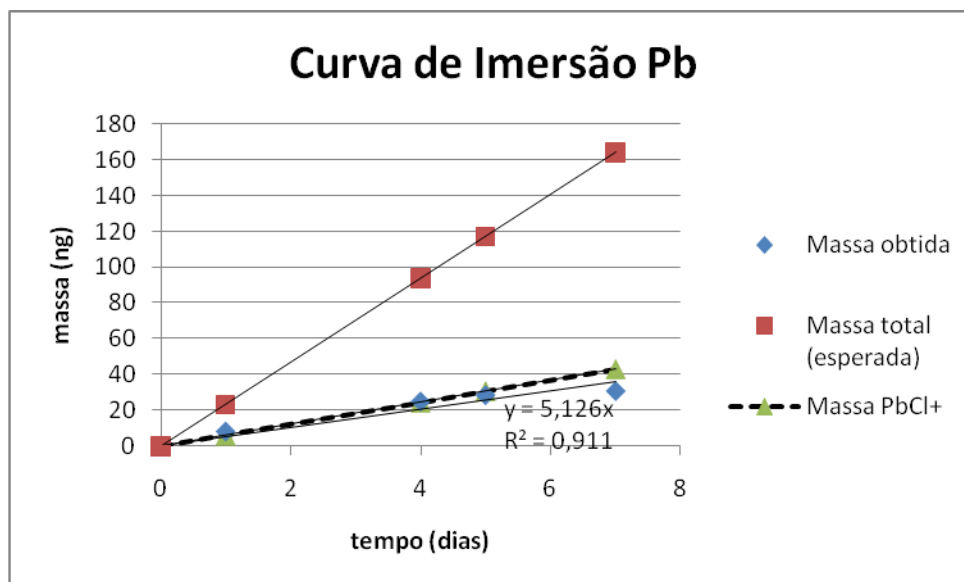
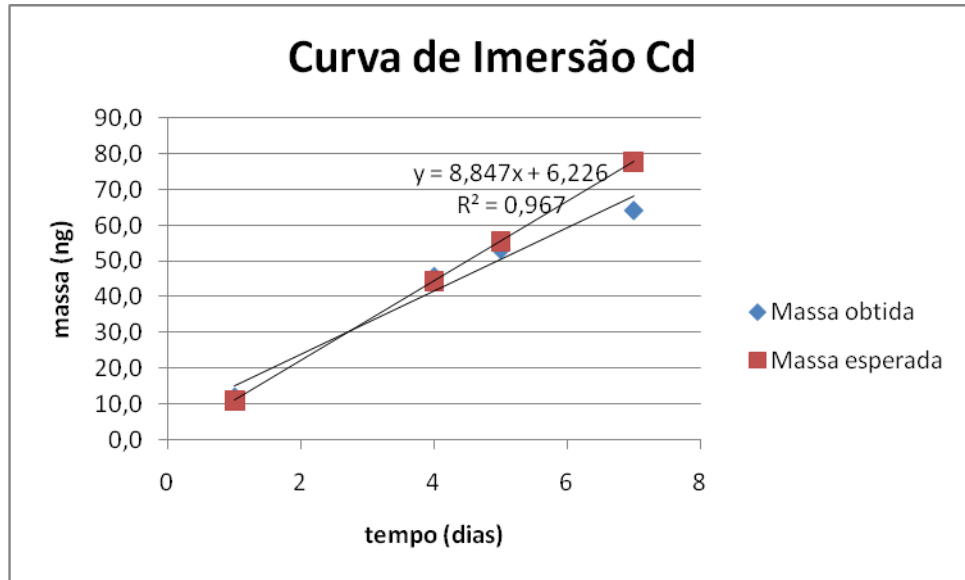


Figura 24. Curva de imersão contendo a Massa total (esperada) e obtida de Cd em função do tempo de imersão para água do mar contendo $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd (pH = 7,66). Os amostradores foram montados utilizando-se 2 discos de Papel Cromatográfico 3MM (0,92 mm) e discos contendo 20% (m / v) de S. cerevisiae e 3% (m/v) de agarose. Temperatura=23°C.



5.3. Comparação entre as concentrações de Cd, Pb, Zn, Cu e Ni obtidas com gel difusivo e restritivo na amostra de água de mar

As Tabelas 4-8 apresentam a comparação das concentrações determinadas pela técnica DGT utilizando agentes difusivos e restritivos. Para essa comparação foram adotadas somente as concentrações das imersões a partir de 6 dias para longos períodos, de modo a minimizar possíveis interferências causadas por contaminação ou baixa pré-concentração nas imersões realizadas para períodos menores.

Tabela 4. Concentrações de Cd em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT

Tempo (dias)	Concentrações	Concentrações
	obtidas com gel difusivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	obtidas com gel restritivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
7	0,01	0,01
8	0,09	0,02
9	0,004	0,05
14	0,003	0,004
Média $\pm$ IC	0,03 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,04
(Intervalo de Confiança)		

Tabela 5. Concentrações de Pb em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT

Tempo (dias)	Concentrações	Concentrações
	obtidas com gel difusivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	obtidas com gel restritivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
6	0,04	0,07
7	0,15	0,05
8	0,06	0,10
14	0,06	0,07
Média $\pm$ IC (Intervalo de Confiança)	0,08 $\pm$ 0,08	0,07 $\pm$ 0,03

Tabela 6. Concentrações de Zn em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT

Tempo (dias)	Concentrações	Concentrações
	obtidas com gel difusivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	obtidas com gel restritivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
6	2,30	3,92
7	3,08	2,65
9	2,52	3,29
14	2,49	3,10
Média $\pm$ IC (Intervalo de Confiança)	2,60 $\pm$ 0,54	3,24 $\pm$ 0,84

Tabela 7. Concentrações de Cu em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT

Tempo (dias)	Concentrações	Concentrações
	obtidas com gel difusivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	obtidas com gel restritivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
7	0,05	0,08
8	0,04	0,06
9	0,03	0,10
14	0,08	0,07
Média $\pm$ IC (Intervalo de Confiança)	0,05 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,03

Tabela 8. Concentrações de Ni em amostras de água de mar determinada pela técnica DGT

Tempo (dias)	Concentrações	Concentrações
	obtidas com gel difusivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	obtidas com gel restritivo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
6	0,07	0,09
7	0,09	0,07
8	0,12	0,14
14	0,08	0,10
Média $\pm$ IC (Intervalo de Confiança)	0,09 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,05

Para a averiguação da existência e significância de compostos orgânicos na amostra de água de mar, foram realizadas comparações entre as concentrações obtidas para o agente restritivo e difusivo, através da comparação dos valores dos intervalos de confiança (IC) com significância de 95%.

Para os resultados apresentados (Tabelas 4-8), pode-se interpretar que as frações orgânicas e inorgânicas dos analitos presentes na amostra de água de mar não são significativamente diferentes, demonstrando portanto que não há quantidades significativas de compostos orgânicos na amostra.

As baixas concentrações dos analitos presentes na amostra de água de mar e o curto período de imersão contribuíram para uma baixa pré-concentração e maior susceptibilidade a ocorrência de contaminações nos primeiros dias da realização do experimento, mesmo assim, esses fatores não foram limitantes para a obtenção do resultado final. Deste modo, as concentrações determinadas para os primeiros dias (1,2 e 3 dias) não foram utilizadas para a avaliação das frações orgânicas e inorgânicas através das concentrações obtidas para o agente restritivo e difusivo. Além disso as concentrações para alguns dias também não foram consideradas, devido a contaminações pontuais.

As contaminações podem ter ocorrido durante o manuseio dos dispositivos e dos géis, ou também ter sido provenientes dos tubos de centrífuga e frascos utilizados nos experimentos.

5.4 Comparação entre as concentrações de Cd, Pb, Zn, Cu e Ni obtidas com gel difusivo e restritivo na técnica DGT e concentrações através de determinação direta da amostra de água de mar.

Tabela 9. Comparação entre as concentrações totais dos analitos na amostra e as obtidas com o DGT

Elementos	Amostra de água de mar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentrações médias obtidas com o DGT ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ni	<0,70*	$0,10 \pm 0,008$
Cu	<1,67	$0,06 \pm 0,023$
Zn	<2,86	$2,92 \pm 0,456$
Cd	<0,33	$0,02 \pm 0,005$
Pb	<0,47	$0,08 \pm 0,006$

*: Limites de quantificação (10σ)

Para todos os elementos de estudo a concentração total determinada apresentou resultados abaixo do limite de quantificação (LQ) para o ICP MS.

As baixas concentrações dos analitos presentes na amostra de estudo e a necessidade de diluição da amostra em 10 vezes para que o teor de sódio (3% m/v) presente na água do mar não cause interferências significativas nas determinações das concentrações totais de metais por ICP MS, resulta em uma concentração dos analitos muito inferior aos valores presentes na amostra e pré-concentrados através da técnica DGT.

Com a realização da diluição, as concentrações totais obtidas para os metais de estudo apresentaram-se abaixo do limite de quantificação (LQ) do ICP MS (Tabela 9). A pré-concentração promovida pela DGT possibilita a determinação da concentração para menores limites de quantificação. Uma vez que o agente ligante da técnica DGT acumula a massa dos analitos durante um período de tempo (pré-concentração), é possível determinar concentrações traços e ultra-traços.

Deste modo, como apresentado na Tabela 9, as concentrações determinadas pela DGT encontram-se abaixo LQ para a concentração total determinada diretamente por ICP MS, indicando concordância entre as determinações através das duas técnicas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho mostraram que mesmo em amostras contendo baixas concentrações de metais, a técnica DGT pode ser utilizada com sucesso para a determinação das concentrações dos analitos em águas marinhas, tanto para a vertente convencional (Cd, Cu, Ni, Pb e Zn), como para a vertente alternativa (Pb e Cd). Para o agente ligante alternativo, os resultados das imersões sugeriram que a parte do Pb na amostra não se encontra na forma lábil e que o mecanismo de adsorção do Pb pela *S. Cerevisiae* ocorre principalmente devido a troca iônica.

As análises das frações orgânicas e inorgânicas da amostra indicaram que, para todos os analitos, as concentrações determinadas com os dispositivos contendo os agentes difusivo e restritivo não são significativamente diferentes. A partir deste resultado, pode-se concluir que não há frações significativas de compostos orgânicos na amostra.

Deste modo, pode-se concluir que a técnica DGT, em sua vertente convencional e alternativa, é efetiva para a determinação e fracionamento químico de Cd, Cu, Ni, Pb e Zn em amostras de água de mar sujeitas a emissários marinhos, podendo o seu uso ser estendido para o estudo da determinação desses metais *in situ*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALMEIDA, E., NASCIMENTO FILHO, V. F. ; SENICATO, L. ; MENEGÁRIO, A. A. Utilização das técnicas de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF) para a determinação de Ca, Mn, Co, Ni, Cu, Zn e Pb em águas fluviais. Anais do 1o Encontro Brasileiro sobre Especiação Química (EspeQBrasil-2008), v. 1, 2008.
2. BAG, H., LALE, M., TURKER, A.R. Determination of iron and nickel by flame atomic absorption spectrophotometry after preconcentration on *Saccharomyces cerevisiae* immobilized sepiolite. Talanta, v. 47, p. 689-696, 1998.
3. BAG, H., LALE, M., TURKER, A.R. Determination of Cu, Zn and Cd in water by FAAS after preconcentration by baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) immobilized on sepiolite. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, v. 363, p. 224-230, 1999.
4. BAG, H., LALE, M., TURKER, A.R., TUNCELI, A. Separation and speciation of Cr(III) and Cr(VI) with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite and determination of both species in water by FAAS. Talanta, v. 51, p. 895-902, 2000.
5. BISCARO, P.A., MENEGÁRIO, A.A., TONELLO, P.S. Pré-concentração de cádmio com *Saccharomyces cerevisiae* e determinação em águas fluviais usando espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Química Nova, v. 30, p. 323-326, 2007.
6. CALDORIN, R., MENEGÁRIO, A.A. Speciation analysis of Sn(II) and Sn(IV) using baker's yeast and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Microchimica Acta, v. 157, p. 121-128, 2006.
7. DING S., Xu, D., SUN, Q., YIN, H., ZHANG, C. Measurement of dissolved reactive phosphorus using the diffusive gradients in thin films technique with a high-capacity binding phase. Environmental Science & Technology, v. 44, p. 8169-8174, 2010.
8. GARMO, O.A., ROYSET, O., STEINNES, E., FLATEN, T.P. Performance Study of Diffusive Gradients in Thin Films for 55 Elements. Analytical Chemistry, v. 75, p. 3573-3580, 2003.
9. KOH, J., KWON, Y., PAK, Y. Separation and sensitive determination of arsenic species (As³⁺/As⁵⁺) using the yeast immobilized column and hydride generation in ICP AES. Microchemical Journal, v. 80, p. 195-199, 2005.

10. MADRID, Y., CABRERA, C., PÉREZ-CORONA, T., CÁMARA, C. Speciation of methylmercury and Hg(II) using bakers-yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*) – Determination by continuous- flow mercury cold vapor generation atomic-absorption spectrometry. Analytical Chemistry, v. 67, p. 750-754, 1995.
11. MAQUIEIRA, A., ELMAHADI, H.A.M., PUCHADES R. Use of *Saccharomyces cerevisiae* in flow injection atomic absorption spectrometry for trace metal concentration. Analytical Chemistry, v. 66, p. 1462-1467, 1994.
12. MENEGÁRIO, A.A., SILVA, A.J., POZZI, E., DURRANT, S.F., ABREU JR, C.H. On-line determination of Sb(III) and total Sb using baker s yeast immobilized on polyurethane foam and hydride generation inductively coupled plasma optical emission spectrometry Spectrochimica Acta, v. 61 B, p. 1074-1079, 2006.
13. MENEGÁRIO, A.A., SMICHOWSKI, P., POLLA, G. On-line preconcentration and speciation analysis of Cr(III) and Cr(VI) using baker's yeast cells immobilized on controlled pore glass. Analytical Chimica Acta, v. 546, p. 244-250, 2005.
14. MENEGÁRIO, A.A., TONELLO, P.S., BISCARO, P.A., BROSSI-GARCIA, A.L. Determination of Cd(II) and Cd-metallothioneins in biological extracts using baker's yeast and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Microchimica Acta, v. 159, p. 247-254, 2007.
15. MENEGÁRIO, A.A., TONELLO, P.S., DURRANT, S.F. Use of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gel as a binding agent for diffusive gradients in thin films. Analytica Chimica Acta, v. 683, p. 107-112, 2010.
16. PANTHER, J. G., TEASDALE, P. R., BENNET, W. W., WELSH, D. T., ZHAO, H. Titanium dioxide-based DGT technique for in situ measurement of dissolved reactive phosphorus in fresh and marine waters. Environmental Science Technology, v. 44, p. 9419-9424, 2010.
17. PÉREZ-CORONA, T., MADRID, Y., CÁMARA, C., BECEIRO, E. Living organism as an alternative to hyphenated techniques for metals speciation. Evaluation of baker's yeast immobilized on silica gel for Hg speciation. Spectrochimica Acta, v. 53B, p. 321-329, 1998.
18. PÉREZ-CORONA, T., MADRID, Y., CÁMARA, C. Evaluation of selective uptake of selenium (Se(IV) and Se(VI)) and antimony (Sb(III) and Sb(V)) species by baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). Analytica Chimica Acta, v. 345, p. 249-255, 1997.
19. PESCI, G. F., MARRACH, G., VANNUCI, M.S., SOUZA, L.A., MENEGÁRIO, A.A. Speciation of lead in sea and river waters by using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gel as a binding agent in DGT technique. Bioanalytical and Analytical Chemistry. Submetido, 2011.

20. STARK, J.S., JOHNSTONE, G.J., PALMER, A.S., SNAPE, I., LANER, B.L., RIDDLE, M.J. Monitoring the remediation of a near shore waste disposal site in Antarctica using the amphipod *Paramoera walkeri* and diffusive gradients in thin films (DGTs). Marine Pollution Bulletin, v. 52, p. 1595-1610, 2006.
21. SCHINTU, M., DURANTE, L., MACCIONI, A., MELONI, P., DEGETTO, S., CONTU, A. Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. Marine Pollution Bulletin, v. 57, p. 832-837, 2008.
22. SCHINTU, M., MARRAS, B., DURANTE, L., MELONI, P., CONTU, A. Macroalgae and DGT as indicators of available trace metals in marine coastal waters near a lead–zinc smelter Environmental Monitoring and Assessment, v. 167, 653-661, 2010.
23. SHERWOOD, J. E., BARNETT, D., BARNETT, N. W., DOVER, K., HOWITT, J., Li, H., KEW, P., MONDON, J. Deployment of DGT units in marine waters to assess the environmental risk from a deep sea tailings outfall. Analytica Chimica Acta, v. 652, p. 215-223, 2009.
24. SLAVEYKOVA, V. I., KARADJOVA, I. B., KARADJOV, M., TSALEV, D. L. Trace Metal Speciation and Bioavailability in Surface Waters of the Black Sea Coastal Area Evaluated by HF-PLM and DGT. Environmental Science & Technology, v. 43, p. 1798-1803, 2009.
25. SMICHOWSKI, P., MARRERO, J., LEDESMA, A., POLLA, G., BATISTONE, D.A. Speciation of As(III) and As(V) in aqueous solution using baker's yeast and hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometric determination. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, v. 15, p. 1493-1497, 2000.
26. WALLNER-KERSANACH, M., DE ANDRADE C. F. F., ZHANG, H., MILANIA, M. R., NIENCHESK, L. F. H. In situ Measurement of Trace Metals in Estuarine Waters of Patos Lagoon using Diffusive Gradients in Thin Films (DGT). Journal of Brazilian Chemical Society, v. 20, p. 333-340, 2009.
27. ZHANG, H., DAVISON, W. Performance characteristics of the technique of diffusion gradients in thin-films (DGT) for the measurement of trace metals in aqueous solution. Analytical Chemistry, v. 67, p. 3391-3400, 1995.