

IMPORTÂNCIA DA ESPECIAÇÃO DE METAIS NA AVALIAÇÃO DO SEU IMPACTO NA SAÚDE HUMANA – DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS VOLTAMÉTRICAS COM ELÉCTRODOS DE FILME DE BISMUTO

Fernanda Leal

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia – UP
fleal@ufp.edu.pt

Rita Catarino

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia – UP
ritacat@ufp.edu.pt

Adriana Pimenta

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
REQUIMTE, Faculdade de Farmácia – UP
apimenta@ufp.edu.pt

Renata Souto

Professora Associada
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa
rsouto@ufp.edu.pt

COMO REFERENCIAR ESTE ARTIGO: LEAL, Fernanda [et al.] - Importância da especiação de metais na avaliação do seu impacto na saúde humana – desenvolvimento de metodologias voltamétricas com eléctrodos de filme de bismuto. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto : Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480. 6 (2009) 220-230.

RESUMO

A voltametria de redissolução com eléctrodos de filme de mercúrio (MFEs) constitui uma ferramenta poderosa para a monitorização de metais vestigiais. Recentemente, os eléctrodos de filme de bismuto (BFEs) apareceram como uma alternativa vantajosa, apresentando uma toxicidade negligenciável para o ambiente. Neste trabalho são propostas duas novas metodologias (em *batch* e em fluxo), que se baseiam na realização de voltametria de redissolução anódica com BFEs, aplicadas à determinação de dois metais de elevada toxicidade (cádmio (Cd) e chumbo (Pb)).

PALAVRAS-CHAVE

Metais, chumbo, cádmio, voltametria de redissolução, filme de bismuto, análise em fluxo.

ABSTRACT

Stripping voltammetry with mercury film electrodes (MFEs) is a powerful tool to monitor trace metal concentrations. Recently, bismuth film electrodes (BFEs) appeared as an attractive alternative, exhibiting negligible toxicity to the environment. In this study, two new methodologies (batch and flow) are proposed based on anodic stripping voltammetry with BFEs, applied to the determination of two highly toxic metals (cadmium (Cd) and lead (Pb)).

KEYWORDS

Metals, lead, cadmium, stripping voltammetry, bismuth film, flow analysis.

1. INTRODUÇÃO

Os metais são constituintes naturais da crosta terrestre. Por norma encontram-se na forma inorgânica, sendo, no entanto, possível a sua combinação com compostos orgânicos. A exposição ambiental do ser humano, e dos ecossistemas em geral, resulta de fenómenos naturais como a actividade vulcânica, erosão e bioacumulação, e de alguns fenómenos antropogénicos como a combustão fósil, incineração e indústria mineira (Caussy *et al.*, 2003).

Os metais entram no organismo humano principalmente através da inalação – ar/poeiras, e da ingestão – alimentos/água (Caussy *et al.*, 2003). Ao nível dos pulmões ou do tracto gastrointestinal, uma fracção do metal é absorvido e o restante é exalado ou excretado. A quantidade absorvida depende parcialmente de factores relacionados com o hospedeiro (Burger *et al.*, 2003; Caussy *et al.*, 2003), encontrando-se também intimamente relacionada com a natureza do metal em questão e com as formas químicas em que o mesmo se encontra (Yokel *et al.*, 2006).

Existem metais, como o cálcio, o potássio, o magnésio e o sódio, que são indispensáveis ao nosso organismo e necessários em grandes quantidades. Outros, como o cobalto, crómio, cobre, ferro, molibdénio, manganês, selénio e zinco, são também considerados essenciais para a saúde humana, mas apenas em quantidades vestigiais. Quando a sua concentração ultrapassa determinados limites pode surgir toxicidade bastante significativa (World Health Organization, 1996). Metais como o cádmio (Cd), mercúrio (Hg), e chumbo (Pb), são muito tóxicos e até à data não têm função conhecida (Caussy *et al.*, 2003; Yokel *et al.*, 2006).

A análise da concentração do metal total numa amostra não dá informação suficiente para prever a respectiva toxicidade. Por exemplo, os metais e semi-metais existentes em formas insolúveis só poderão entrar na cadeia alimentar e causar dano se forem convertidos em compostos solúveis e biodisponíveis (Leal, 1996). Assim sendo, a forma química (*i.e.* espécie) pode influenciar a toxicocinética e toxicodinâmica do mesmo e deve ser considerada para melhorar a avaliação do risco na saúde humana.

Apesar de não existir uma definição uniformemente aceite para especiação metálica, em 2000 a IUPAC recomendou as seguintes definições (Templeton *et al.*, 2000): (i) Espécie química (para um elemento): “Forma específica de um elemento definido como composição isotópica, estado electrónico ou de oxidação, e/ou estrutura complexante ou molecular”, (ii) Análise da especiação (em química): “Actividades analíticas de identificação e/ou medição das quantidades de uma ou mais espécies químicas individuais numa amostra”, e (iii) Especiação (em química): “Distribuição de um elemento entre as espécies químicas definidas num sistema”. Os factores que influenciam a especiação de metais incluem: (1) processos mediados por transportador para espécies metálicas específicas, (2) estado de valência, (3) tamanho da partícula, (4) natureza dos ligandos complexantes do metal, (5) metal orgânico vs. inorgânico, e (6) biotransformação da espécie metálica (Yokel *et al.*, 2006).

Tem sido extremamente difícil encontrar técnicas analíticas que sejam suficientemente sensíveis e selectivas para medir a especiação de metais vestigiais. Os métodos electroquímicos apresentam uma grande vantagem sobre a maioria das outras técnicas analíticas, uma vez que provocam uma perturbação mínima do sistema durante a medição. De entre estes, destaca-se a voltametria que pode dar informação significativa sobre a especiação química de um elemento, uma vez que a resposta electroquímica é característica da espécie detectada (Leal, 2000). A voltametria de redissolução, que combina uma etapa de preconcentração com uma

etapa de medição electroquímica dos analitos acumulados, é uma ferramenta poderosa para a monitorização de metais vestigiais em diversas amostras (Economou, 2005; Wang, 2006). Nas últimas 2 décadas os eléctrodos de filme de mercúrio (MFEs), preparados pelo revestimento de um material apropriado (como o carbono vítreo, fibra de carbono, pasta de carbono, entre outros) com um filme de Hg metálico, têm sido usados como suporte às técnicas de voltametria de redissolução devido à sua elevada reprodutibilidade e sensibilidade.

Tendo por base as referidas técnicas electroanalíticas foram desenvolvidos modelos para a avaliação da toxicologia aquática que se focam na actividade do ião-livre e que indicam que a severidade da resposta adversa está geralmente relacionada com a estabilidade do complexo metal-ligando (Leal *et al.*, 1999; Mucha *et al.*, 2003; Vasconcelos e Leal, 2001 e 2008; Vasconcelos *et al.*, 2002). Estes modelos devem agora ser utilizados para relacionar a especiação metálica com a avaliação do risco para a saúde humana. (Yokel *et al.*, 2006).

Neste trabalho são propostas duas novas metodologias, uma em *batch* e outra em fluxo, que se baseiam na realização de voltametria de redissolução anódica com um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo revestido com filme de bismuto (Bi), aplicadas à determinação, e especiação, de dois metais de elevada toxicidade (Cd e Pb).

O eléctrodo de filme de bismuto (BFE) foi proposto pela primeira vez em 2000, como uma alternativa aos MFEs (Wang *et al.*, 2000). Os BFEs são preparados pela deposição de um filme de Bi, em vez de Hg, num material apropriado. O Bi forma ligas com metais pesados, que são análogas às amálgamas que o Hg forma, e para além disso revela uma insensibilidade ao oxigénio dissolvido, permitindo uma larga janela de potencial para a análise (Jia *et al.*, 2008). No entanto, a vantagem mais significativa dos BFEs é que são “amigos do ambiente”, uma vez que a toxicidade do Bi e seus sais é negligenciável, ao contrário da extrema toxicidade do Hg e sais de Hg usados na preparação dos MFEs (Economou, 2005). Recentemente, encontram-se descritos na literatura científica alguns trabalhos visando a determinação de metais por voltametria de redissolução em BFEs (Economou e Voulgaropoulos, 2007; Hutton *et al.*, 2006; Legeai *et al.*, 2006), sendo no entanto escassos os trabalhos desenvolvidos tendo em vista a especiação dos mesmos em BFEs (Alberich, 2009).

O acoplamento destas técnicas electroquímicas a sistemas de fluxo apresenta-se também como uma mais-valia dado que permite uma redução do consumo de reagentes e amostras, uma diminuição do tempo de análise e uma minimização da manipulação das amostras (Economou e Voulgaropoulos, 2007).

Neste artigo serão abordados os estudos de optimização das condições experimentais, nomeadamente no que se refere à electrodeposição do filme de Bi, em *batch* e em fluxo, e à determinação de Cd e Pb a diferentes valores de pH, incluindo ao pH fisiológico.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Foram utilizados reagentes de qualidade *p.a.* ou semelhante e água purificada por sistema Milli Q (condutividade específica = $0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) na preparação de todas as soluções e nas diluições das amostras.

Nos estudos conduzidos em *batch* e em fluxo foram usadas as soluções de tampão acetato (0,10 M, pH = 4,5) e fosfato (0,25 M, pH = 7,4), as quais funcionaram como soluções transportadoras no sistema de análise por injeção de fluxo (FIA).

As soluções de Bi, Cd e Pb foram preparadas por diluição apropriada de uma solução stock 1000 mg l⁻¹ (Fluka) em tampão acetato ou em tampão fosfato.

2.2. INSTRUMENTAÇÃO

2.2.1. SISTEMA BATCH

As determinações voltamétricas foram efectuadas num potencióstato Ecochimie / Autolab modelo μ Autolab Type III, ao qual foi acoplado um Stand da Metrohm 663 VA. O eléctrodo de trabalho, onde foi depositado o filme de Bi, foi de carbono vítreo com um diâmetro de disco de 2 mm. Como eléctrodo de referência usou-se um eléctrodo de AgCl/Ag (KCl, 3,0 M). O eléctrodo auxiliar foi de carbono vítreo. Durante as etapas de deposição as soluções foram agitadas com um eléctrodo rotativo de politetrafluoretileno (PTFE) a 2500 rpm. O potencióstato foi controlado por um computador.

2.2.2. SISTEMA FIA

No sistema FIA desenvolvido, as soluções foram impulsionadas por uma bomba peristáltica Gilson Miniplus 3, e a movimentação da célula electroquímica foi alcançada através de um injector-comutador de configuração circular e funcionamento idêntico ao anteriormente descrito por Krug e colaboradores (1986) com funcionamento longitudinal. Toda a tubagem foi construída com tubo de Teflon Omnifit de diâmetro interno de 0,8 mm. A Figura 1 representa esquematicamente o sistema FIA desenvolvido. A célula electroquímica de configuração tubular (Figura 2) apresentava um corpo de Perspex, no qual o eléctrodo de trabalho (Fig. 2, E_w) e o eléctrodo auxiliar (Fig. 2, E_{aux}) foram introduzidos. Ambos apresentavam configuração tubular e foram construídos como descrito previamente (Catarino, 2002). Como eléctrodo de referência (Fig. 2, E_{ref}) usou-se um eléctrodo da Metrohm, modelo 6.0727.000, de AgCl/Ag (KCl, 3,0 M). As determinações voltamétricas foram efectuadas no mesmo potencióstato já descrito para as determinações em *batch*.

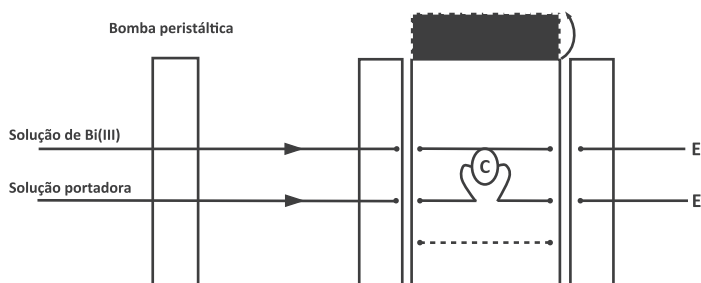


Figura 1. Representação esquemática do injector-comutador e da montagem FIA com detecção multilocalizada para a determinação de cádmio e chumbo: C – célula electroquímica; E – esgoto.

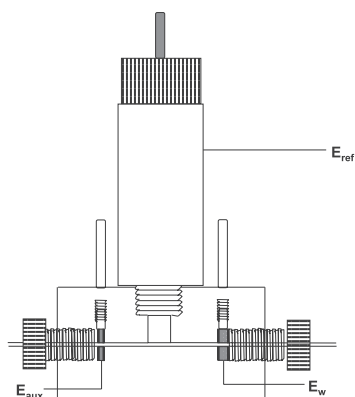


Figura 2. Representação esquemática do detector voltamétrico de configuração tubular: E_w – eléctrodo de trabalho de carbono vítreo; E_{aux} – eléctrodo auxiliar de carbono vítreo; E_{ref} – eléctrodo de referência de AgCl/Ag (KCl, 3,0 M).

2.3 DETERMINAÇÕES VOLTAMÉTRICAS DO BI, CD E PB

No início de cada dia de trabalho, o eléctrodo de trabalho foi polido manualmente por fricção da sua superfície com pó de alumina (Buehler 40-6603-030-016), tendo o material residual sido removido por passagem abundante de água desionizada.

As determinações voltamétricas em *batch* foram efectuadas pipetando 25 ml de solução numa célula voltamétrica. A solução foi purgada durante 5 minutos com azoto livre de O_2 . A etapa de deposição foi efectuada a um determinado potencial com agitação. A agitação foi desligada durante um período de 10 s. Finalmente, um varrimento de potencial foi efectuado.

No sistema FIA, a etapa de deposição foi efectuada ao caudal optimizado ($0,5 \text{ ml min}^{-1}$). Posteriormente o fluxo foi interrompido e 10 s após foi efectuado o varrimento de potencial.

Os parâmetros de varrimento usados foram: voltametria de onda quadrada, frequência de 10 Hz, amplitude de 0,01 V (sistema FIA) e 0,05 V (sistema *batch*) e degrau de variação de potencial de 0,025 V.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. OPTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE DEPOSIÇÃO DO FILME DE BI NO ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO

A optimização das condições de deposição do filme de Bi foi efectuada, numa primeira fase, em sistema FIA e numa solução de Bi 5 mg L^{-1} em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) (Rodríguez *et al.*, 2007). O sistema FIA desenvolvido (Figura 1) teve por base o conceito de multilocalização do detector (Zagatto *et al.*, 1992), sendo constituído por dois canais de fluxo independentes e permitindo a movimentação da célula electroquímica livremente entre os referidos canais. Tal opção traduziu-se numa vantagem ao permitir que a etapa de electrodeposição do filme de Bi e a etapa de preconcentração e determinação dos analitos se pudesse reali-

zar em meios diferentes, sem que tal implicasse a renovação de toda a solução contida no interior do sistema (nomeadamente a contida no tubo de impulsão que passa pela bomba peristáltica) – o que seria obrigatório no caso de um sistema FIA monocanal.

Durante os estudos de optimização variou-se o potencial de deposição (E_d) entre -0,5 e -1,5 V e o tempo de deposição (t_d) entre 30 e 180 s. Verificou-se que a intensidade de corrente obtida, quando se fez o varrimento anódico para o Bi, aumentou com a diminuição do E_d até -1,4 V, valor após o qual se registou uma diminuição do sinal analítico (Figura 3). Variando o t_d , verificou-se que a intensidade de corrente aumentou com o t_d até 90 s, tendo diminuído para t_d superiores. Estes dois parâmetros (E_d e t_d) foram igualmente avaliados no sistema *batch* e os resultados obtidos foram semelhantes. Conclui-se então que um E_d de -1,4 V e um t_d de 90 s são as condições óptimas para a deposição de um melhor filme de Bi no carbono vítreo.

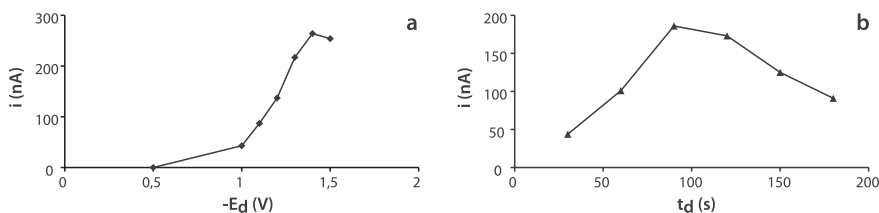


Figura 3. Efeito do (a) potencial de deposição (E_d) e do (b) tempo de deposição (t_d) na intensidade de corrente (i) de uma solução de Bi 5 mg L⁻¹ em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5), em sistema FIA.

Para o sistema de fluxo procedeu-se ainda à optimização do caudal (0,2 e 0,8 ml min⁻¹) tendo-se verificado um aumento do sinal analítico com o aumento do caudal até 0,5 ml min⁻¹. Para valores de caudais superiores, a intensidade de corrente permanecia praticamente constante. Este parâmetro foi optimizado em 0,5 ml min⁻¹, valor que permitia uma intensidade de corrente máxima com um menor consumo de solução.

3.2. FILME DE BI EM TAMPÃO ACETATO VS. TAMPÃO FOSFATO

Tendo em consideração futuras aplicações da metodologia, nomeadamente a determinação de metais em amostras biológicas e, ponderando a possibilidade de encurtar o tempo de análise recorrendo a uma deposição *in situ* do filme de Bi, procedeu-se, numa segunda fase, ao estudo da electrodeposição do Bi usando uma solução de Bi 5 mg L⁻¹ em tampão fosfato 0,25 M (pH 7,4). Todos os restantes parâmetros previamente optimizados foram mantidos constantes. Verificou-se que a intensidade de corrente obtida para o Bi diminuiu bastante em tampão fosfato comparada com a obtida em tampão acetato (Figura 4), ocorrendo um deslocamento do pico do Bi para valores de potencial mais negativos (de ~ -0,2 V para ~ -0,3 V). Estes resultados foram semelhantes quer no sistema *batch* quer no sistema FIA. Tais resultados experimentais permitem antever que uma deposição *ex situ* do filme de Bi se revelará vantajosa, quando as determinações a efectuar se realizem a pH fisiológico.

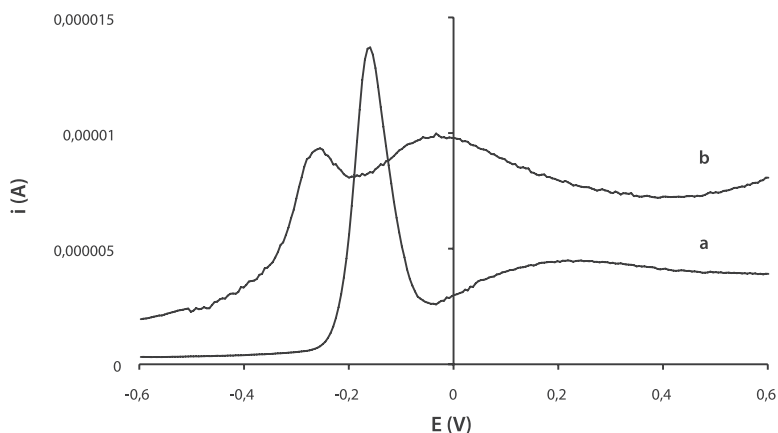


Figura 4. Voltamogramas de uma solução de Bi 5 mg L^{-1} em (a) tampão acetato $0,10 \text{ M}$ (pH 4,5) e em (b) tampão fosfato $0,25 \text{ M}$ (pH 7,4), em sistema de batch. Parâmetros de deposição: tempo de deposição (t_d) = 90 s; potencial de deposição (E_d) = $-1,4 \text{ V}$. Parâmetros de varrimento: voltametria de onda quadrada; frequência = 10 Hz; amplitude = $0,05 \text{ V}$; degrau de variação de potencial = $0,025 \text{ V}$.

3.3. OPTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CD E PB EM TAMPÃO ACETATO VS. TAMPÃO FOSFATO NO ELÉCTRODO DE CARBONO VÍTREO REVESTIDO COM FILME DE BI

A optimização das condições de deposição simultânea do Cd e Pb, num eléctrodo de carbono vítreo previamente revestido com filme de Bi, em sistema batch, foi efectuada numa solução de Cd e Pb $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em tampão acetato $0,10 \text{ M}$ (pH 4,5). A deposição prévia do filme de Bi foi efectuada numa solução de Bi 5 mg L^{-1} em tampão acetato $0,10 \text{ M}$ (pH 4,5) usando as condições previamente optimizadas ($E_d = -1,4 \text{ V}$ e $t_d = 90 \text{ s}$).

Variou-se o potencial de deposição (E_d) do Cd e Pb entre $-0,9 \text{ V}$ e $-1,4 \text{ V}$. Verificou-se que as melhores intensidades de correntes para os picos do Cd e Pb, após o varrimento anódico, eram obtidas usando um $E_d = -1,0 \text{ V}$. Estes resultados confirmam a opção tomada de deposição *ex situ* do filme de Bi, permitindo que a deposição do Bi seja efectuada a $E_d = -1,4 \text{ V}$ e a deposição do Cd e Pb a $E_d = -1,0 \text{ V}$. A possibilidade da deposição *in situ* fica bastante comprometida, se o objectivo for a medição de quantidades vestigiais destes metais. Para a confirmação destes resultados, repetiu-se o procedimento fazendo a deposição do Cd e Pb *in situ* com o Bi a $E_d = -1,4 \text{ V}$ e obtiveram-se intensidades de correntes para os picos dos metais bastante inferiores (Figura 5).

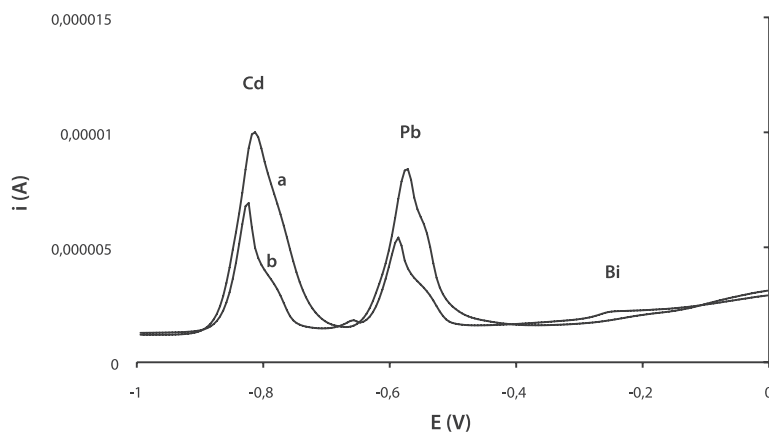


Figura 5. Voltamogramas de uma solução de Cd e Pb $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em tampão acetato $0,10 \text{ M}$ (pH 4,5) com deposição (a) *ex situ* e (b) *in situ* de Bi 5 mg L^{-1} , em sistema *batch*. Parâmetros de deposição: tempo de deposição (t_d) = 30 s (a) e 90 s (b); potencial de deposição (E_d) = $-1,4 \text{ V}$. Parâmetros de varrimento: voltametria de onda quadrada; frequência = 10 Hz; amplitude = $0,05 \text{ V}$; degrau de variação de potencial = $0,025 \text{ V}$.

Após a otimização da determinação simultânea de Cd e Pb efectuada em tampão acetato $0,10 \text{ M}$ (pH 4,5) repetiu-se o mesmo procedimento em tampão fosfato $0,25 \text{ M}$ (pH 7,4). Os resultados (Figura 6) mostram que a técnica é mais sensível em tampão acetato, mas a determinação em tampão fosfato também é possível para quantidades vestigiais de Cd e Pb, desde que se aumente o t_d .

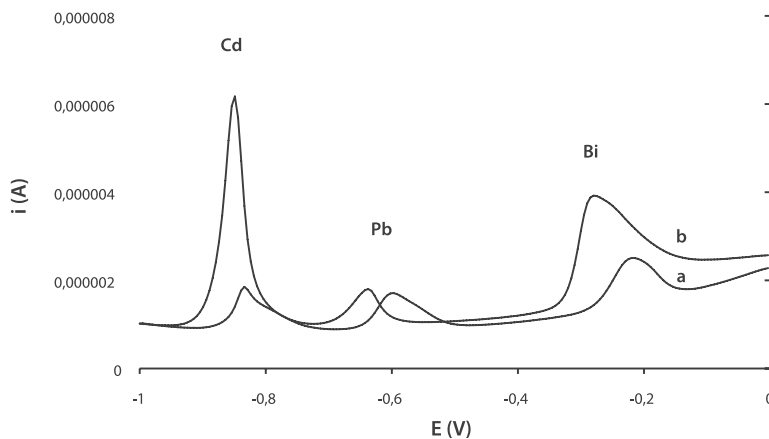


Figura 6. Voltamogramas de uma solução de Cd e Pb (a) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em tampão acetato $0,10 \text{ M}$ (pH 4,5) e (b) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,25 \text{ M}$ (pH 7,4), com deposição *ex situ* de Bi 5 mg L^{-1} , em sistema *batch*. Parâmetros de deposição: tempo de deposição (t_d) = 30 s (a) e 300 s (b); potencial de deposição (E_d) = $-1,0 \text{ V}$. Parâmetros de varrimento: voltametria de onda quadrada; frequência = 10 Hz; amplitude = $0,05 \text{ V}$; degrau de variação de potencial = $0,025 \text{ V}$.

4. CONCLUSÕES

O trabalho até agora desenvolvido permitiu a optimização de metodologias de voltametria de redissolução anódica, uma em *batch* e outra em fluxo, com um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo revestido com filme de Bi, capaz de determinar Cd e Pb a níveis compatíveis com os existentes em amostras biológicas (10 e 100 $\mu\text{g l}^{-1}$).

No que se refere à electrodeposição do filme de Bi, concluiu-se que um E_d de -1,4 V e um t_d de 90 s em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5) são as condições óptimas para a deposição de um melhor filme de Bi no carbono vítreo, tanto em sistema FIA como em sistema *batch*.

Em relação à determinação de Cd e Pb, verificou-se que as melhores intensidades de correntes para os picos do Cd e Pb, após o varrimento anódico, eram obtidas usando um $E_d = -1,0\text{V}$ em tampão acetato 0,10 M (pH 4,5).

Tais resultados experimentais permitem antever que uma deposição *ex situ* do filme de Bi se revelará vantajosa, quando as determinações a efectuar se realizem a pH fisiológico.

A montagem FIA baseada no conceito de multilocalização do detector permitiu a alternância de soluções sem comprometimento do tempo de análise e com um consumo mínimo de reagentes. Para além disso, a referida montagem permitirá em trabalhos futuros realizar de forma simples e rápida uma mudança de meio entre a etapa de deposição e a etapa de redissolução do metal, se tal se verificar necessário, tendo em vista a eliminação do efeito de possíveis compostos interferentes durante a etapa de redissolução. Por exemplo, eliminar o efeito da presença de agentes complexantes durante a etapa de redissolução do metal, realizando esta etapa num meio fortemente ácido (pH = 2,0), no qual a complexação do metal dificilmente ocorre.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERICH, A., SERRANO, N., ARINÓ, C., DIAZ-CRUZ, J.M. E ESTEBAN, M. (2009). Bismuth film electrodes for the study of metal thiolate complexation: An alternative to mercury electrodes. *In: Talanta*, 78, 3, pp. 1017-1022.
- BURGER, J., DIAZ-BARRIGA, F., MARAFANTE, E., POUNDS, J. E ROBSON, M. (2003). Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals. *In: Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, pp. 20-31.
- CATARINO, R.I.L. (2002). *Desenvolvimento de sistemas automatizados de fluxo com detecção voltamétrica multilocalizada*. Dissertação para Doutoramento em Química Analítica, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- CAUSSY, D., GOCHFELD, M., GURZAU, E., NEAGU, C. E RUEDEL, H. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability and risk. *In: Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56, pp. 32-44.
- ECONOMOU, A. (2005). Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis. *In: Trends Anal. Chem.*, 24, 4, pp. 334-340.
- ECONOMOU, A. E VOULGAROPOULOS, A. (2007). On-line stripping voltammetry of trace metals at a flow-through bismuth-film electrode by means of a hybrid flow-injection/sequential injection system. *In: Talanta*, 71, pp. 758-765.

- HUTTON, E.A., HOCEVAR, S.B., MAUKO, L. E OGOREVC, B. (2006). Bismuth film electrode for anodic stripping voltammetric determination of tin. *In: Anal. Chim. Acta*, 580, pp. 244-250.
- JIA, J., CAO, L., WANG, Z. E WANG, T. (2008). Properties of Poly (sodium 4-styrenesulfonate)-Ionic Liquid Composite Film and Its Application in the Determination of Trace Metals Combined with Bismuth Film Electrode. *In: Electroanalysis*, 20 (5), pp. 542-549.
- KRUG, F.J., BERGAMIN Fº, H. E ZAGATTO, E.A.G. (1986). Online electrolytic dissolution of alloys in flow injection analysis. 1- Principles and application in the determination of soluble aluminum in steels. *In: Anal. Chim. Acta*, 190, 1, pp. 177-184.
- LEAL, M.F.C. (1996). *Determinação de Metais Pesados em Água do Mar e Algas Macroscópicas da Costa Norte de Portugal*. Dissertação para Mestrado em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- LEAL, M.F.C. (2000). *Trace Metal Speciation in Seawater*. Dissertação para Doutoramento em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- LEAL, M.F.C., VASCONCELOS, M.T.S.D. E VAN DEN BERG, C.M.G. (1999). Copper Induced Release of Complexing Ligands Similar to Thiols by *Emiliana huxleyi* in Seawater Cultures. *In: Limnol. Oceanogr.*, 44 (7), pp. 1750-1762.
- LEGEAI, S., BOIS, S. E VITTORI, O. (2006). A copper bismuth film electrode for adsorptive cathodic stripping analysis of trace nickel using square wave voltammetry. *In: J. Electroanal. Chem.*, 591, pp. 93-98.
- MUCHA, A.P., LEAL, M.F.C., BORDALO, A.A. E VASCONCELOS, M.T.S.D. (2003). Comparison of the response of three microalgae species exposed to elutriates of estuarine sediments based on growth and chemical speciation. *In: Environ. Toxicol. Chem.*, 22 (3), pp. 576-585.
- RODRÍGUEZ, J.A., BARRADO, E., CASTRILLEJO, Y., SANTOS, J.R. E LIMA, J.L.F.C. (2007). Validation of a tubular bismuth film amperometric detector. Determination of diclofenac by multisyringe flow injection analysis. *In: J. Pharm. Biomed. Anal.*, 45, pp. 47-53.
- TEMPLETON, D.M., ARIESE, F., CORNELIS, R., DANIELSSON, L.G., MUNTAU, H., VAN LEEUWEN, H.P. E LOBISNSKI, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *In: Pure Appl. Chem.*, 72, pp. 1453-1470.
- VASCONCELOS, M.T.S.D. E LEAL, M.F.C. (2008). Exudates of different marine algae promote growth and mediate trace metal binding in *Phaeodactylum tricorutum*. *In: Mar. Environ. Res.*, 66, pp. 499-507.
- VASCONCELOS, M.T.S.D., LEAL, M.F.C. E VAN DEN BERG, C.M.G. (2002). Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliana huxleyi* in natural seawater. *In: Mar. Chem.*, 77 (2-3), pp. 187-210.
- VASCONCELOS, M.T.S.D. E LEAL, M.F.C. (2001). Adsorption and Uptake of Cu by *Emiliana huxleyi* in Natural Seawater. *In: Environ. Sci. Technol.*, 35, pp. 508-515.
- WANG, J., LU, J.M., HOCEVAR, S.B., FARIAS, P.A.M. E OGOREVC, B. (2000). Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry. *In: Anal. Chem.*, 72, pp. 3218-3222.
- WANG, J. (2006). *In: Wiley, Hoboken (Ed.). Analytical Electrochemistry*, Nova Jersey.
- WHO (World Health Organization), em colaboração com Food and Agriculture Organization of the United Nations and the International Atomic Energy Agency (1996). Trace Elements in Human Nutrition and Health. World Health Organization, Geneva.
- YOKEL, R.A., LASLEY, S.M. E DORMAN, D.C. (2006). The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *In: J. Toxicol. Environ. Health*, Part B, 9, pp. 63-85.
- ZAGATTO, E.A.G., BERGAMIN, H.F., BRIENZA, S.M.B., ARRUDA, M.A.Z., NOGUEIRA, A.R.A. E LIMA, J.L.F.C. (1992). Multisite detection in flow-analysis. 1 – Relocation of spectrophotometric detector. *In: Anal. Chim. Acta*, 261, 1-2, pp. 59-65.