

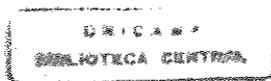
**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL**

**UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

**Ensaio de Respirometria: Monitoração do  
CO<sub>2</sub> utilizando um Sistema FIA com  
Detecção Condutométrica**

**Ana Paula Andreo**

**Campinas  
1999**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL

# Ensaio de Respirometria: Monitoração do CO<sub>2</sub> utilizando um Sistema FIA com Detecção Condutométrica

Ana Paula Andreo

Orientador: José Roberto Guimarães

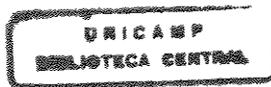
Dissertação de Mestrado apresentada à  
Comissão de pós-graduação da Faculdade de  
Engenharia Civil da Universidade Estadual de  
Campinas, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Engenharia  
Civil, na área de concentração de Saneamento  
e Ambiente.

Atesto que esta é a versão definitiva  
da dissertação/tese.

06/07/00

Prof. Dr. José Roberto Guimarães  
Matrícula: 24.561-5

Campinas, SP  
1999



200016193

UNIDADE	Be
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	An25e
V. Ex.	
TOMBO BC/	42853
PROC.	16-278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	21/10/00
N.º CPD	

CM-00147210-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

An25e      Andreo, Ana Paula  
 Ensaios de respirometria: monitoração do CO<sub>2</sub> utilizando um sistema FIA com detecção condutométrica / Ana Paula Andreo.--Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: José Roberto Guimarães.  
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil.

1. Crescimento microbiano. 2. Análise por injeção de fluxo. 3. Dióxido de carbono. 4. Biodegradação. I. Guimarães, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL

**Ensaio de Respirometria: Monitoração do CO<sub>2</sub>  
utilizando um Sistema FIA com Detecção  
Conducométrica**

**Ana Paula Andreo**

---

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:

*Jose Roberto Guimarães*

**Prof. Dr. José Roberto Guimarães**

Presidente e Orientador / Universidade Estadual de Campinas

*Edson Aparecido Abdul Nour*

**Prof. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour**

Universidade Estadual de Campinas

*Rosana Maria Alberici Oliveira*

**Dr<sup>a</sup>. Rosana Maria Alberici Oliveira**

Universidade Estadual de Campinas

Campinas, 20 de julho de 1999

---

À Giovanna,  
    Silvio,  
        Selma,  
            Ricardo.

## Agradecimentos

Ao Prof. Dr. José Roberto Guimarães (*Tuca*) pela orientação, oportunidade, estímulo e amizade durante a realização deste trabalho.

Aos amigos: Carol Farah, Naylson Maciel, Marcelo Bartolomei, Renata Martins, Sandra, Pina, Adriana Fort, Alexandre Saron, Vera Leite, Cássia Rosa, Milena, Cássia Franco, João Tito, Rodrigo Thomazini, Cecília Pereira, Eliane, Carol Stolfi, Gláucia, Maria Eugênia, Anjaína Albuquerque, Luciano Zanella, Silvana, Obadias, Edgard, Marcelo Balbino, Ronei, Fábio, Marcelo Barros, Tiago, Acácio, Carlão, Noêmia, Ronaldo, prof. Edson Nour (Edinho), prof. Bruno Coraucci Filho, prof.<sup>a</sup> Eglé Novaes sempre colaborando, de alguma forma, com o desenvolvimento deste trabalho, seja na descontração do ambiente, colaborando durante uma disciplina, incentivando nos momentos necessários ou “palpitando” nos indevidos. Com certeza estas amizades ficaram e ficarão comigo.

A meus pais Sílvio e Selma, e minha irmã, Sílvia, que sempre me incentivaram e deram todo apoio necessário.

Ao meu namorado, Ricardo, pelo seu companheirismo, compreensão, paciência, cooperação, atenção.

À minha Tia Sula, pela sua dedicação e compreensão durante todo este período, além de seu incentivo, juntamente com os Tios Edmur e José Luiz (Zé) e Tia Sioma (Bób's).

Aos amigos Carol Romanelli, César R. Silva, Érica G. Lente, Fabiano Mastrodi, e Gislaine Navarro, sempre presentes apesar do "dia-a-dia" sempre corrido.

Aos amigos do Laboratório de Inorgânica (IQ) que colaboraram com meu aprendizado estando sempre por perto: prof. Claudio Airolto, Neusa, Toshio, Silvana, Shirley, Reinaldo.

Ao pessoal do GPOMS, sempre me socorrendo em alguma coisa.

À todos que torceram por mim e colaboraram com o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro.

---

“Quando alguém encontrar o seu caminho não pode ter medo. Precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada.”

Paulo Coelho - *Brida*

## Sumário

	página
<b>Lista de Tabelas.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos.....</b>	<b>xix</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>05</b>
2.1 Objetivos Propostos.....	05
2.2 Objetivos Específicos.....	05
<b>3. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>07</b>
3.1 Respirometria.....	07
3.2 Métodos Analíticos de determinação de CO <sub>2</sub> .....	21

---

3.2.1 Via Alcalinidade.....	21
3.2.2 Titulação do CO <sub>2</sub> livre (H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> <sup>*</sup> ).....	23
3.2.3 Por arraste com gás inerte, antes e após acidificação.....	25
3.2.4 Método Manométrico.....	25
3.2.5 Eletrodo íon-seletivo.....	26
3.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	27
<b>4. Metodologia.....</b>	<b>35</b>
4.1 Adaptação e otimização do sistema FIA-condutométrico.....	35
4.1.1 Reagentes.....	36
4.1.2 Soluções estoques.....	36
4.1.3 Equipamentos e Acessórios.....	36
4.1.4 Sistema FIA utilizado.....	37
4.1.5 Estudo do efeito da diluição das soluções analisadas.....	43
4.1.6 Influência do solvente utilizado.....	43
4.1.7 Influência do BaCl <sub>2</sub> .....	44
4.1.8 Efeito da concentração do fluxo carregador (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	44
4.1.9 Efeito da distância entre o injetor e a cela de difusão (D <sub>i-cd</sub> ).....	45

---

4.1.10 Purificação do KOH.....	46
4.1.11 Armazenamento das soluções preparadas para a construção da curva de calibração.....	47
4.2 Titulação ácido-base.....	47
4.2.1 Reagentes.....	48
4.2.2 Soluções estoques.....	48
4.2.3 Equipamentos e Acessórios.....	48
4.2.4 Princípio e procedimento experimental.....	49
4.3 Comparação da análise de CO <sub>2</sub> utilizando titulação ácido-base e FIA-conducométrico.....	50
4.3.1 Simulando um ensaio de respirometria.....	50
4.3.2 Cálculos utilizados nas determinações da quantidade de CO <sub>2</sub> gerado em cada respirômetro, e CO <sub>2</sub> biodegradado.....	51
4.4 Ensaio de respirometria seguindo o Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com determinação com FIA-conducométrico e titulação ácido-base.....	54
4.4.1 Reagentes.....	54
4.4.2 Equipamentos e Acessórios.....	55
4.4.3 Solo utilizado.....	55

---

4.4.4 Ensaio de respirometria.....	57
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>59</b>
5.1 Adaptação e otimização do sistema FIA.....	59
5.1.1 Estudo do efeito da diluição das soluções analisadas.....	59
5.1.2 Influência do solvente utilizado.....	62
5.1.3 Influência do BaCl <sub>2</sub> .....	65
5.1.4 Efeito da concentração do fluxo carregador (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ).....	66
5.1.5 Efeito da distância entre o injetor e a cela de difusão (D <sub>i-cd</sub> ).....	68
5.1.6 Purificação do KOH.....	71
5.1.7 Armazenamento das soluções preparadas para a construção da curva de calibração.....	73
5.2 Comparação entre a determinação da concentração de CO <sub>2</sub> por titulação ácido-base e FIA-condutométrico.....	76
5.3 Ensaio de respirometria seguindo o Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com determinação do (CO <sub>2</sub> ) <sub>v</sub> usando sistema FIA-condutométrico aquoso e titulação ácido-base.....	80
<b>6. Conclusões e Recomendações.....</b>	<b>88</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>90</b>
<b>Referências Consultadas.....</b>	<b>96</b>

**Abstract.....99**

**Apêndice A – Preparo das soluções utilizadas .....100**

---

## Lista de Tabelas

	Página
4.1 Resultados das análises químicas do solo utilizado no experimento.....	56
4.2 Resultados das análises físicas do solo utilizado no experimento.....	56
5.1 Dados obtidos para o teste preliminar da interferência do solvente utilizado:.....	65
5.2 Resultados obtidos para amostras conhecidas, simulando ensaios de respirometria, para titulação e sistema FIA.....	79

## Lista de Figuras

	Página
1.1 Esquema da ação de microrganismos aeróbios na degradação de matéria orgânica.....	01
3.1 Gráfico típico da respiração microbiana para testes respirométricos, utilizando uma mistura de lodo ativado e efluente, onde 1) fase lag, 2) fase log, 3) primeira parada (“first break”), 4) fase estacionária, 5) segunda parada (“second break”) e 6) fase endógena.....	08
3.2 Gráfico típico do crescimento bacteriano em função do tempo, de modo geral, onde: 1) fase lag, 2) fase log, 3) fase estacionária, 4) fase de declínio ou morte das bactérias.....	10
3.3 Esquema do metabolismo de microrganismos aeróbios.....	11
3.4 Esquema do respirômetro de Warburg, onde: A – coluna de mercúrio, B – frasco com KOH, C – recipiente onde é colocada a cultura líquida de microrganismos e D’ – válvula de três vias.....	12
3.5 Esquema do Respirômetro de Bartha, onde: A’ – tampa da cânula; B – Cânula ( $1 \leq \phi \leq 2$ mm); C – rolha de borracha; D’ – braço lateral ( $\phi \sim 40$ mm; H $\sim 100$ mm); E – solução de KOH, previamente padronizada; F – solo; G – frasco erlenmeyer (250 mL); H’ – válvula; I – suporte (lã de vidro ou algodão) e J – filtro de ascarita ( $\phi \sim 15$ mm; H $\sim 40$ mm).....	14

3.6 Esquema do Respirômetro desenvolvido por Nuvolari (1996), utilizado por Coraucci Filho na avaliação da biodegradação de lodo de indústria cítrica no solo através do ensaio de respirometria, onde: A* - frasco de vidro (560 ou 800 mL) com tampa metálica; B - Cânula ( $1 \leq \phi \leq 2$ mm); C' - béquer de 20 mL para colocação de KOH; C- vedação com rolha de borracha; E' - mangueira de borracha ( $\phi \sim 6$ mm); F' - tubo de vidro ( $\phi \sim 6$ mm); F - amostras de solo ou mistura solo-lodo (50 g); H* - presilhas de Morh (para seccionamento do fluxo de ar); I - camada suporte (lã de vidro ou algodão); J - filtro de ascarita ou cal sodada ( $\phi \sim 6$ mm; comprimento $\sim 0,25$ mm) e K - tampa de cânula (vedação com papel PARA-FILM).....	15
3.7 Produção de CO <sub>2</sub> para a taxa de aplicação de óleo essencial de 50 g/m <sup>3</sup> no efluente cítrico no solo (com replicação).....	16
3.8 Curvas de tratabilidade e toxicidade utilizando o parâmetro OUR-R em função da concentração da amostra (compostos químicos).....	19
3.9 Esquema da classificação dos métodos de análise em fluxo.....	28
3.10 Sistemas FIA em linha única, onde a amostra (A) é injetada num fluxo carregador (FC), movimentado por uma bomba peristáltica (BP), passando por um reator (R), detectada em um detector (D) e descartada no descarte (L <sup>o</sup> ).....	29
3.11 Esquema do sinal obtido no sistema FIA para diferentes velocidades (a) rápida, (b) velocidade usual com injeções realizadas em triplicata para construção da curva de calibração, e quintuplicata para amostra, onde h' é a altura do sinal; T é o tempo de residência, e T' o tempo de retorno.....	30
3.12 Esquema da porosidade de membranas utilizadas em vários processos.....	31
3.13 Esquema de uma membrana porosa (a) e membrana não porosa (b).....	32

4.1 Esquema do sistema de Análise de Injeção em Fluxo utilizado para a determinação da concentração de CO <sub>2</sub> com detecção condutométrica, onde L' – descarte.....	38
4.2 Esquema do injetor de acrílico utilizado no sistema FIA, onde  - fixo;  – móvel;  - alça que contém o volume de amostra a ser injetado, para (a) situação onde a alça está sendo abastecida com o fluxo de amostra, e (b) situação onde esta amostra é introduzida no fluxo carregador do sistema.....	39
4.3 Esquema da cela de difusão utilizada no sistema FIA-condutométrico.....	40
4.4 Curvas obtidas para ajustes matemáticos que melhor representam os dados resultantes para as soluções-padrão, sendo a) para Equação 4.2 onde: $Y = A X^B$ e b) para a Equação 4.3 onde: $\log Y = \log A + B \log X$ .....	42
5.1 Gráfico obtido para a análise em sistema FIA das soluções de NaHCO <sub>3</sub> recém-preparadas.....	60
5.2 Gráfico obtido para a análise em sistema FIA das soluções de NaHCO <sub>3</sub> recém-preparadas e diluídas 1:3 e 1:10 (conforme Projeto de Norma adotado).....	61
5.3 Gráfico obtido no sistema FIA da intensidade do sinal vs concentração de NaHCO <sub>3</sub> das amostras em função dos solventes utilizados.....	62
5.4 Gráfico do sistema carbonato-bicarbonato em função do pH.....	63
5.5 Estudo da variação da intensidade do sinal obtido em função da concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> para uma amostra da solução estoque de KOH 0,40 mol L <sup>-1</sup> .....	67
5.6 Estudo da variação do sinal obtido para diferentes distâncias entre injetor e cela de difusão (D <sub>i-cd</sub> ) em função da concentração do fluxo carregador utilizado (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), para uma mesma amostra.....	69

5.7 Gráfico obtido para o estudo da variação da distância ( $D_{i-cd}$ ) em função da concentração de $\text{NaHCO}_3$ .....	70
5.8 Resultados obtidos para a solução-estoque já preparadas, em comparação as soluções purificadas.....	72
5.9 Resultados obtidos para amostras de concentrações conhecidas de $\text{NaHCO}_3$ , tendo água como solvente, para análise após o seu preparo, e após período de 24 horas.....	74
5.10 Resultados obtidos para amostras de concentrações conhecidas de $\text{NaHCO}_3$ , com $\text{KOH}$ como solvente, para análise após o seu preparo, e após período de 24 horas.....	74
5.11 Resultados obtidos para amostras de concentrações conhecidas de $\text{NaHCO}_3$ , tendo $\text{KOH}$ como solvente, armazenadas por 4 dias em frascos plásticos estando sob refrigeração.....	76
5.12 Comportamento esperado para a variação do volume de $\text{HCl}$ utilizado em função da concentração de $\text{NaHCO}_3$ das amostras durante a titulação.....	77
5.13 Comportamento observado para a variação da intensidade do sinal obtido no sistema FIA em função da concentração de $\text{NaHCO}_3$ das amostras durante análise por FIA.....	78
5.14 Esquema da decomposição da glicose a ácido pirúvico via Glicólise.....	81
5.15 Esquema do Ciclo de Krebs.....	82
5.16 $\text{CO}_2$ acumulado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) determinado por titulação, pela biodegradação de glicose para diferentes taxas de aplicação utilizadas em função do tempo de incubação..	84

5.17 CO <sub>2</sub> acumulado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) determinado pelo sistema FIA, pela biodegradação de glicose para diferentes taxas de aplicação utilizadas em função do tempo de incubação..	84
5.18 Comparação dos resultados obtidos para as análises realizadas por titulação e por FIA após ajuste.....	85
5.19 Comparação do comportamento esperado (a) e o obtido experimentalmente (b) na degradação de compostos orgânicos, ressaltando as fases observadas.....	86

---

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

- $\phi$  - diâmetro interno
- $\leq$  - menor ou igual
- ® - marca registrada
- ° C - graus Celsius (unidade de temperatura)
- $\mu\text{g}$  - micrograma (unidade de massa =  $10^{-6}$  g)
- $\mu\text{L}$  - microlitro (unidade de volume =  $10^{-6}$  L)
- $\mu\text{mol}$  - micromol (unidade utilizada para indicar quantidade de matéria =  $10^{-6}$  mol)
- [alc] - alcalinidade
- [CO<sub>2</sub>] - concentração de dióxido de carbono
- [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] - concentração de íon carbonato
- [H<sup>+</sup>] - concentração de íon hidrogênio (espécie ácida)
- [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] - concentração de íon bicarbonato
- [H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>\*</sup>] - concentração de dióxido de carbono livre
- [NaHCO<sub>3</sub>] - concentração de bicarbonato de sódio
- [OH<sup>-</sup>] - concentração de hidroxila (espécie básica)
- Å - angstrom (unidade de comprimento =  $10^{-10}$  m)

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ADT – adenosina difosfato
- alc – alcalinidade total da amostra
- ATP – adenosina trifosfato
- BaCl<sub>2</sub> – cloreto de bário
- BaCO<sub>3</sub> – carbonato de bário
- C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> – glicose
- C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOKCOOH – ftalato de potássio
- C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>COOKCOOK – ftalato de dipotássio
- Ca<sup>2+</sup> – íon cálcio
- CaCO<sub>3</sub> – carbonato de cálcio
- Cd(II) – cádmio no estado de oxidação +2
- CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
- CFA – Análise em Fluxo Contínuo (do inglês “Continuous Flow Analysis”)
- CH<sub>3</sub>COCOOH – ácido pirúvico
- CH<sub>4</sub> – metano
- Cl<sup>-</sup> – íon cloreto
- cm – centímetro (unidade de comprimento = 10<sup>-2</sup> m)
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono
- (CO<sub>2</sub>)<sub>b</sub> – dióxido de carbono devido a degradação ou dióxido de carbono biodegradado
- C<sub>T</sub> – concentração total de espécies carbônicas em solução
- Cu(II) – cobre no estado de oxidação 2+
- DBO – demanda bioquímica de Oxigênio

DBO<sub>5</sub> – demanda bioquímica de Oxigênio em 5 dias

D<sub>i-ed</sub> – distância entre injetor e cela de difusão

DQO – demanda química de oxigênio

f – fator que depende da constante de dissociação do H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e da temperatura

f.e.m. – força eletromotriz

FIA – Análise por Injeção em Fluxo (do inglês “Flow Injection Analysis”)

g – grama (unidade de massa)

H – comprimento

H<sup>+</sup> – íon hidrogênio (espécie ácida)

H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – ácido carbônico

H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>\*</sup> – dióxido de carbono livre

H<sub>2</sub>O – água

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – ácido sulfúrico

H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> – íon hidroxônio (espécie ácida)

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> – ácido fosfórico

ha – hectare (unidade de medida de área = 10<sup>4</sup> m<sup>2</sup>)

HCl – ácido clorídrico

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> – espécie carbônica iônica bicarbonato

Hg(II) – mercúrio no estado de oxidação 2+

k – constante de dissociação

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – carbonato de potássio

KOH – hidróxido de potássio

L – litro (unidade de volume)

LC – cromatografia líquida (do inglês “Liquid Chromatograph”)

- m – metro (unidade de comprimento)
- m<sup>2</sup> – metro quadrado (unidade de medida de área)
- m<sup>3</sup> – metro cúbico (unidade de volume = 10<sup>3</sup> L)
- mg – miligrama (unidade de massa = 10<sup>-3</sup> g)
- Mg<sup>2+</sup> - íon magnésio
- mL – mililitro (unidade de volume = 10<sup>-3</sup> L)
- mm – milímetro (unidade de comprimento = 10<sup>-3</sup> m)
- mol – unidade utilizada para indicar quantidade de matéria (corresponde a 6,02.10<sup>23</sup> entidades)
- MSFA – Análise em Fluxo Monossegmentado (do inglês “Mono Segmented Flow Analysis”)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – carbonato de sódio
- NaCl – cloreto de sódio
- NaHCO<sub>3</sub> – bicarbonato de sódio
- NaOH – hidróxido de sódio
- ng – nanograma (unidade de massa = 10<sup>-9</sup> g)
- NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - íon nitrato
- O<sub>2</sub> – oxigênio
- OH<sup>-</sup> – hidroxila (espécie básica)
- OUR-R – taxa relativa de oxigênio consumido (do inglês “Relative Oxygen Uptake Rate”)
- pH – potencial de hidrogênio
- pH<sub>t</sub> – pH da amostra numa temperatura qualquer
- PTFE – politetrafluoretileno

RC – Respirômetro controle

RT – Respirômetro teste

$\text{SO}_4^{2-}$  - íon sulfato

$t$  – temperatura

t – tonelada (unidade de massa =  $10^6$  g)

vs - versus

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**Resumo**

Andreo, Ana Paula. **Ensaio de Respirometria: Monitoração do CO<sub>2</sub> utilizando um Sistema FIA com Detecção Condutométrica.** Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 104 pág. Dissertação de Mestrado.

A respirometria é uma técnica muito utilizada na determinação da biodegradação de resíduos misturados ao solo pela atuação de microrganismos presentes. O respirômetro normalmente utilizado é o de Bartha e Pramer, onde o CO<sub>2</sub> produzido durante o processo é determinado via titulação ácido-base (convencional). O presente trabalho teve como objetivo a determinação do CO<sub>2</sub> biodegradado, (CO<sub>2</sub>)<sub>b</sub> através de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção condutométrica, uma técnica cujas características são precisão, sensibilidade e curto tempo de resposta. Para tanto, fez-se necessário o estudo de parâmetros operacionais do sistema FIA utilizado. Realizou-se então ensaios de respirometria seguindo o Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com determinações do (CO<sub>2</sub>)<sub>b</sub> por titulação e por sistema FIA. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, verificando nas curvas obtidas o mesmo comportamento previsto pela teoria, permitindo assim, a identificação das fases do crescimento microbiano.

**Palavras chave:** Respirometria, Análise por injeção em Fluxo (FIA), CO<sub>2</sub> biodegradado

## 1. Introdução

O comportamento da respiração aeróbia microbiana é considerado um indicador da sua atividade no solo, podendo ser avaliado pela monitoração do oxigênio consumido ou do dióxido de carbono produzido durante a biodegradação dos compostos orgânicos. Este método é chamado *respirometria* e constitui uma importante ferramenta aplicada aos problemas ligados às ciências ambientais.

A respirometria se baseia no princípio de que há uma correlação direta entre a geração de  $\text{CO}_2$ , ou consumo de  $\text{O}_2$ , e a degradação da matéria orgânica num solo, pela ação dos microrganismos presentes nesse ambiente, como representado na Figura 1.1.

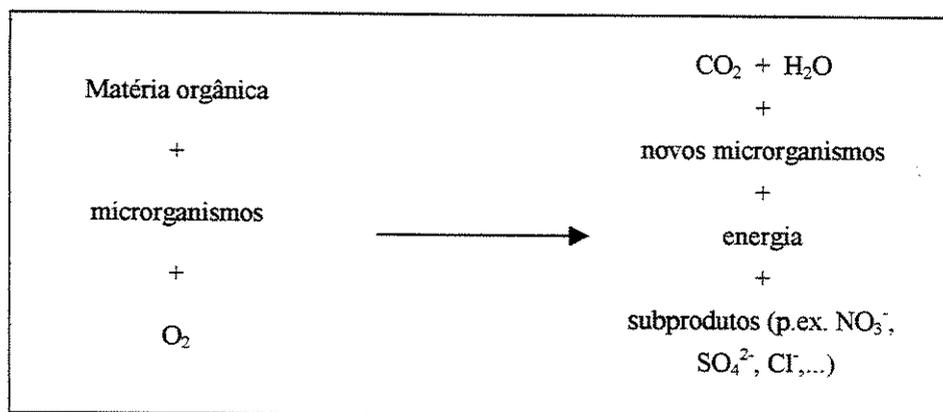


Figura 1.1: Esquema da ação de microrganismos aeróbios na degradação de matéria orgânica.

Quando é adicionada uma certa quantidade de matéria orgânica biodegradável a um determinado solo, no qual se registra a presença de nutrientes, ocorre um crescimento da massa biológica. Conseqüentemente, dá-se um aumento no consumo de  $O_2$  e na geração de  $CO_2$ , como resultado da atividade microbiana. À medida que a quantidade de matéria orgânica fica escassa, o metabolismo dos microrganismos sofre um decréscimo, diminuindo tanto o consumo de  $O_2$  como a geração de  $CO_2$ . Dessa forma, utilizando-se esse parâmetro bioquímico, é possível realizar uma avaliação da cinética de biodegradação de compostos químicos específicos, e até mesmo de misturas destes, bem como de sua toxicidade aos microrganismos do solo.

A ação de compostos químicos específicos, ou de misturas destes, pode ser avaliada através de aparelhos ou processos enumerados a seguir: *respirômetros manométricos*, onde é feita uma monitoração da variação de pressão no sistema no qual ocorre a reação; *respirômetros eletrolíticos*, onde um sensor acusa o consumo de  $O_2$  e promove a reoxigenação do sistema; pela *determinação direta do  $O_2$  dissolvido* no meio; ou pela *determinação do  $CO_2$  produzido* durante a atividade microbiana.

Em ensaios onde são utilizados respirômetros manométricos, o aparelho pioneiro é o respirômetro de Warburg, onde um manômetro foi adaptado a um frasco contendo um recipiente com uma solução alcalina. No interior do frasco, é colocado o solo misturado à substância, ambos de interesse. A solução alcalina, normalmente hidróxido de potássio, é colocada no recipiente próprio; com a função de absorver o  $CO_2$  produzido durante o metabolismo dos microrganismos presentes no solo. Obtém-se, assim, a variação de pressão, pois o  $O_2$  será consumido e o  $CO_2$  será absorvido, diminuindo a pressão do sistema em relação ao estado inicial.

Hoje, a determinação do metabolismo de microrganismos, frente a outras substâncias, por monitoração da variação de pressão no sistema, pode ser realizada utilizando-se transdutores diferenciais de pressão, tanto para

monitoração do consumo de  $O_2$  como na produção de  $CO_2$  ou metano, em processos aeróbios e anaeróbios, respectivamente.

No respirômetro eletrolítico, o princípio de funcionamento é similar ao utilizado no respirômetro de Warburg: a amostra é introduzida em um frasco que também contém um recipiente onde é colocada uma solução alcalina. Esta, assim como ocorre no respirômetro de Warburg, irá absorver o  $CO_2$  gerado, produzindo uma variação na pressão do sistema em estudo. A diferença está na forma como esta mudança é detectada: em vez de um manômetro, é utilizado um sensor que, frente à variação de pressão, inicia um processo de eletrólise da água, na qual  $O_2$  é liberado para o meio a fim de suprir o gás consumido. A quantidade de  $O_2$  utilizada pelos organismos é obtida pela corrente elétrica utilizada pelo sistema eletrolítico usado com a finalidade de gerar o gás  $O_2$  através da eletrólise da água.

A atividade microbiana também pode ser avaliada pela quantificação direta do oxigênio dissolvido, através de titulação ou utilizando um eletrodo sensível à espécie de interesse ( $O_2$  dissolvido). Para que estes métodos de determinação de oxigênio na ausência de fase gasosa sejam possíveis, é necessário que o meio a ser avaliado seja inicialmente aerado, até a sua saturação.

Na determinação direta do  $O_2$  dissolvido por titulação, existe a desvantagem da destruição completa da amostra, além da necessidade de preparar um determinado número de replicatas e a possibilidade de interferência do operador nos resultados da análise, acarretando erros.

O método de determinar o  $O_2$  dissolvido utilizando eletrodo de membrana sensível a oxigênio é mais conveniente. A determinação é mais rápida, não ocorre destruição da amostra, com perda do material estudado, e está menos sujeita à interferência do operador. Este método de determinação requer a construção de uma curva de calibração.

Para a determinação do  $\text{CO}_2$  produzido durante o processo de respiração, foi desenvolvido, em 1965, o respirômetro de Bartha e Pramer. O gás produzido é absorvido por uma solução alcalina, colocada em uma câmara à qual se encontra interligado o solo, e sua determinação é feita por titulação ácido-base da solução, utilizando HCl como titulante e fenolftaleína como indicador (Bartha e Pramer, 1965).

O método respirométrico convencional é demorado e trabalhoso, pois consiste em várias determinações volumétricas (controle e amostra) até o fim da produção de  $\text{CO}_2$  (pelo menos 15 dias), para cada ensaio realizado. Este método é adotado pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB- e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT .

Como o  $\text{CO}_2$  é um produto da respiração aeróbia, seu monitoramento pode ser utilizado como parâmetro no estudo da atividade metabólica de microrganismos. Além disso, quando se analisa a quantidade de  $\text{CO}_2$  produzida, tem-se a garantia de estar avaliando o crescimento microbiológico, pois ocorre a mineralização completa de uma parte da matéria orgânica, isto é, o produto final é  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , energia e biomassa. Na análise da quantidade de  $\text{O}_2$  consumido, não é possível essa garantia, pois pode-se ter a formação de subprodutos utilizando o carbono. Referidos subprodutos não são usados pelos microrganismos em seu metabolismo, além de poderem apresentar uma certa toxicidade para a cultura em questão.

Um sistema alternativo para determinação de  $\text{CO}_2$ , tanto em meio aquoso como gasoso, é a Análise por Injeção em Fluxo, FIA (do inglês “Flow Injection Analysis”), em conjunto com um detector condutométrico.

O sistema FIA apresenta algumas vantagens: curto tempo de resposta, necessidade de pequena quantidade de amostra, eliminação de interferências do operador, alta sensibilidade, maior precisão, alta velocidade nas análises, simplicidade de operação do equipamento, vasto campo de aplicação e possibilidade de automatização.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivos Propostos**

---

Os objetivos deste trabalho foram a realização de determinações do CO<sub>2</sub>, produzido durante o processo de respiração aeróbia de microrganismos, em ensaios de respirometria seguindo o Projeto de Norma da ABNT, utilizando sistema FIA com detecção condutométrica para tais análises.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Estudo e adaptação de sistema FIA para os testes de respirometria. Monitoração do CO<sub>2</sub>.
- Comparar a determinação de CO<sub>2</sub> por titulação ácido-base como recomendado pelo Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com a determinação com FIA – condutométrico.

- Ensaio de respirometria (conforme Projeto de Norma citado) com determinação do  $\text{CO}_2$  produzido por titulação e sistema FIA – condutométrico. Construção da curva da concentração de  $\text{CO}_2$  em função do tempo, utilizando glicose como substrato.

### **3. Revisão Bibliográfica**

A revisão bibliográfica apresentada neste trabalho será dividida em três partes, conforme os temas abordados: respirometria, determinações de CO<sub>2</sub> e FIA.

---

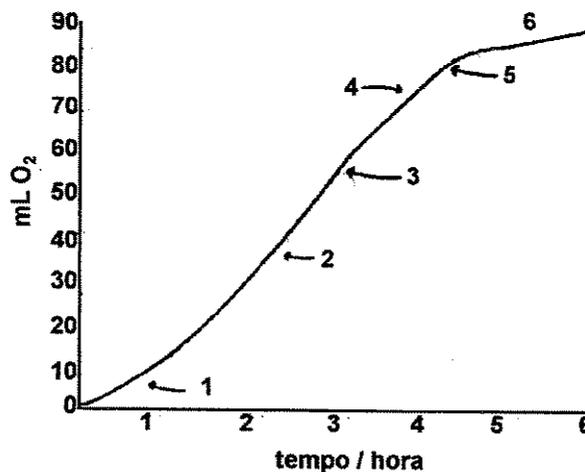
#### **3.1 Respirometria**

Os processos biológicos de tratamento de águas residuais consistem na capacidade demonstrada por microrganismos presentes no meio, de utilizarem os compostos orgânicos biodegradáveis, transformando-os em subprodutos. Estes, por sua vez, podem apresentar-se em três diferentes estados: sólido (lodo biológico), líquido (água) ou gasoso (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, etc.). A capacidade de utilização dos compostos orgânicos depende da atividade microbiana da biomassa presente, independentemente do processo utilizado, aeróbio ou anaeróbio. Em tratamento de efluentes, principalmente líquidos, os processos aeróbios têm sido amplamente utilizados, principalmente devido à sua eficiência e estabilidade. Nesses casos, a taxa de respiração microbiana é um parâmetro de grande importância. É através deste que sua atividade é avaliada, sendo possível

inferir o potencial da biomassa aeróbia em degradar diferentes tipos de substratos (Chernicharo et al, 1997).

Taxa de respiração é a quantidade de oxigênio, por unidade de volume e tempo, que é consumido por microrganismos aeróbios. Este parâmetro é muito importante porque está diretamente relacionado a outros dois parâmetros bioquímicos de grande importância no controle de uma estação de tratamento de efluentes: crescimento bacteriano e consumo de substrato (Spanjers et al., 1996).

Desta maneira, é muito importante conhecer o gráfico da respiração microbiana - por exemplo, em lodos ativados na presença de efluentes - conforme apresentado na Figura 3.1, assim como discutir algumas considerações sobre suas fases mais relevantes (Arthur, 1984).



**Figura 3.1:** Gráfico típico da respiração microbiana para testes respirométricos, utilizando uma mistura de lodo ativado e efluente, onde: 1) fase lag, 2) fase log, 3) primeira parada ("first break"), 4) fase estacionária, 5) segunda parada ("second break") e 6) fase endógena. Fonte: adaptado de Arthur, 1984.

As fases mais importantes deste gráfico são:

⇒ **Fase lag:** O período de tempo no qual esta fase ocorre pode ser longo ou curto. Um longo período lag indica que há poucos organismos presentes ou que estes organismos não estão adaptados ao efluente. Um curto período lag diz o contrário. Sua ausência indica que o efluente utilizado é satisfatoriamente ‘semeado’ com uma cultura apropriada de organismos.

⇒ **Fase log:** Fornece informações sobre os microrganismos e o efluente presente no meio. Em relação aos microrganismos, quando um excesso de alimento é adicionado ao meio, a taxa de respiração registrada está relacionada ao número de organismos viáveis presentes. Em relação ao efluente, a taxa de respiração indica a característica do mesmo modo: para um resíduo facilmente metabolizável em processos aeróbios, a demanda de  $O_2$  é alta (açúcares altamente solúveis); já uma baixa demanda de  $O_2$  pode indicar uma insolubilidade relativa (gordura ou substância protéica).

⇒ **Fase estacionária:** Da mesma forma que na fase log, a taxa de demanda de  $O_2$  é uma característica do resíduo. Nesta fase, o material degradado consiste em produtos mais difíceis de serem metabolizados, diminuindo o consumo de oxigênio.

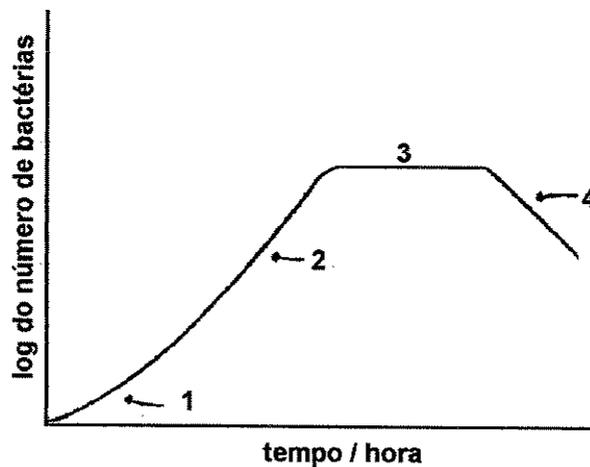
⇒ **Fase endógena:** Nesta fase os organismos estão sob uma dieta de inanição, e o consumo de  $O_2$  é diretamente proporcional ao número de organismos viáveis desde a ausência de alimentos.

⇒ **Primeira e segunda parada (“first break” e “second break”):** Estas etapas, ou melhor, diminuições na respiração, estão relacionadas ao tipo de efluente presente na amostra que está sendo analisada. Este comportamento em um gráfico de respiração é consequência da presença de mais de um composto químico no efluente em estudo, pois cada parada representa que um componente foi retirado do meio, ou seja, degradado, e está ocorrendo nova fase de

adaptação dos microrganismos a outro composto químico, que servirá de alimento para seu metabolismo nesta nova situação (Mahendraker e Viraraghavan, 1995).

O crescimento bacteriano é muito importante, uma vez que as bactérias participam, junto com outros organismos, das transformações do solo, se destacando por apresentarem um rápido crescimento e também por decomporem uma variedade de substratos (ALEXANDER, 1977 apud SIVIERO, 1999). Além disso, as bactérias representam 25 a 30% dos microrganismos dos solos agrícolas (SIQUEIRA, 1988 apud SIVIERO, 1999).

O gráfico para o crescimento bacteriano em função do tempo, de modo geral, é representado na Figura 3.2.

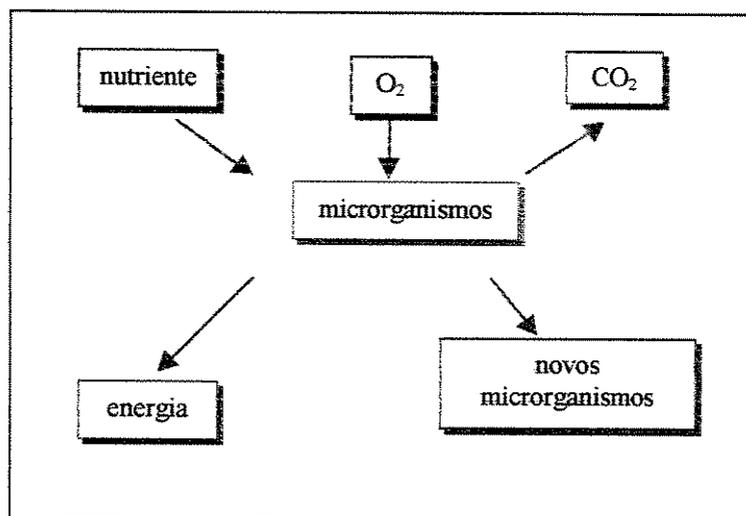


**Figura 3.2:** Gráfico típico do crescimento bacteriano em função do tempo, de modo geral, onde: 1) fase lag, 2) fase log, 3) fase estacionária, 4) fase de declínio ou morte das bactérias. Fonte: adaptado de Pelzar et al, 1980.

Ao se comparar o gráfico da respiração com o de crescimento bacteriano, Figuras 3.1 e 3.2 respectivamente, pode-se observar que eles estão relacionados, pois a fase lag de crescimento corresponde à mesma fase na respiração; o mesmo

ocorre com a fase log, onde temos um máximo crescimento bacteriano e máxima taxa de respiração. Na fase estacionária observa-se uma estabilidade em ambas as Figuras, ou seja, não aumenta nem diminui o número de bactérias na Figura 3.2, e a respiração permanece constante na Figura 3.1.

O termo respirometria, em geral, tem sido usado para descrever a quantidade de oxigênio consumido pela população microbiológica presente em uma amostra onde o solo ou o lodo ativado é misturado a um resíduo, que pode ser um composto químico específico, uma mistura de diversos compostos e até mesmo um efluente. Sob condições aeróbias, o consumo de  $O_2$  pelos microrganismos é proporcional à matéria orgânica e à biomassa presentes na amostra. A Figura 3.3 descreve esta relação (Rozich e Colvin, 1990; e Mahendraker e Viraraghavan, 1995).

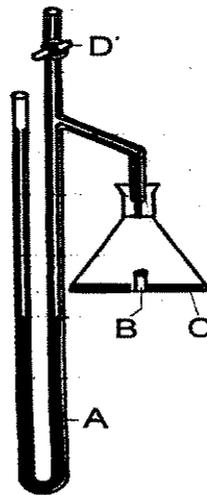


**Figura 3.3:** Esquema do metabolismo de microrganismos aeróbios. Fonte: adaptado de Arthur, 1984.

Quando esta reação se processa no interior de um respirômetro, o  $CO_2$  produzido se desprende da mistura que contém o resíduo, sob agitação, e fica no espaço-morto sobre a amostra. Como o  $CO_2$  produzido é proporcional à

quantidade de  $O_2$  consumido (1:1), não é observada uma variação de pressão no interior do sistema. Se for colocado, no interior do respirômetro, um recipiente aberto contendo base forte, o  $CO_2$  produzido é absorvido e, assim, uma diferença de pressão é criada. Esta diferença é corrigida por um sistema em equilíbrio contendo apenas o solo, ou lodo ativado, que está sendo utilizado no estudo (branco). Neste último sistema, acontece apenas o crescimento microbiológico relativo aos nutrientes já presentes no solo usado (Mahendraker e Viraraghavan, 1995).

Warburg (1924) adaptou um manômetro simples a um frasco contendo um recipiente para uma solução alcalina, podendo assim monitorar a respiração dos microrganismos presentes no meio e entender mais sobre a atividade microbiana em cultura líquida, inclusive em efluentes. O resultado do seu trabalho foi chamado respirômetro de Warburg, que está representado na Figura 3.4 (Arthur, 1984; e Mahendraker e Viraraghavan, 1995).



**Figura 3.4:** Esquema do Respirômetro de Warburg, onde: A - coluna de mercúrio, B - frasco com KOH, C - recipiente onde é colocada a cultura líquida de microrganismos e D' - válvula de três vias. Fonte: adaptado de Arthur, 1984.

O funcionamento do respirômetro de Warburg é baseado na variação da pressão no interior do sistema, provocada pela respiração dos microrganismos

aeróbios presentes no meio reacional. Ao respirar, os microrganismos consomem  $O_2$  (diminuindo a pressão) e liberam  $CO_2$  (compensando a variação anterior), em equivalente número de moléculas, ou seja, teoricamente sem nenhuma variação da pressão do sistema. A função da solução alcalina, normalmente hidróxido de potássio, é justamente absorver o  $CO_2$  liberado durante a respiração e, assim, promover uma alteração significativa na pressão do sistema, que é detectada pela variação da altura da coluna de mercúrio em ambas as pernas do respirômetro. Este aparelho é classificado como respirômetro manométrico e foi o pioneiro nesta classe de equipamentos.

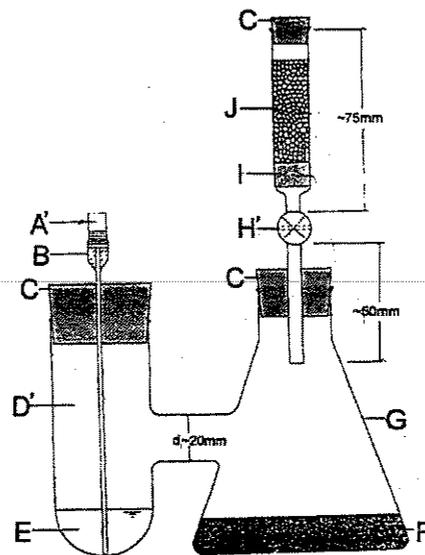
Até 1960, os respirômetros eram limitados. Com eles eram possíveis determinações apenas de pequenas variações de pressão ou volume dos gases; seus reatores eram pequenos, e estas variações são proporcionais à quantidade de amostra no interior do respirômetro. Além disso, não havia reoxigenação.

A maioria dos respirômetros utilizados hoje são baseados no respirômetro de Warburg, com mudanças no tamanho, forma e grau de automação, eliminando as deficiências anteriormente mencionadas (Mahendraker e Viraraghavan, 1995).

O respirômetro de Warburg foi comparado com o método de Demanda Bioquímica de Oxigênio em 5 dias ( $DBO_5$ ) e, através dos resultados obtidos, concluiu-se que o método respirométrico se mostrava eficiente na determinação deste parâmetro (Lee e Oswald, 1954).

Posteriores estudos permitiram a conclusão de que o uso de método manométrico para determinação de  $DBO_5$  podia eliminar erros de diluição que ocorrem durante o procedimento do método tradicional de sua determinação (Jenkins, 1960). Concluiu-se ainda, em 1967, que as vantagens dos métodos respirométricos sobre testes de  $DBO_5$  são a possibilidade da realização de monitorações mais contínuas do  $O_2$  consumido, como também estudos cinéticos do teste, pois as informações estão disponíveis num tempo bem mais curto que os 5 dias do ensaio de  $DBO_5$  (Montgomery, 1967).

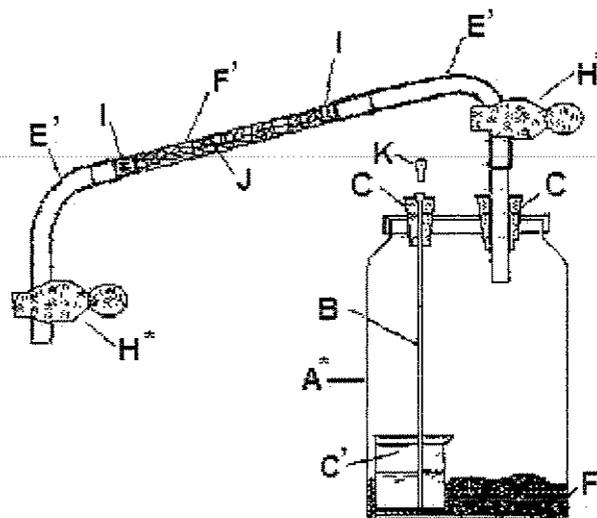
Bartha e Pramer, em 1965, desenvolveram um respirômetro baseado na determinação do dióxido de carbono produzido durante a respiração microbiana. O gás ( $\text{CO}_2$ ) produzido no processo era absorvido por uma solução alcalina ( $\text{KOH } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ) e posteriormente quantificado, utilizando-se uma titulação com ácido ( $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Na Figura 3.5, é mostrado o esquema dessa montagem, conhecido como respirômetro de Bartha (Bartha e Pramer, 1965).



**Figura 3.5:** Esquema do Respirômetro de Bartha, onde: A' – tampa da cânula; B – Cânula ( $1 \leq \phi \leq 2 \text{ mm}$ ); C – rolha de borracha; D' - braço lateral ( $\phi \sim 40 \text{ mm}$ ; H  $\sim 100 \text{ mm}$ ); E – solução de KOH, previamente padronizada; F – solo; G – frasco erlenmeyer (250 mL); H' – válvula; I – suporte (lã de vidro ou algodão) e J – filtro de ascarita ( $\phi \sim 15 \text{ mm}$ ; H  $\sim 40 \text{ mm}$ ). Fonte: adaptado de CETESB, 1990, ABNT, 1993.

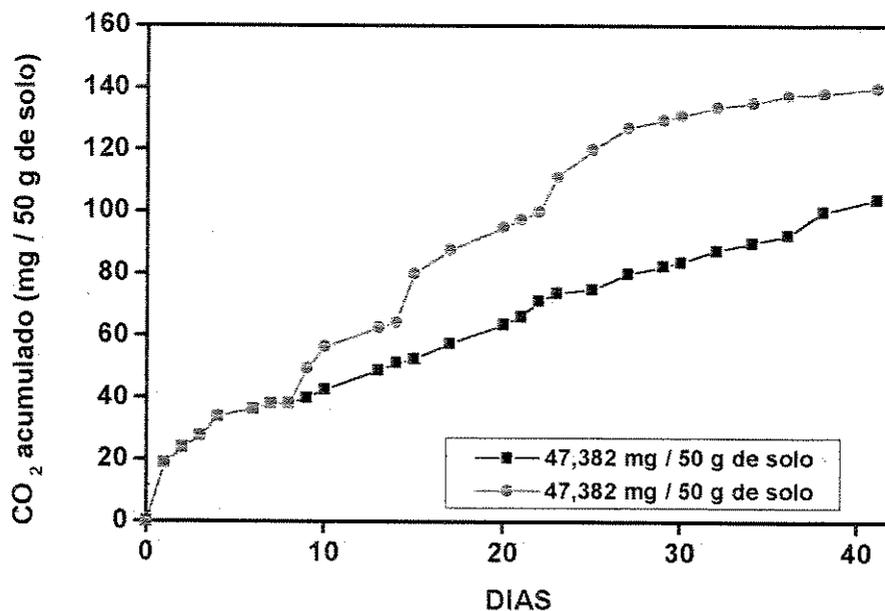
Foram, e são, realizados diversos experimentos utilizando a respirometria como ferramenta para avaliação da degradação de diversas substâncias, sendo uma delas óleos essenciais aplicados ao solo, através de monitoração da produção de  $\text{CO}_2$ . Para isso pode ser utilizado o respirômetro de Bartha, ou respirômetros alternativos, já estudados, em ensaios realizados (Coraucci Filho et al, 1997).

Nos ensaios para a comparação do respirômetro padrão de Bartha com outros dois modelos alternativos de 560 e 800 mL, foi utilizado lodo digerido de indústria cítrica, com taxas de aplicação de 0,0; 2,5; e 5,0 t/ha (toneladas de sólidos secos por hectare). Foi verificada a melhor relação taxa aplicada/tempo de degradação do lodo, determinando-se o conjunto de melhor desempenho. Foi verificado que o respirômetro alternativo com volume de 800 mL, representado na Figura 3.6; apresentou boa reprodutibilidade; baixo custo e leituras mais espaçadas no tempo sem perigo de avariar a medida da biodegradação, quando comparado ao modelo padrão de Bartha para as mesmas taxas aplicadas (Coraucchi Filho et al, 1997).



**Figura 3.6:** Esquema do Respirômetro desenvolvido por Nuvolari (1996), utilizado por Coraucchi Filho na avaliação da biodegradação de lodo de indústria cítrica no solo através do ensaio de respirometria, onde: A\* – frasco de vidro (560 ou 800 mL) com tampa metálica; B – cânula ( $1 \leq \phi \leq 2$  mm); C' – béquer de 20 mL para colocação de KOH; C – vedação com rolha de borracha; E' – mangueira de borracha ( $\phi \sim 6$  mm); F' – tubo de vidro ( $\phi \sim 6$  mm); F – amostras de solo ou mistura solo-lodo (50 g); H\* – presilhas de Morh (para seccionamento do fluxo de ar); I – camada suporte (lã de vidro ou algodão); J – filtro de ascarita ou cal sodada ( $\phi \sim 6$  mm; comprimento  $\sim 0,25$  mm) e K – tampa de cânula (vedação com papel PARA-FILM).  
Fonte: Coraucchi Filho, 1997.

O método respirométrico também pode ser utilizado, por exemplo, em estudos do efeito da frequência de irrigação e das taxas de aplicação de efluente cítrico nas quantidades de óleos essenciais no solo. No trabalho apresentado, foi utilizado o respirômetro-padrão de Bartha para determinação do gás carbônico gerado durante a biodegradação dos compostos estudados, e cromatografia gasosa para caracterização dos componentes do óleo essencial e essências cítricas no efluente. O composto principal encontrado foi o D-limoneno, sendo este a espécie monitorada. Para cada taxa de aplicação, foi determinada a periodicidade da reaplicação. Na Figura 3.7 está ilustrada o gráfico da produção de CO<sub>2</sub> para a taxa de aplicação de óleo essencial de 50 g/m<sup>3</sup> no efluente cítrico no solo (com reaplicação) (Coraucchi Filho et al, 1998).



**Figura 3.7:** Produção de CO<sub>2</sub> para a taxa de aplicação de óleo essencial de 50 g/m<sup>3</sup> no efluente cítrico no solo (com reaplicação). Fonte: adaptado de Coraucchi Filho, et al, 1998.

Na Figura 3.7, é possível observar que após a reaplicação de uma mesma taxa de óleo essencial, ocorreu um maior desenvolvimento do microrganismos presentes no solo, pois estes estão adaptados aos nutrientes adicionados. Também é possível observar as fases da respiração microbiana já discutidas anteriormente na Figura 3.1.

O respirômetro de Bartha também pode ser utilizado em estudos para orientar o aproveitamento de um lodo oriundo de um valo de oxidação na melhoria de um solo, mostrando mais uma aplicação deste método de determinação da geração do gás carbônico durante o crescimento microbiológico em um solo (Nuvolari et al, 1997).

O método respirométrico, devido à sua sensibilidade, também pode ser utilizado na determinação da estabilidade de materiais compostados. Para tais ensaios, Iannotti e colaboradores fizeram uma adaptação do procedimento de Bartha e Pramer, onde foi utilizado um recipiente de 3,8 L, temperatura de incubação igual a 25 °C e solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> para absorver o CO<sub>2</sub> gerado durante o processo estudado (Iannotti et al, 1994).

O uso de respirometria tem provado ser bastante útil na monitoração da degradabilidade de uma variedade de compostos sob condições aeróbias, sendo usado em estudos envolvendo óleos, compostos orgânicos voláteis orgânicos de alta e baixa solubilidade, compostos fenólicos e compostos tóxicos em geral. Este método também tem provado ser útil em pesquisas sobre a limitação de nutrientes, metabolismos de graxas, sendo uma ferramenta versátil, adaptável a uma variedade de pesquisas, além de utilizar uma quantidade reduzida de amostra e ser um método bastante reprodutível (Haines et al, 1996).

Ao se utilizar a respirometria na determinação do potencial de biodegradação de efluentes, não se faz necessária a construção de uma planta-piloto de tratamento biológico, podendo-se utilizar, por exemplo, lodo ativado para avaliar o comportamento dos microrganismos frente ao efluente de

interesse. Dessa forma, ocorre uma economia de tempo e custos, vantagem bem interessante (Khandaker, 1996).

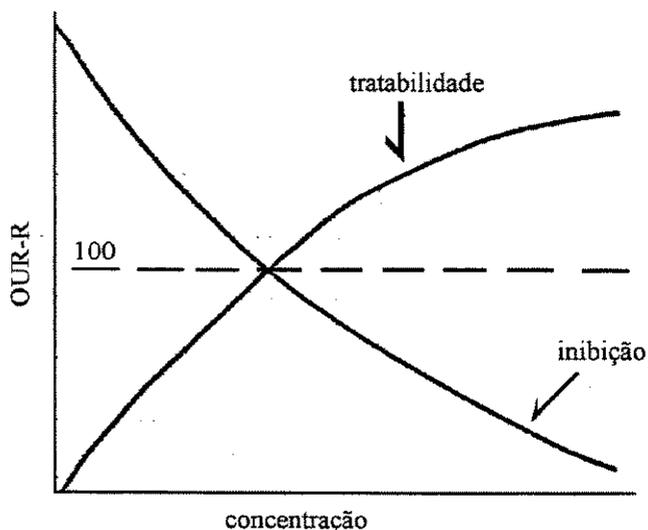
A medida respirométrica tem sido utilizada para avaliar sistemas de biotratamento, desenvolver estratégias de gerenciamento e operação de estações de tratamento de efluentes, pois se trata de um método reprodutível que indica a toxicidade do efluente e a remoção de compostos químicos presentes no meio. Dessa forma, ela se destaca sobre os tradicionais métodos de avaliação de remoção de poluentes, como DBO e sólidos suspensos (Rozich e Colvin, 1990).

Testes de tratabilidade e toxicidade são baseados no uso de material vivo para definir a natureza e o grau de biodegradação ou de efeitos nocivos, respectivamente, produzidos por uma simples substância ou uma mistura de substâncias. Podem ser realizados utilizando ensaios de respirometria.

Os testes de toxicidade são classificados conforme a exposição dos microrganismos selecionados à substância a ser testada. Dois são os mais conhecidos: teste agudo, com exposições curtas, mas elevadas concentrações da substância a ser testada; teste crônico, de maior duração, com doses menores da substância teste (normalmente numa significativa proporção do tempo de vida do organismo) (Bitton e Dutka, 1986).

Para que testes de toxicidade e/ou tratabilidade utilizando ensaios de respirometria possam ser realizados com lodos ativados, é necessário, inicialmente, levar a semente (no caso o próprio lodo ativado) à fase endógena, eliminando assim qualquer nutriente residual presente no lodo ativado. Só então a substância a ser testada é introduzida no respirômetro, e a variação no processo respiratório é observada (Arthur, 1984).

Na Figura 3.8, estão representados os resultados obtidos para testes de toxicidade e tratabilidade fornecidos pelo parâmetro de taxa relativa de oxigênio consumido (OUR-R, do inglês "Relative Oxygen Uptake Rate") (Arthur, 1984).



**Figura 3.8:** Curvas de tratabilidade e toxicidade utilizando o parâmetro OUR-R em função da concentração da amostra (compostos químicos). Fonte: adaptado de Arthur, 1984.

Quando o valor de OUR-R é aproximadamente 100, tem-se uma amostra que não possui substâncias que possam ser degradadas, nem que sejam tóxicas aos microrganismos presentes na amostra (semente). Para um valor de OUR-R menor que 100, tem-se uma substância tóxica. Se igual a zero, ocorre morte completa da semente para qualquer concentração de toxina acima de um valor específico pré estudado. Quando o valor de OUR-R é maior que 100, a amostra é fonte de nutrientes e carbono para a semente e, portanto, possui grande possibilidade de ser tratada biologicamente.

Outra maneira de analisar os valores de OUR-R obtidos é em função da concentração de amostra utilizada. Quando se obtém, em baixa concentração de amostra, um alto valor de OUR-R, a amostra é degradada biologicamente nesse nível de diluição; quando se obtém um baixo valor de OUR-R para elevadas concentrações de amostras, conclui-se que os compostos químicos estudados inibem o metabolismo dos microrganismos presentes; caso o valor obtido seja inferior a 100, a amostra é tóxica à semente e, portanto, existe uma chance muito baixa de ocorrer uma oxidação microbiana da mesma (Arthur, 1984).

Com o avanço da automação e a possibilidade da interface de muitos equipamentos com um computador, a obtenção e a análise de dados podem ser realizadas automaticamente, fazendo com que a respirometria seja uma ferramenta prática e bastante atrativa no controle ambiental (Mahendraker e Viraraghavan, 1995).

O método respirométrico pode apresentar diversas aplicações. Algumas são relacionadas a seguir, sendo que grande parte delas já foram discutidas previamente:

⇒ determinação de DBO;

⇒ controle 'on-line' de plantas de lodo ativado;

⇒ determinação de constantes biocinéticas em estudos de inibição de espécies químicas de interesse;

⇒ estimativa de concentração de substrato e taxa de crescimento críticas para substâncias que causam inibição em um processo, por exemplo, de degradação aeróbia;

⇒ avaliação do impacto de um novo efluente em um processo de tratamento já existente;

⇒ toxicidade e classificação dos constituintes de efluentes;

⇒ determinação da demanda de oxigênio de sedimentos;

⇒ análise da respiração de organismos aquáticos.

## 3.2 Métodos Analíticos de determinação de CO<sub>2</sub>

Dentre os métodos analíticos para determinação de CO<sub>2</sub>, os mais conhecidos são: via alcalinidade; titulação de CO<sub>2</sub> livre; por arraste com gás inerte, antes e após acidificação; manométrico e eletrodo íon-seletivo.

### 3.2.1 Via Alcalinidade

A alcalinidade total é obtida titulando-se um volume conhecido da amostra com um ácido forte (geralmente HCl) até que o pH atinja um valor, entre 4,3 e 4,5, de uma solução contendo apenas CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. É definida como o número de moles de íons hidrogênio requerido para converter um litro de uma solução para um equivalente de solução de ácido carbônico (HMSO, 1987).

Normalmente assume-se que a alcalinidade é devida apenas às espécies carbônicas, sendo a alcalinidade de carbonatos definida como:

$$[alc] = 2[CO_3^{2-}] + [HCO_3^-] + [OH^-] - [H^+] \quad (3.1)$$

Assumindo-se que não haja nenhum outro protólito presente na amostra, os valores de alcalinidade e pH podem ser usados para determinar a concentração

total de espécies carbônicas em solução ( $C_T$ ) e a espécie operacional,  $H_2CO_3^*$ , que corresponde ao dióxido de carbono livre; sabendo-se que:

$$C_T = [H_2CO_3^*] + [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] \quad (3.2)$$

$$[H_2CO_3^*] \cong [CO_2] \quad (3.3)$$

Para determinar  $C_T$  e  $H_2CO_3^*$ , utiliza-se a equação de Larson e Buswell (1942), a qual é baseada nos trabalhos pioneiros de Tillmans e Heublein (1921) (HMSO, 1987):

$$\log[H_2CO_3^*] = \log(\text{alc}) + \log(f) - \text{pH}_t \quad (3.4)$$

onde: alc: alcalinidade total da amostra ( $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ );

$\text{pH}_t$ : pH da amostra numa temperatura qualquer ( $^{\circ}\text{C}$ );

$[H_2CO_3^*]$ : concentração de dióxido de carbono livre da amostra ( $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ );

f: fator que depende da constante de dissociação do  $H_2CO_3$  (k) e, conseqüentemente, da temperatura (t).

A Equação 3.4 pode ser resolvida substituindo-se o valor tabelado de  $f = 0,88 / kt$ , onde:

$$-\log kt = 3404,71/(273+t) - 14,835 + 0,032786(273+t) \quad (3.5)$$

Tem-se que a equação final resulta em:

$$\log[H_2CO_3^*] = \log(alc) + 3404,71/(273+t) - 14,891 + 0,032786(273+t) - pH_t \quad (3.6)$$

### 3.2.2 Titulação do CO<sub>2</sub> livre (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub><sup>\*</sup>)

Na determinação do CO<sub>2</sub> livre por titulação, tem-se o princípio de que o dióxido de carbono livre reage com hidróxido de sódio, formando bicarbonato de sódio, conforme a Equação 3.7 (Standard Methods 18<sup>th</sup> ed.).



O final da titulação pode ser observado de duas maneiras: potenciometricamente (pH = 8,2) ou, mais precisamente, analisando uma curva de titulação ponto a ponto; ou utilizando um indicador ácido-base, por exemplo, fenolftaleína.

O processo da titulação potenciométrica envolve a medida da f.e.m. entre dois eletrodos: um eletrodo indicador, cujo potencial é uma função de concentração do íon a ser determinado, e um eletrodo de referência de potencial constante. A determinação exata da f.e.m. é crucial. Já nas titulações potenciométricas, não são requeridos valores absolutos de potenciais em relação a uma pilha padrão, e as medidas são feitas ao mesmo tempo que a titulação progride. O ponto de equivalência da reação será revelado por uma súbita mudança do potencial no gráfico das leituras de f.e.m. *versus* volume da solução titulante. Qualquer método que detecte esta abrupta mudança de potencial pode ser utilizado. Se o eletrodo indicador for um eletrodo de membrana (por exemplo: um eletrodo de vidro), um potenciômetro simples não será adequado e será indispensável um medidor de pH ou um medidor íon seletivo. As leituras do medidor podem dar diretamente as variações dos valores de pH à medida que prossegue a titulação.

Neste método de determinação de CO<sub>2</sub>, pode haver interferência de íons metálicos, que podem precipitar em meio alcalino, na forma de hidróxido. A presença de bases fracas, como amônia ou aminas, e sais de ácidos fracos e bases fortes, como borato, nitrito, fosfato e silicato, também podem interferir nas determinações. Para determinar a quantidade de CO<sub>2</sub> livre, deve realizar-se o cálculo apresentado na Equação 3.8.

$$\text{mg CO}_2 \text{ L}^{-1} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}} \times 44000}{V_{\text{amostra}}} \quad (3.8)$$

onde:  $V_{\text{NaOH}}$ : volume de titulante (mL),

$N_{\text{NaOH}}$ : normalidade de titulante,

$V_{\text{amostra}}$ : volume de amostra titulada (mL).

### 3.2.3 Por arraste com gás inerte, antes e após acidificação

Na determinação do dióxido de carbono por arraste, antes e após a acidificação, um gás inerte, normalmente nitrogênio, é borbulhado na amostra antes e após a acidificação da mesma, para se determinar  $\text{CO}_2$  livre e total, respectivamente. Em ambos os procedimentos, o  $\text{CO}_2$  evoluído é absorvido em uma solução de hidróxido de sódio, e o excesso de base é titulado com solução padronizada de ácido. A faixa de concentração de aplicação deste método situa-se entre 0,5 a 50  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$  (HMSO, 1987).

### 3.2.4 Método manométrico

O método manométrico para determinação do  $\text{CO}_2$  total foi desenvolvido para amostras nas quais o recipiente original (selado) é resfriado e, em seguida, aberto e tratado com  $\text{NaOH}$ , para absorver algum  $\text{CO}_2$  livre. Esta solução é acidificada e determinada manometricamente. A concentração final do  $\text{CO}_2$  da

amostra é determinada usando uma curva de calibração. O intervalo de aplicação está entre 0,5 a 6,0 g L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> (HMSO, 1987).

Outra maneira de determinar a concentração de CO<sub>2</sub> livre, ainda manometricamente, é aquela na qual o frasco original da amostra é perfurado por uma sonda contendo um manômetro. Atingindo o equilíbrio e tendo-se a temperatura conhecida, a pressão lida é relacionada com a concentração do CO<sub>2</sub>, usando-se tabelas prontas ou construindo-se uma curva de calibração. O intervalo de aplicação deste método está entre 2 a 12 g L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub> (HMSO, 1987).

### 3.2.5 Eletrodo íon-seletivo

Para a determinação de CO<sub>2</sub> com a utilização de um eletrodo íon-seletivo, utiliza-se um eletrodo de pH cujo sensor está recoberto por uma membrana sintética. O CO<sub>2</sub> é capaz de permear por essa membrana de um polímero hidrofóbico, resultando na mudança de pH. O sinal obtido no eletrodo de vidro é relacionado diretamente com a concentração de H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>\* na amostra. Quando a amostra é acidificada a pH abaixo de 5, o valor obtido corresponde à concentração de CO<sub>2</sub> total. Este método tem seu limite de detecção em torno de 4 mg L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, ou seja, 90 μmoles L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>, abaixo dos demais métodos (HMSO, 1987).

### 3.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

A automação e/ou mecanização de processos em Química Analítica está diretamente relacionada com as demandas da sociedade moderna. O desenvolvimento de novos produtos na indústria química, as análises clínicas (saúde pública) e, mais recentemente, o monitoramento da qualidade do meio ambiente, em estudos relacionados ao controle de poluição, provocaram um aumento significativo na demanda de análises “per capita”/ano. Isto fez com que processos fossem sendo automatizados, tornando os resultados menos sujeitos a erros humanos e, simultaneamente, reduzindo o tempo de análise. A automação, num sentido mais amplo, é representada pela capacidade de eliminar, parcial ou completamente, a intervenção humana em um método de análise química.

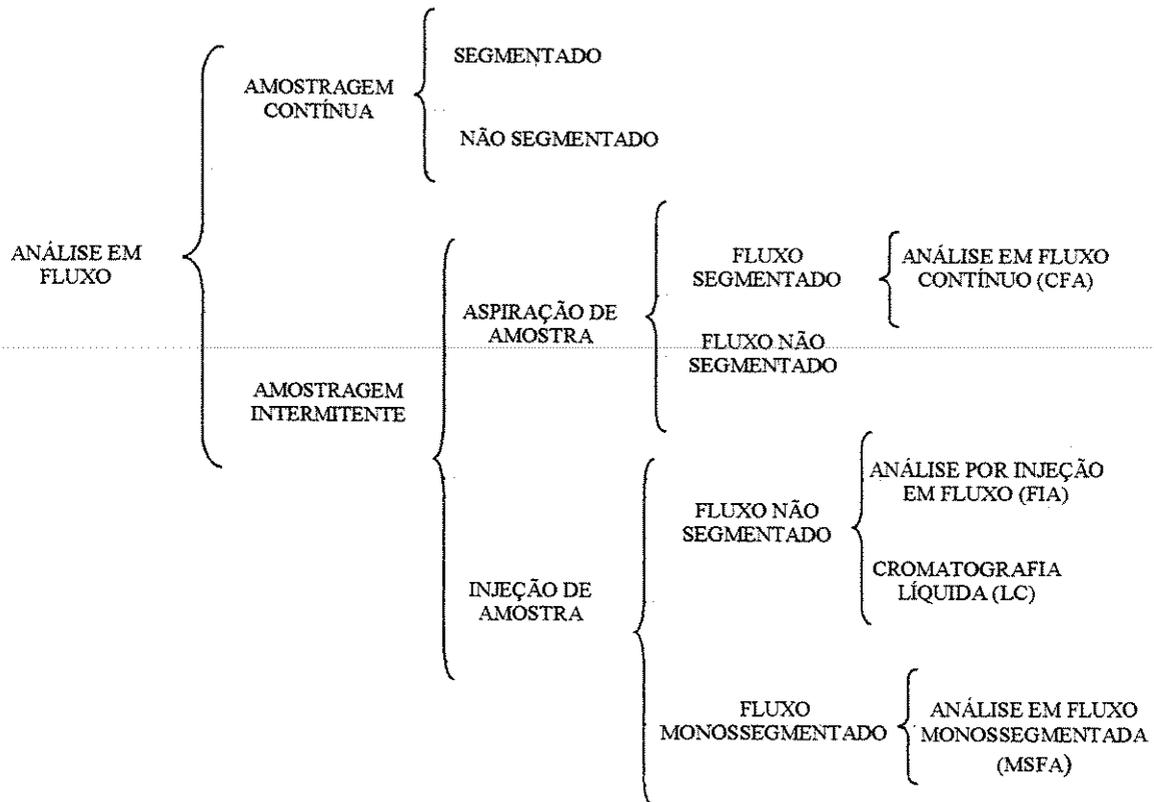
Os métodos automáticos de análise podem ser classificados em (Valcárcel e Luque de Castro, 1984):

- (a) Métodos Automáticos Descontínuos,
- (b) Métodos Automáticos Contínuos,
- (c) Métodos robotizados, dependendo da metodologia empregada.

Nos métodos contínuos, a concentração da espécie de interesse é medida sem a interrupção do fluxo dos reagentes. Os dois tipos de sistemas que podem ser utilizados nos métodos contínuos são os segmentados e os não segmentados. No primeiro (métodos contínuos segmentados), as amostras são aspiradas seqüencialmente e segmentadas pela inclusão de bolhas de ar, eliminadas antes que o fluido atinja o sistema de detecção. No segundo (métodos contínuos não segmentados) não há inclusão de bolhas de ar (Ruzicka e Hansen, 1988).

A denominação *Análise em Fluxo* é um nome genérico atribuído a todos os métodos analíticos baseados na introdução e processamento (tratamento) da

amostra num meio que esteja fluindo. Na Figura 3.9 são mostradas, de forma esquemática, praticamente todas as possíveis variações desse sistema. Formadas no inglês, são de uso corrente as siglas **CFA**, “Continuous Flow Analysis”; **FIA**, “Flow Injection Analysis”; **LC**, “Liquid Chromatograph” e **MSFA**, “Mono Segmented Flow Analysis” (van der Linden, 1994).

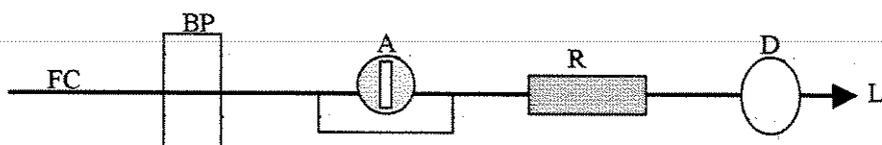


**Figura 3.9:** Esquema da classificação dos métodos de análise em fluxo. Fonte: van der Linden, 1994.

As análises por FIA são classificadas como métodos contínuos não segmentados. FIA pode ser definido como um processo analítico automático ou semi-automático, onde as amostras (ou reagentes) são inseridas num fluxo carregador, e não aspiradas, sem a presença de bolhas de ar. No momento da detecção, nem o equilíbrio físico (homogeneização no fluxo) nem o equilíbrio

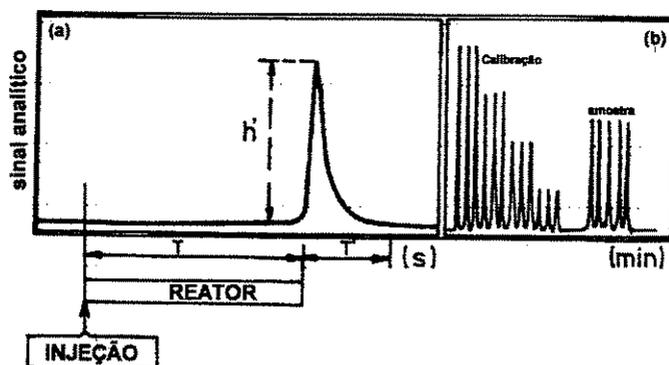
químico (reação completa) são necessariamente alcançados. Quando o sistema FIA foi divulgado, causou um grande impacto no contexto da Química Analítica, desde seu simples fundamento, passando pelo baixo custo da instrumentação, até a conveniente operação com obtenção de resultados surpreendentes, pois este método pode ser bastante reprodutível em condições instáveis. Além disso, apresenta limites de detecção da ordem de  $\mu\text{g L}^{-1}$  e  $\text{ng L}^{-1}$ , de acordo com a concentração normalmente encontrada nas amostras (Clark et al, 1990).

A Figura 3.10 mostra um sistema FIA simplificado e esquematizado.



**Figura 3.10:** Sistemas FIA em linha única, onde a amostra (A) é injetada num fluxo carregador (FC), movimentado por uma bomba peristáltica (BP), passando por um reator (R), detectada em um detector (D) e descartada no descarte (L'). Fonte: Clark et al, 1990.

Neste sistema de detecção, um sinal transiente é obtido e pode ser registrado em diferentes velocidades, como mostrado na Figura 3.11.



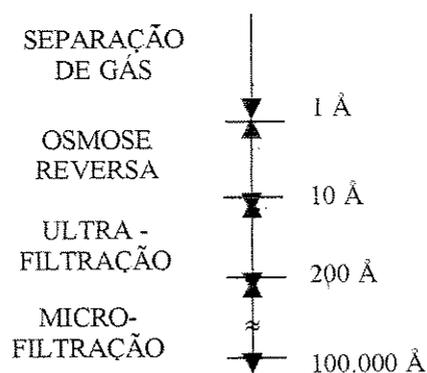
**Figura 3.11:** Esquema do sinal obtido no sistema FIA para diferentes velocidades (a) rápida, (b) velocidade usual com injeções realizadas em triplicata para construção da curva de calibração, e quintuplicata para a amostra, onde  $h'$  é a altura do sinal;  $T$  é o tempo de residência, e  $T'$  o tempo de retorno. Fonte: Boza et al., 1985.

A altura do pico,  $h'$ , está relacionada à concentração do analito, ou seja, da substância que está sendo determinada; o tempo de residência,  $T$ , é relacionado ao tempo em que a amostra está no reator, isto é, entre o momento da injeção da amostra no sistema e o início do sinal; o tempo de retorno,  $T'$ , é o tempo que o sistema precisa para voltar à situação inicial (à linha-base) (Boza et al., 1985).

As técnicas de análise em fluxo contínuo apresentam, normalmente, alta frequência analítica (número de amostras analisadas por determinado tempo), baixo consumo de amostras e reagentes, alta precisão e/ou exatidão, alta sensibilidade e baixo custo de equipamentos e operação. Além disso, apresentam alta versatilidade, podendo, numa mesma amostra, ser realizadas várias determinações simultâneas, além da possibilidade de se trabalhar com amostras de alta viscosidade, turvas, que apresentam particulados, etc (Horvai e Pungor, 1987).

Para aumentar a seletividade na determinação de uma espécie de interesse, usando FIA, inúmeros processos de separação têm sido explorados. Dentre eles, a separação por precipitação, extração por solventes, diálise e difusão. De todas essas técnicas de separação, a difusão através de membranas semipermeáveis tem sido considerada como altamente seletiva, visto que poucas espécies são geradas como gases à temperatura ambiente, diminuindo, de modo considerável, o problema de interferentes (Montomizu et al; 1987).

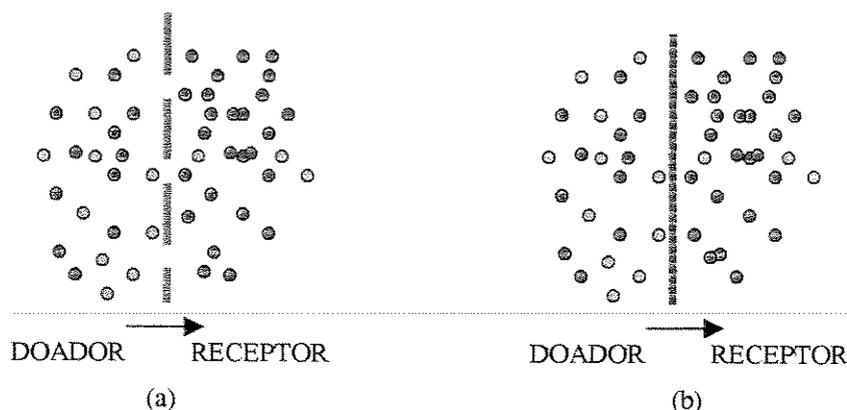
A tecnologia de membranas para a separação de fluxos contendo líquido/líquido e líquido/sólido foi (e tem sido) praticada na indústria por anos, através da osmose reversa, ultrafiltração e microfiltração entre outras aplicações. Na Figura 3.12, tem-se uma representação da porosidade de membranas e os processos de utilização envolvidos.



**Figura 3.12:** Esquema da porosidade de membranas utilizadas em vários processos. Fonte: adaptado de Montomizu, 1987.

O progresso nessa área gradualmente direcionou esforços em pesquisas para o desenvolvimento de membranas adequadas para a separação de gases (Spillman e Sherin, 1990).

Dois tipos de membranas podem ser empregados na separação de gases. A primeira é a porosa, na qual os gases são separados, com base na sua massa molar, por pequenos poros através da membrana, como mostrado na Figura 3.13(a). A vasta maioria das aplicações comerciais é baseada em membranas não porosas. Elas não contem nenhum poro e funcionam baseadas no princípio de que gases se dissolvem e difundem através de materiais sólido, conforme ilustrado na Figura 3.13(b).



**Figura 3.13:** Esquema de uma membrana porosa (a) e membrana não porosa (b). Fonte: adaptado de Spillman e Sherin, 1990.

A grande maioria dos sistemas FIA acoplados a unidades de difusão gasosa usam meio líquido (frequentemente aquoso), ou seja, os gases gerados no fluxo dito doador são difundidos pela membrana semipermeável e absorvidos por um fluxo líquido receptor. A grande maioria dos trabalhos utilizam filmes confeccionados em polímeros, tais como Teflon<sup>®</sup> (PTFE = politetrafluoretileno), polipropileno (van der Linden, 1983) e silicone (Kubán, 1992; Gonzalo, et al, 1992).

Dentre as diversas aplicações do sistema FIA em análises ambientais, este sistema tem sido utilizado na determinação de poluentes catiônicos e aniônicos em águas; determinação de demanda química de oxigênio (DQO), tanto no método realizado com dicromato de potássio quanto no realizado com

permanganato de potássio, e na determinação de outras espécies orgânicas poluentes, monitorando a qualidade do meio ambiente. A frequência analítica depende da substância que está sendo estudada e do sistema detector utilizado, por exemplo:  $Mg^{+2}$ , 80 amostras por hora;  $Ca^{+2}$ , com detecção colorimétrica, a frequência analítica é igual a 80 amostras/hora; com detecção potenciométrica, a frequência passa a ser entre 100 e 110 amostras por hora (Boza et al., 1985)

O sistema FIA para determinação condutométrica do  $CO_2$  pode ser utilizado na determinação de carbono inorgânico dissolvido em águas naturais. No trabalho apresentado por Jardim e colaboradores, o limite de detecção deste sistema foi de  $3 \mu mol CO_2 L^{-1}$  para uma frequência analítica de 60 amostras hora<sup>-1</sup>. Ainda neste trabalho, os valores de carbono inorgânico dissolvido foram calculados via pH e alcalinidade para efeito de comparação. Os resultados obtidos no sistema FIA foram sistematicamente inferiores aos obtidos potenciometricamente. Esse fato pode ser atribuído à presença de outros protólitos (exceto carbonatos), não interferentes na determinação feita pelo sistema FIA com detecção condutométrica (Jardim et al., 1991).

Este mesmo sistema FIA, com detecção condutométrica, foi utilizado na realização de testes de toxicidade aguda, usando *E. coli* (Guimarães, 1990). Nestes ensaios, a produção de  $CO_2$  foi monitorada pelo sistema FIA. Na oportunidade, testou-se o efeito de íons metálicos (Cd(II), Cu(II) e Hg(II)), sedimentos e um tipo de antibiótico (Bactrin).

Neste sistema injeta-se a amostra aquosa em um fluxo de água deionizada o qual conflui com um fluxo carregador de ácido sulfúrico  $0,2 mol L^{-1}$ , com a finalidade de provocar a formação da espécie de interesse,  $CO_2$ , visto que em meio aquoso ele pode apresentar-se em outras formas:  $H_2CO_3^*$ ,  $HCO_3^-$  e  $CO_3^{2-}$ . Quando o fluxo passar por uma membrana semipermeável de Teflon<sup>®</sup>, parte do  $CO_2$  permeará por ela, para um fluxo de água deionizada, monitorada continuamente, alterando sua condutividade. Esta alteração se processa de forma transiente, sendo registrada como um pico (Guimarães, 1990).

A justificativa para a realização deste trabalho é encontrada ao se analisar a importância da realização de ensaios de respirometria através da determinação do dióxido de carbono produzido; assim como as facilidades e vantagens existentes na determinação de CO<sub>2</sub> utilizando o sistema FIA com detecção condutométrica; frente aos outros métodos de determinação da concentração de CO<sub>2</sub>.

## **4. Metodologia**

De modo a satisfazer o objetivo proposto neste projeto, a parte experimental do trabalho foi dividida em três etapas, enumeradas a seguir: 1) adaptação e otimização do sistema FIA-condutométrico utilizado no projeto; 2) comparação entre a análise de CO<sub>2</sub> por titulação ácido-base e FIA-condutométrico; e 3) ensaios de respirometria, seguindo o Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com determinação da concentração de CO<sub>2</sub> utilizando titulação e sistema FIA-condutométrico.

### **4.1 Adaptação e otimização do sistema FIA-condutométrico**

Com o intuito de se otimizar o sistema FIA utilizado neste projeto, estudou-se parâmetros operacionais e experimentais, apresentados no decorrer desta seção.

### 4.1.1 Reagentes

- Água deionizada (Milli-Q)
- Ácido sulfúrico concentrado:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Merck);
- Cloreto de bário:  $\text{BaCl}_2$  (J. T. Baker);
- Hidróxido de potássio em lentilhas:  $\text{KOH}$  (Merck);
- Bicarbonato de sódio:  $\text{NaHCO}_3$  (Cinética Química);

### 4.1.2 Soluções estoque

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  com concentrações entre 0,1 e 1,5  $\text{mol L}^{-1}$ , em intervalos de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$
- $\text{BaCl}_2$  0,5  $\text{mol L}^{-1}$ ;
- $\text{KOH}$  0,40  $\text{mol L}^{-1}$ ;
- $\text{NaHCO}_3$  0,1  $\text{mol L}^{-1}$ ,

### 4.1.3 Equipamentos e Acessórios

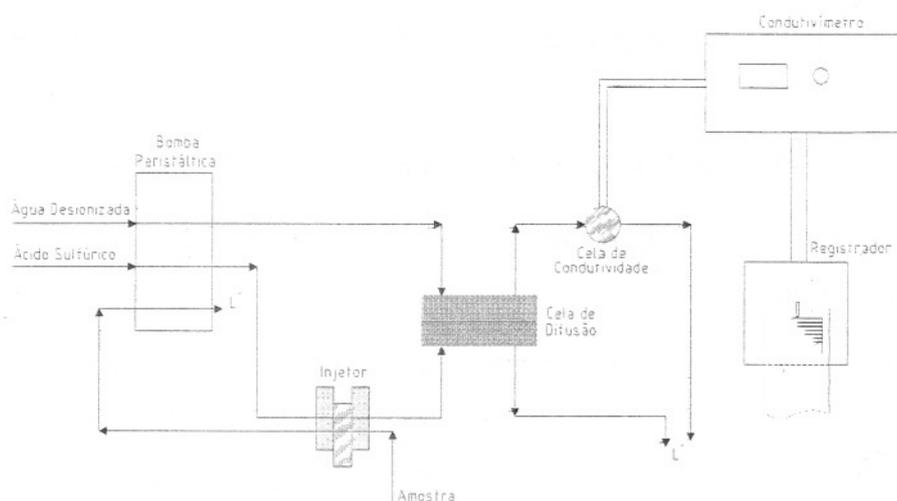
- Bombas peristáltica ISMATEC, modelo MS Reglo;
- Condutímetro MICRONAL, modelo B330;

- Registrador ECB, modelo RB 201;
- Válvula de injeção/comutação (volume de injeção = 100  $\mu$ L);
- Cella de condutividade constituída de dois cilindros concêntricos (volume = 50  $\mu$ L);
- Cella de difusão (profundidade = 0,1 mm; largura 3 mm e comprimento 100 mm; volume = 0,03  $\mu$ L);
- Deionizador de água MILLIPORE, modelo Milli-Q Académic;
- Membrana de Teflon DVGW, 0,10 mm de espessura e 18,0 mm de largura (made in Germany);
- Condutores de reagentes:
  - ☞ sonda de polietileno, CPL medical's com diâmetro interno = 0,8 mm;
  - ☞ tubos de Tygon com diâmetro interno = 1,14 mm (vermelho - fluxo receptor) e 0,89 mm (laranja - fluxo carregador);
- Pipetas automáticas:
  - ☞ (40 – 200  $\mu$ L) LABSYSTEMS,
  - ☞ (200 – 1000  $\mu$ L) LABSYSTEMS

#### 4.1.4 Sistema FIA utilizado

No sistema desenvolvido por Guimarães (1990), a amostra contendo  $\text{CO}_2$  era injetada em um fluxo de água deionizada que confluía com o fluxo carregador de ácido sulfúrico, seguindo então para a cela de difusão e posterior descarte. Neste projeto adaptou-se este sistema FIA, para um em linha única, mostrado na Figura 4.1. Este sistema apresenta vantagens como tempo de

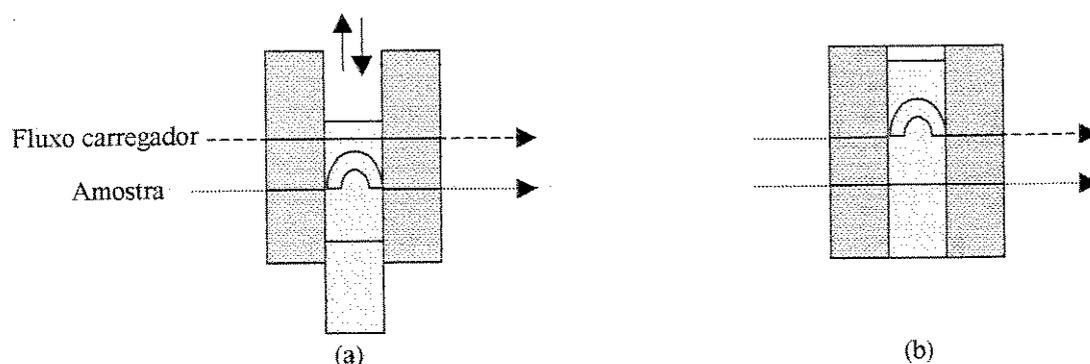
resposta mais curto e economia de reagentes, além de evitar o problema de refluxo que pode ocorrer na confluência dos fluxos utilizados



**Figura 4.1:** Esquema do sistema de Análise de Injeção em Fluxo utilizado para a determinação da concentração de  $\text{CO}_2$  com detecção condutométrica, onde  $L'$  - descarte.

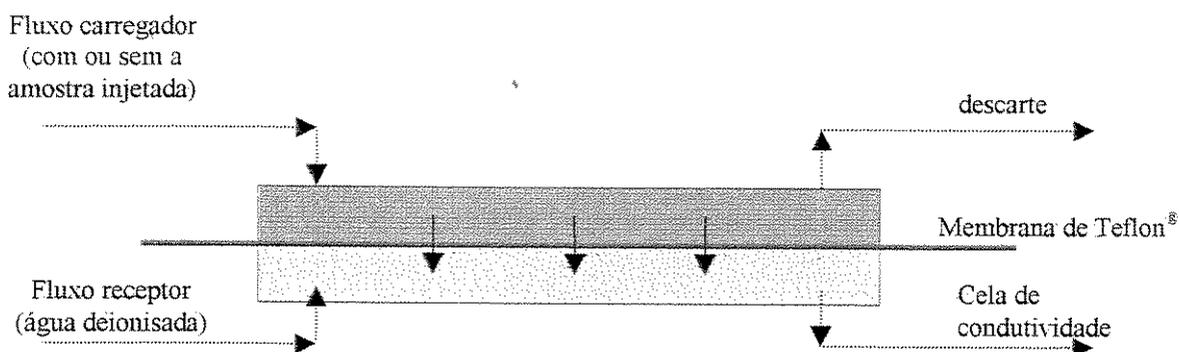
Neste sistema FIA com detecção condutométrica representado na Figura 4.1, a amostra é introduzida diretamente no fluxo carregador com a utilização de um injetor/comutador. O injetor/comutador é constituído de duas partes, uma móvel e outra fixa, como representado na Figura 4.2. A parte móvel contém uma alça de polietileno, cujo volume, conhecido, será o injetado no fluxo carregador. Esta parte móvel pode estar em duas posições, (a) e (b). Na posição (a), o fluxo de amostra irá passar pela alça, enchendo-a com a solução de interesse. Assim que o fluxo de amostra passar, o sistema estará pronto para ser injetado no fluxo carregador. Isso vai acontecer colocando a parte móvel do injetor na posição (b). Nessa posição, o fluxo carregador é obrigado a passar pela alça, que contém determinado volume de amostra, fazendo com que a solução de interesse se

disperse no fluxo carregador, com o qual fluirá conjuntamente, passando pelos outros componentes do sistema (no caso do sistema condutométrico, uma cela de difusão e posterior descarte). Para recarregar a alça, basta voltar o injetor à posição (a). Neste estudo foi utilizado alça de injeção de volume igual a  $100\mu\text{L}$ , onde o sinal obtido apresentava intensidade significativa para sua medida e vazão iguais a  $1,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para fluxo carregador,  $3,2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para o fluxo receptor e  $1,6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  para a amostra. A velocidade da bomba utilizada foi igual a 25 para todas as linhas de fluxo utilizadas.



**Figura 4.2:** Esquema do injetor de acrílico utilizado no sistema FIA, onde  $\blacksquare$  - fixo;  $\square$  - móvel;  $\frown$  - alça que contém o volume de amostra a ser injetado, para (a) situação onde a alça está sendo abastecida com o fluxo de amostra, e (b) situação onde esta amostra é introduzida no fluxo carregador do sistema.

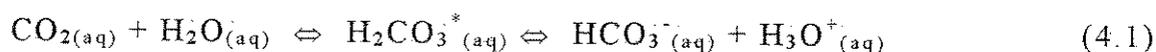
No caso do sistema FIA com detecção condutométrica para determinação do  $\text{CO}_2$ , o fluxo carregador passa por uma cela de difusão. Nesta encontram-se dois fluxos separados por uma membrana semipermeável de Teflon<sup>®</sup>, sendo um o fluxo carregador, e o outro, fluxo receptor. A cela de difusão está representada na Figura 4.3.



**Figura 4.3:** Esquema da cela de difusão utilizado no sistema FIA-condutométrico.

O fluxo de água deionizada é monitorado constantemente com uma cela de condutividade conectada em um condutivímetro. Dessa forma, qualquer alteração que ocorra será registrada. Como essa variação será transitória, apenas para aquele determinado ponto do fluxo que está fluindo pela cela de condutividade, o sinal obtido será em forma de pico, resultado de um sinal transiente.

A alteração na condutividade do fluxo receptor é causada pela reação da espécie de interesse com a água deionizada, que permeia através da membrana de Teflon®. No caso da determinação do  $\text{CO}_2$  aquoso, por exemplo, a amostra contendo a espécie de interesse será injetada em um fluxo carregador, sendo este uma solução de ácido sulfúrico  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ . O mencionado fluxo tem a função de deslocar o equilíbrio da reação descrita na Equação 4.1 no sentido de formação do  $\text{CO}_2$ .



Em meio aquoso, o  $\text{CO}_2$  interage com a água, formando o ácido carbônico, espécie instável, que rapidamente se decompõe em  $\text{H}_3\text{O}^+$  e bicarbonato, sendo este último estável. Em meio ácido, neste caso o fluxo carregador, o equilíbrio será deslocado no sentido da formação do dióxido de carbono, a espécie de interesse. Este irá permear através da membrana de Teflon<sup>®</sup> utilizada, reagindo com o fluxo de água deionizada. Conseqüentemente, o fluxo receptor terá seu equilíbrio deslocado no sentido da formação de bicarbonato. Dessa forma, sua condutividade sofrerá uma variação proporcional à concentração do  $\text{CO}_2$  presente na amostra: para uma concentração maior, será registrado um maior pico, e vice-versa.

Para que seja possível determinar a concentração do dióxido de carbono nas amostras analisadas pelo sistema FIA proposto, é necessária a construção de curvas de calibração, isto é; amostras contendo concentrações conhecidas da espécie de interesse serão analisadas. Como o sinal obtido é proporcional à concentração do  $\text{CO}_2$ , tem-se um gráfico da intensidade do sinal obtido em função da concentração de dióxido de carbono. Através de ajustes matemáticos, serão obtidos os parâmetros variáveis para a função que se ajusta aos dados obtidos, fornecendo assim uma equação. Esta última será utilizada em cálculos para obtenção da concentração de  $\text{CO}_2$  na amostra:

Dentre os ajustes matemáticos já estudados para este sistema, o modelo que melhor representa os dados resultantes das soluções-padrão é representado na Equação 4.2:

$$Y = AX^B \quad (4.2)$$

onde: Y é a intensidade do sinal;

X é a concentração de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ),

A e B são parâmetros ajustáveis.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

Quando este modelo é linearizado, é obtida nova expressão matemática, representada na Equação 4.3:

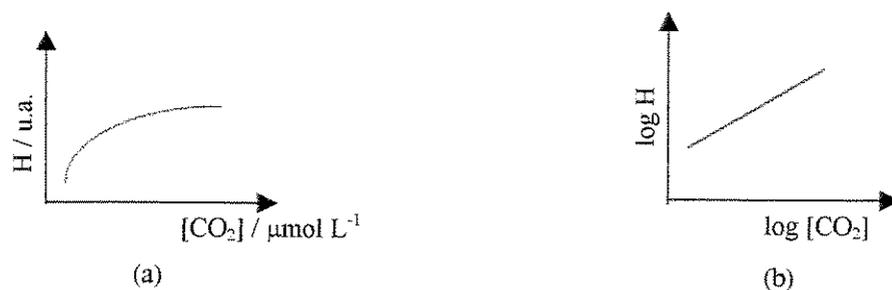
$$\log Y = \log A + B \log X \quad (4.3)$$

onde:  $\log Y$  é o logaritmo da intensidade do sinal;

$\log X$  é o logaritmo da concentração de  $\text{CO}_2$  ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ); e

$\log A$  e  $B$  são parâmetros ajustáveis.

Os gráficos obtidos para as duas equações apresentadas podem ser verificados na Figura 4.4.



**Figura 4.4:** Curvas obtidas para os ajustes matemáticos que melhor representam os dados resultantes para as soluções-padrão, sendo a) para Equação 4.2 onde:  $Y = A X^B$  e b) para a Equação 4.3 onde:  $\log Y = \log A + B \log X$ .

Foi através destes modelos que as concentrações de  $\text{CO}_2$  das amostras analisadas pelo sistema FIA utilizado foram calculadas.

#### 4.1.5 Estudo do efeito da diluição das soluções analisadas

A partir da solução estoque de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  preparou-se soluções diversas com concentrações entre  $0,0$  e  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , em intervalos de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , tendo solução de  $\text{KOH}$  como solvente. Analisou-se estas soluções no sistema FIA utilizado neste projeto, e a partir dos resultados obtidos testou-se diluições destas amostras, de modo a garantir uma melhor curva de calibração, eliminando ou minimizando problemas de absorção de  $\text{CO}_2$  da atmosfera, uma vez que não foi utilizado ambiente isento de  $\text{CO}_2$ . Testou-se as diluições 1:3 e 1:10 de amostra em água deionizada. Para este teste utilizou-se como fluxo carregador  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ .

#### 4.1.6 Influência do solvente utilizado

Devido a alteração do solvente utilizado, de água para solução de  $\text{KOH}$   $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ , analisou-se a influência desta alteração na intensidade do sinal obtido. Para isso, preparou-se, a partir da solução estoque de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , soluções nas seguintes concentrações: 1,77; 3,54; 7,08; 8,85; 10,62 e  $14,16 \text{ mmol L}^{-1}$ , utilizando água e solução de  $\text{KOH}$  como solvente, sendo estas últimas diluídas 1:10 de amostra em água deionizada, e fluxo

carregador de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . Todas as amostras foram analisadas usando o sistema FIA com detecção condutométrica.

#### 4.1.7 Influência do $\text{BaCl}_2$

A partir da solução estoque de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  preparou-se soluções com as seguintes concentrações: 0,14; 0,53; 0,89; 1,77; 3,54; 7,08; 8,85; 10,62 e 14,16  $\text{mmol L}^{-1}$ , tendo solução de KOH como solvente. Estas amostras foram diluídas 1:10 de amostra em água deionizada, fluxo carregador de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  e analisadas usando o sistema FIA com detecção condutométrica. Em seguida, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em cada amostra (na proporção recomendada pelo Projeto de Norma adotado), sendo realizada nova leitura no sistema FIA utilizado.

#### 4.1.8 Efeito da concentração do fluxo carregador ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Com a finalidade de observar o efeito da concentração do fluxo carregador no sinal obtido, preparou-se soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com concentrações entre 0,1 e 1,5  $\text{mol L}^{-1}$ , em intervalos de 0,1  $\text{mol L}^{-1}$ . Estas soluções foram utilizadas como fluxo carregador na análise da solução estoque de KOH (sem adição de solução de bicarbonato de sódio); diluída em 1:10 de amostra em água deionizada, espera-se o sistema atingir a situação de equilíbrio após a troca do fluxo carregador usado no sistema FIA descrito anteriormente. O equilíbrio foi

determinado pelo registro de uma linha de base estável, por conseguinte, só diante desta situação a amostra foi analisada.

#### 4.1.9 Efeito da distância entre o injetor e a cela de difusão ( $D_{i-cd}$ )

Realizou-se este estudo em duas etapas: a primeira onde variou-se a distância  $D_{i-cd}$  em função da concentração do fluxo carregador, a segunda, na qual variou-se a distância  $D_{i-cd}$  em função da concentração das soluções de  $\text{NaHCO}_3$ .

Na primeira etapa, utilizou-se como fluxo carregador soluções de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com concentrações variando entre 0,1 e 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ , com intervalos de 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , sendo as distâncias  $D_{i-cd}$  iguais a 8,00; 11,00; 14,00; 20,00; 27,50 e 39,00 cm. Analisou-se amostras de solução estoque de KOH diluídas 1:10 de amostra em água deionizada após o sistema atingir a situação de equilíbrio depois das trocas, tanto do fluxo carregador, como da distância  $D_{i-cd}$ .

Para a realização da segunda etapa, utilizou-se  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,4 mol  $\text{L}^{-1}$  como fluxo carregador, e como amostras soluções de  $\text{NaHCO}_3$  com concentrações iguais a 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ , tendo solução de KOH como solvente. Estas amostras foram diluídas 1:10 de amostra em água deionizada e analisadas no sistema FIA utilizado neste projeto, para as mesmas distâncias  $D_{i-cd}$  testadas anteriormente.

#### 4.1.10 Purificação do KOH

Com a finalidade de verificar a contaminação da solução estoque de KOH com  $\text{CO}_2$  (espécie cuja concentração é determinada no sistema FIA utilizado), adicionou-se algumas gotas de solução de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  para a formação de  $\text{BaCO}_3$  à uma amostra de solução estoque citada. Diante dos resultados obtidos realizou-se o procedimento de dois métodos de purificação de KOH, com a intenção de eliminar a espécie indesejada na solução estoque utilizada. Estes métodos de purificação foram escolhidos devido a simplicidade do procedimento a ser realizado (VOGEL, 1986). São eles:

1) preparo de um “xarope” onde foi utilizada uma solução 50% em massa de água e KOH em lentilhas, a qual foi deixada em repouso por 48 horas. Depois disto, o “xarope” foi filtrado e rapidamente diluído a uma concentração de  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  e armazenado em frasco de plástico, evitando longa exposição ao ar e, conseqüente absorção de  $\text{CO}_2$  que nele se encontra pela solução recém-purificada, e

2) lavagem das lentilhas utilizadas no preparo da solução estoque, eliminando assim o  $\text{CO}_2$  absorvido na superfície das mesmas, diluindo e armazenando a solução recém-preparada, como no procedimento de purificação anterior.

Realizou-se novamente testes qualitativos nas soluções recém purificadas com a adição de algumas gotas de solução de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e diluiu-se alíquotas destas soluções recém purificadas em 1:10 que foram analisadas no sistema FIA aqui utilizado:

#### 4.1.11 Armazenamento das soluções preparadas para a construção da curva de calibração

Numa primeira etapa, preparou-se soluções de  $\text{NaHCO}_3$  com concentrações iguais a 1,77; 3,54; 7,08; 8,85; 10,62 e 14,16  $\text{mmol L}^{-1}$ , utilizando água e solução de KOH como solvente. Diluiu-se as amostras que possuíam KOH como solvente na proporção 1:10 de amostra em água deionizada. Todas as amostras foram analisadas usando o sistema FIA com detecção condutométrica onde o fluxo carregador foi  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,4  $\text{mol L}^{-1}$  e armazenadas em frascos plásticos à temperatura ambiente (25 °C). As soluções foram analisadas novamente após um período de 24 horas.

Na segunda etapa preparou-se soluções de  $\text{NaHCO}_3$  com concentrações iguais a 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0; 8,0; 10,0; 15,0 e 20,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , tendo solução de KOH como solvente, sendo estas diluídas em 1:10. As amostras foram analisadas usando o sistema FIA com detecção condutométrica e armazenadas durante 4 dias em frascos plásticos sob refrigeração (10 - 15 °C). As soluções foram analisadas diariamente usando o sistema FIA descrito anteriormente.

## 4.2 Titulação ácido-base

A titulação ácido-base utilizada neste projeto foi baseada no procedimento recomendado no Projeto de Norma adotado.

### 4.2.1 Reagentes

- Água deionizada (Milli-Q)
- Ácido clorídrico concentrado: HCl (Merck);
- Cloreto de bário: BaCl<sub>2</sub> (J. T. Baker);
- Hidróxido de potássio em lentilhas: KOH (Merck);
- Bicarbonato de sódio: NaHCO<sub>3</sub> (Cinética Química);
- Indicador: fenolftaleína

### 4.2.2 Soluções estoque

- HCl 0,41 mol L<sup>-1</sup>;
- BaCl<sub>2</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>;
- KOH 0,40 mol L<sup>-1</sup>;
- NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>,

### 4.2.3 Equipamentos e Acessórios

- Micro bureta (2 mL) GILMONT, modelo S-1200 A;

- Agitador magnético FISATON;
- Deionizador de água MILLIPORE, modelo Milli-Q Académic;
- Pipetas automáticas: ☞ (40 – 200  $\mu\text{L}$ ) LABSYSTEMS,  
☞ (200 – 1000  $\mu\text{L}$ ) LABSYSTEMS

#### 4.2.4 Princípio e procedimento experimental

Na titulação realizada, se deseja determinar a concentração do KOH, pois assim, pode-se saber quanto de base reagiu com o  $\text{CO}_2$  no interior do respirômetro. Para isso, foi adicionada a solução de cloreto de bário, cuja finalidade é retirar a interferência causada pelo carbonato presente na solução, promovendo a sua precipitação na forma de carbonato de bário (sal insolúvel).

A presença deste íon ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) é consequência da reação que ocorre entre o dióxido de carbono e a água (Equação 4.1). Com essa espécie em solução, maior quantidade de ácido será utilizada durante a quantificação da concentração de KOH que a realmente necessária, pois também reagirá com o  $\text{H}^+$  adicionado durante a titulação. Dessa forma o resultado obtido será alterado, conduzindo a um erro na determinação e, conseqüentemente, na conclusão final.

Para isso, adaptou-se o procedimento apresentado no Projeto de Norma utilizado como referência; no que diz respeito às quantidades de amostras e reagentes utilizados, que foram reduzidos à 1/10 da quantidade sugerida.

Desta forma, a amostra titulada consistia em 1,0 mL de solução-padrão recém-preparada. A esse volume de amostra, foi adicionado 3,0 mL de água deionizada, a fim de promover a mesma diluição utilizada no método descrito pelo Projeto de Norma adotado, além do indicador (duas gotas de fenolftaleína) e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

Como amostras foram utilizadas soluções de  $\text{NaHCO}_3$  de diversas concentrações, preparadas a partir da solução estoque de mesmo soluto, de concentração  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , tendo solução de  $\text{KOH}$  como solvente. Como titulante foi utilizado uma solução de  $\text{HCl}$   $0,41 \text{ mol L}^{-1}$ , previamente padronizado, que foi adicionado à amostra lentamente, com agitação, até que a mudança de cor da solução que está sendo titulada, de rosa para incolor, fosse verificada.

### **4.3 Comparação da análise de $\text{CO}_2$ utilizando titulação ácido-base e FIA-condutométrico**

Esta etapa do trabalho teve intenção de comparar os resultados obtidos por titulação e usando o sistema FIA, previamente otimizado.

#### **4.3.1 Simulando um ensaio de respirometria**

A partir da solução estoque de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , preparou-se soluções nas seguintes concentrações: 0,0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8; 3,2; 3,6 e  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , utilizando solução de  $\text{KOH}$  como solvente. Destas amostras foram

retiradas alíquotas que foram tituladas seguindo a adaptação realizada e alíquotas que foram diluídas segundo determinado anteriormente e posteriormente analisadas no sistema FIA com detecção condutométrica aqui utilizado.

Diante dos resultados obtidos, simulou-se um ensaio de respirometria onde volumes de solução estoque de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados conforme descrito a seguir, sendo o volume final igual a 2,5 mL:

- Branco:  $V_{\text{bicarbonato}} = 0 \text{ mL}$ ;
- Respirômetro controle:  $V_{\text{bicarbonato}} = 80 \text{ }\mu\text{L}$ ;
- Respirômetro teste 1:  $V_{\text{bicarbonato}} = 160 \text{ }\mu\text{L}$ ; e
- Respirômetro teste 2:  $V_{\text{bicarbonato}} = 240 \text{ }\mu\text{L}$ .

#### **4.3.2 Cálculos utilizados nas determinações da quantidade de $\text{CO}_2$ gerado em cada respirômetro, e $\text{CO}_2$ biodegradado**

Os cálculos da quantidade de  $\text{CO}_2$  gerado em cada respirômetro, e  $\text{CO}_2$  biodegradado ( $(\text{CO}_2)_b$ ) para os testes realizados via titulação, foram feitos essencialmente utilizando duas maneiras, com o intuito de se estabelecer uma comparação entre ambas:

- i)* usando a fórmula apresentada no Projeto de Norma adotado, e
- ii)* quimicamente, usando relações estequiométricas e regras de diluição (que também foi utilizado nas determinações utilizando sistema FIA).

Considerando os cálculos envolvidos na maneira *i)*, foi necessário quantificar o  $\text{CO}_2$  gerado no interior dos respirômetros. Utilizando então a

fórmula apresentada no Projeto de Norma da ABNT, determinou-se tal quantidade, em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$ . Esta fórmula é dada pela Equação 4.4.

$$\text{CO}_2 = (A-B) \times 50 \times f_{\text{HCl}} \quad (4.4)$$

onde: A: volume de HCl gasto para titular o branco, em mL;

B: volume de HCl gasto para titular o respirômetro, em mL;

50: fator para transformar equivalente em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{CO}_2$ , e

$f_{\text{HCl}}$ : fator do HCl =  $\frac{M_{\text{real}}}{M_{\text{teórica}}}$ , sendo M a molaridade do HCl.

Já o cálculo do  $(\text{CO}_2)_b$  considerado nos vários respirômetros está representado na Equação 4.5. Os resultados obtidos serão  $\mu\text{mol}$  de  $(\text{CO}_2)_b$ .

$$(\text{CO}_2)_b = \text{CO}_{2\text{ RC}} - \text{CO}_{2\text{ RT}} \quad (4.5)$$

onde:  $\text{CO}_{2\text{ RC}}$ : quantidade de  $\text{CO}_2$  produzido no respirômetro-controle (RC), em  $\mu\text{mol}$ , e

$\text{CO}_{2\text{ RT}}$ : quantidade de  $\text{CO}_2$  produzido no respirômetro-teste (RT), em  $\mu\text{mol}$ .

Considerando agora os cálculos envolvidos no segundo modo de cálculo *ii*), foi necessário determinar o número de mols de  $\text{HO}^-$  da solução de KOH utilizada. Estes cálculos foram feitos para o *branco*, para o RC, bem como para o RT. Isto é mostrado nas Equações 4.6 e 4.7.

$$n_{\text{HO}^-} = n_{\text{HCl}} \quad (4.6)$$

onde:  $n_{\text{HO}^-}$ : número de mols de  $\text{HO}^-$ ; e

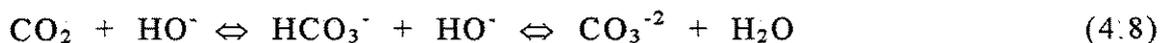
$n_{\text{HCl}}$ : número de mols de  $\text{HCl}$ .

$$n_{\text{HO}^-} = M_{\text{HCl}} V_{\text{HCl}} \quad (4.7)$$

onde:  $M_{\text{HCl}}$ : molaridade do  $\text{HCl}$ ; e

$V_{\text{HCl}}$ : volume de  $\text{HCl}$  utilizado na titulação, em L.

Em virtude da estequiometria da reação envolvida no processo (2 mols de  $\text{HO}^-$  para 1 mol de  $\text{CO}_2$ ), foi calculado a quantidade de  $\text{CO}_2$  em cada respirômetro, como mostrado nas Equações 4.8 e 4.9, respectivamente.



$$n(\text{CO}_2) = (n_{\text{HO}^- \text{ branco}} - n_{\text{HO}^- \text{ respirômetro}}) \times \frac{1}{2} \quad (4.9)$$

onde:  $n(\text{CO}_2)$ : número de mols de  $\text{CO}_2$  contidos na amostra titulada.

A quantidade de  $(\text{CO}_2)_b$  em cada respirômetro será obtida através da diferença entre o  $\text{CO}_2$  produzido no respirômetro-controle e o respirômetro-teste, como anteriormente mencionado (Equação 4.5).

Os resultados obtidos para  $(\text{CO}_2)_b$  por titulação serão comparados com os obtidos em uma análise no sistema FIA.

#### **4.4 Ensaios de respirometria seguindo o Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com determinação com FIA-conducométrico e titulação ácido-base.**

Nesta etapa, foi utilizado o respirômetro de Bartha, conforme descrito no Projeto de Norma da ABNT, já citado, determinando as concentrações de  $\text{CO}_2$  por titulação ácido-base, e utilizando FIA-conducométrico, já descritos anteriormente.

##### **4.4.1 Reagentes**

➤ D-Glucose Anidra P. A.:  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  (Ecibra)

#### 4.4.2 Equipamentos e Acessórios

- Respirômetro de Bartha (Figura 3.5),
- Incubadora BOD MARCONI, modelo MA-415;
- Bomba de ar FISKA, modelo Betta super II
- Seringa plástica 10 mL

#### 4.4.3 Solo utilizado

Nos ensaios realizados foi utilizado o solo predominante no município de Limeira, por se conhecer as características deste solo (Siviero, A. R., 1999):

- livre de resíduos tóxicos, evitando assim uma inibição do desenvolvimento dos microrganismos durante os ensaios realizados; e
- parâmetros químicos e físicos já determinados, pelo Laboratório ICASA – Campinas – S.P, mostrados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

O solo foi coletado de modo a garantir a presença de microrganismos aeróbios, ou seja, no máximo 25 cm de profundidade (Siviero, 1999). No laboratório, o solo foi seco ao ar livre (evitando a secagem total), peneirado em malha 0,2 mm e armazenado em sacos plásticos. Posteriormente foram utilizados nos ensaios realizados.

**Tabela 4.1:** Resultados das análises químicas do solo utilizado no experimento.

Valores das análises químicas										
%	pH		%	ppm		Micronutrientes (ppm)				
	CaCl <sub>2</sub>	Água		C	P	P res.	Fe	Mn	Cu	Zn
0,12	5,9	6,4	1,1	1,0	2,0	112,0	49,0	2,1	44,4	0,17
m eq / 100 mL TFSA										
K	Ca	Mg	Al	H	"S"	CTC	V(%)	S	Na	
0,24	5,7	1,2	--	1,0	7,14	8,25	86,5	12,2	5,0	

Fonte: Siviero, A. R., 1999.

**Tabela 4.2:** Resultados das análises físicas do solo utilizado no experimento.

Valores das análises físicas							
Composição Granulométrica (%)							
Areias					Classificação	Densidades	
Grossa	Fina	Argila	Limo	Cascalho		Aparente	Real
12,8	43,1	42,4	1,5	0,0	Argilo - arenoso	0,99	2,53

Fonte: Siviero, A. R., 1999.

#### 4.4.4 Ensaio de Respirometria

No procedimento adotado pela norma em questão, uma amostra de solo e o composto químico (ou uma mistura destes) que se quer avaliar são colocados no respirômetro, e uma solução de KOH é introduzida num compartimento apropriado (Figura 3.5). O sistema é colocado em uma incubadora a  $28 \pm 2$  °C; a partir daí, o CO<sub>2</sub> gerado é monitorizado em tempo pré-determinado, com maior frequência no início do ensaio, quando ocorre maior degradação da substância avaliada.

O composto químico aqui utilizado foi a glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>), um açúcar solúvel, considerado ótima fonte de carbono, por ser de fácil degradação pelos microrganismos presentes no solo.

Foram utilizados 12 respirômetros no total, distribuídos da seguinte forma: 3 respirômetros como controle, e 9 para os testes, sendo 3 para cada taxa de aplicação utilizada. No respirômetro-controle, é colocado o solo sem o composto químico a ser testado, pois ele indicará a atividade microbiana própria do solo que está sendo analisado. No respirômetro-teste, está presente o solo misturado ao composto químico estudado. Na obtenção dos resultados, a atividade microbiana própria do solo (*RC*) é descontada da obtida no *RT*, fornecendo, assim, apenas o crescimento relativo ao consumo do composto químico utilizado no estudo.

Foram utilizadas 3 taxas de aplicações distintas, sendo: 0,25; 0,50 e 1,01g de glicose / 50g de solo. O composto foi dissolvido em um mínimo de água para ser adicionado ao solo, que foram misturados para garantir uma distribuição homogênea, favorecendo um desenvolvimento microbiano por igual no interior dos respirômetros.

Neste procedimento, a solução de KOH é retirada com uma seringa, e colocada em um béquer. A atmosfera do reator é reoxigenada com ar isento de CO<sub>2</sub> utilizando a bomba de ar e uma nova solução alcalina é colocada no respirômetro.

Da solução de KOH retirada do respirômetro, foram realizadas determinações da concentração de CO<sub>2</sub> produzido usando para isso titulação e sistema FIA, ambos já descritos anteriormente.

A frequência das análises foram diárias, até o 14º dia, quando foram realizadas na seguinte frequência: 16º, 21º, 28º, 38º, 49º dias. Desta maneira, evitou-se uma excessiva absorção do CO<sub>2</sub> produzido pela solução alcalina, principalmente no início dos ensaios, devido a uma elevada produção deste gás pela alta concentração de nutrientes misturados ao solo. Desta forma, evitou-se a superação da capacidade de absorção da solução alcalina, saindo da faixa de pH do indicador utilizado, não permitindo a visualização do final da titulação.

## **5. Resultados e Discussão**

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante os estudos realizados no decorrer deste projeto.

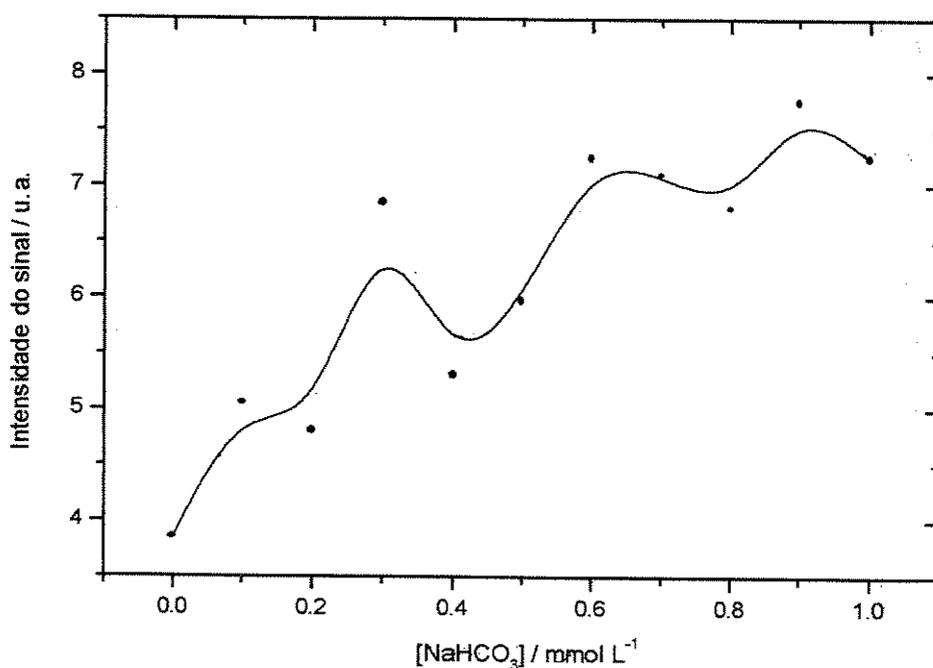
### **5.1 Adaptação e otimização do sistema FIA**

Nesta etapa foram realizados ensaios com o objetivo de otimizar o sistema analítico utilizado no presente projeto. Os parâmetros foram ajustados a partir dos resultados apresentados por Guimarães (1990, 1994) para o sistema FIA com detecção condutométrica e com confluência de soluções.

#### **5.1.1 Estudo do efeito da diluição das soluções analisadas.**

Para análises utilizando o sistema FIA, foi observado que a curva de calibração obtida para soluções de  $\text{NaHCO}_3$  recém-preparadas não apresentavam o comportamento esperado, ou seja, não havia uma certa linearidade. Devido aos

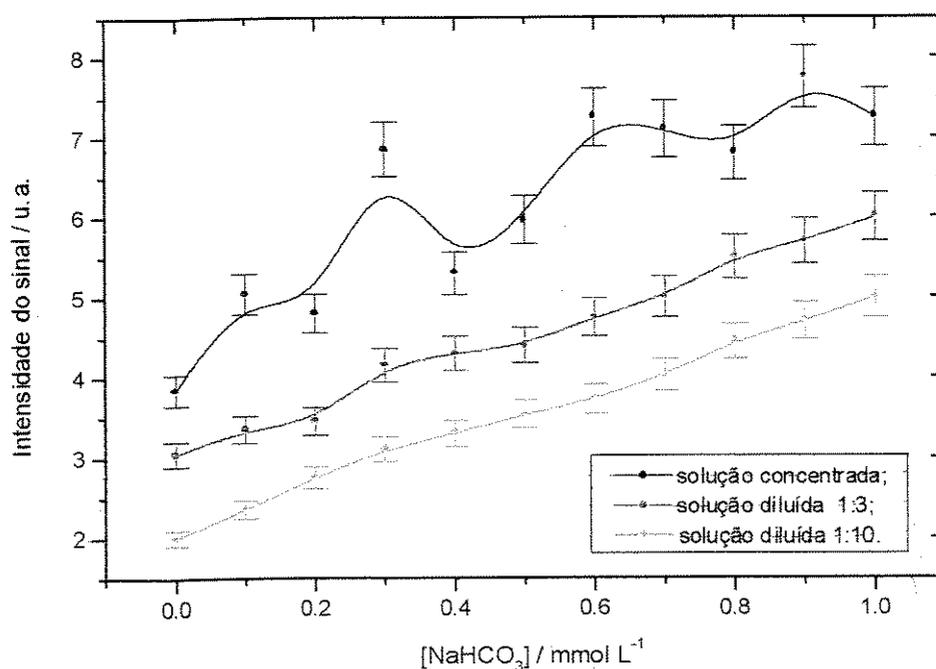
pontos obtidos estarem muito dispersos, foi necessária a eliminação de alguns deles para que não acarretasse muitos erros nas determinações de concentração da espécie de interesse das amostras analisadas. Os dados obtidos são mostrados na Figura 5.1. A linha cheia apresentada nas figuras deste capítulo não representam um ajuste matemático, mas simplesmente uma idéia do comportamento dos dados obtidos. A concentração do ácido sulfúrico utilizado foi igual a  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 5.1:** Gráfico obtido para a análise em sistema FIA das soluções de  $\text{NaHCO}_3$  recém-preparadas.

Este comportamento pode ser atribuído à característica que o solvente utilizado possui de absorver  $\text{CO}_2$ , pois é uma solução básica de  $\text{KOH}$ . Fato este que poderia estar ocorrendo durante o experimento, visto que os ensaios não eram realizados em ambiente controlado e isento de  $\text{CO}_2$ .

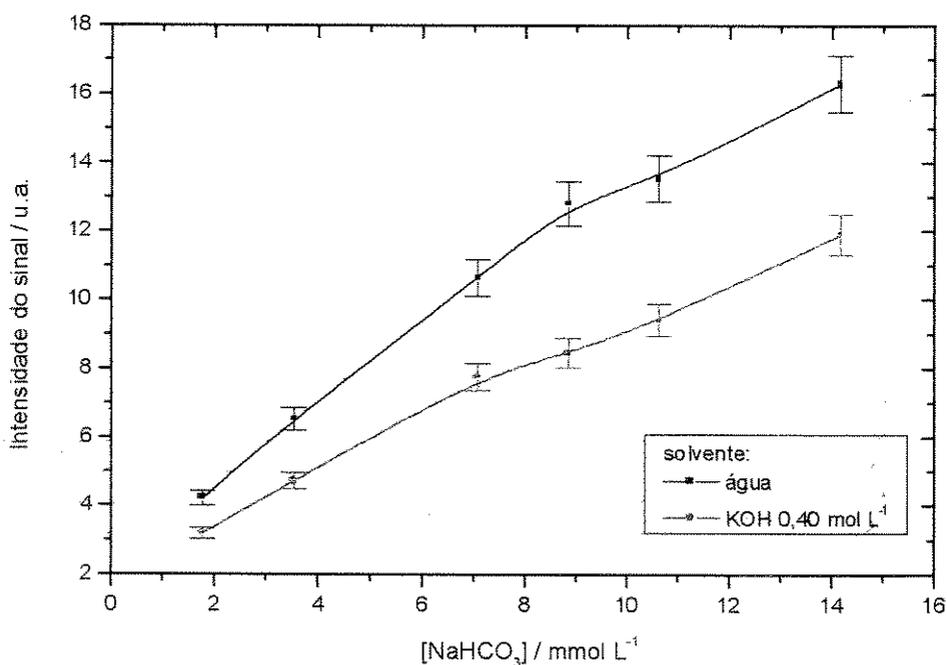
Para amenizar este efeito, foram realizados testes onde as soluções de  $\text{NaHCO}_3$  preparadas eram diluídas na proporção 1:3, conforme recomendado para a titulação no Projeto de Norma adotado. Utilizou-se também a diluição na razão de 1:10. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, uma vez que na diluição 1:3 este efeito foi atenuado. Já a diluição 1:10 apresentou um comportamento muito bom, eliminando consideravelmente o problema detectado. Ver Figura 5.2. Esta diluição passou a ser adotada, durante o projeto, para toda análise em sistema FIA, incluindo os ensaios de respirometria. O solvente utilizado era solução de  $\text{KOH}$   $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 5.2:** Gráfico obtido para a análise em sistema FIA das soluções de  $\text{NaHCO}_3$  recém-preparadas e diluídas 1:3 e 1:10 (conforme Projeto de Norma adotado).

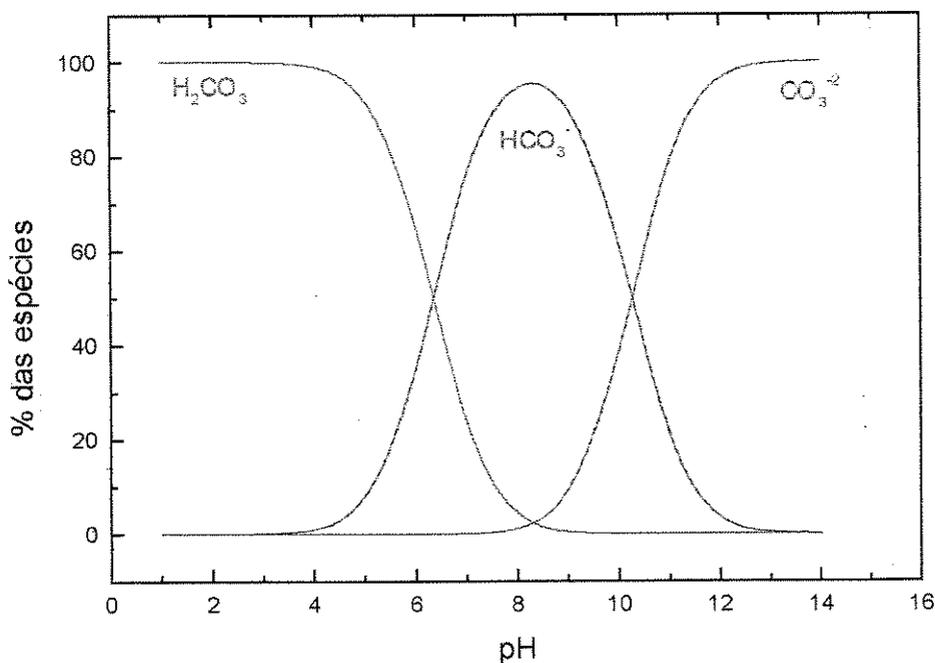
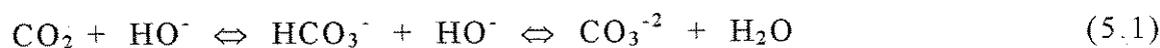
### 5.1.2 Influência do solvente utilizado

Com o intuito de verificar a alteração provocada pela mudança do solvente nos dados obtidos para amostras de mesma concentração de  $\text{NaHCO}_3$ , ou seja, de água para solução de  $\text{KOH}$   $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ , foi feita uma comparação entre os efeitos causados por eles nos sinais obtidos, como mostrado na Figura 5.3. A concentração do ácido sulfúrico utilizado foi igual a  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ .



**Figura 5.3:** Gráfico obtido no sistema FIA da intensidade do sinal vs concentração de  $\text{NaHCO}_3$  das amostras em função dos solventes utilizados.

Esta figura permite observar que o solvente utilizado no preparo da amostra interfere diretamente na intensidade do sinal obtido pelo sistema FIA, provocando uma diminuição no mesmo, no caso da solução básica. Este fato pode ser atribuído à reação que ocorre entre o solvente e o  $\text{NaHCO}_3$  presente na amostra. Como o meio onde a espécie de interesse se encontra possui  $\text{pH} > 7$  (básico), o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) adicionado reagirá com a hidroxila ( $\text{HO}^-$ ) presente em excesso no meio, deslocando o equilíbrio da reação no sentido de formar o carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), como mostrado pela Equação 5.1 e representado na Figura 5.4.

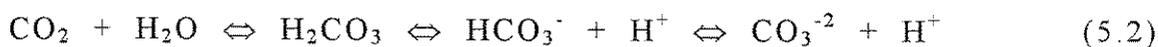


**Figura 5.4:** Gráfico do sistema carbonato-bicarbonato em função do pH.

Em meio aquoso, quando a amostra é injetada no sistema FIA, o fluxo carregador possui  $\text{pH} < 7$  (ácido) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e reage com o carbonato ( $\text{CO}_3^{-2}$ ) presente, deslocando o equilíbrio da reação no sentido de formação do ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) que rapidamente se decompõe em  $\text{CO}_2$  (gasoso) e água. O  $\text{CO}_2$  permeia a membrana de Teflon<sup>®</sup> reagindo com a água deionizada, alterando a condutividade da mesma. Esta variação na condutividade do fluxo receptor é registrado na forma de um pico (sinal transiente), onde sua intensidade será proporcional à quantidade da espécie de interesse contida na amostra.

Quando temos a presença de  $\text{KOH}$  no meio reacional, os cátions  $\text{H}^+$  reagirão com os ânions  $\text{HO}^-$  e carbonato. Este último irá fornecer como produto o bicarbonato, por sua vez também reagirá com os cátions  $\text{H}^+$  formando  $\text{H}_2\text{CO}_3$ . Diante destas possibilidades, haverá uma certa competição entre os ânions presentes no meio pelos cátions  $\text{H}^+$ , alterando assim a intensidade do sinal obtido. Também deve ser considerado o calor liberado durante as reações de neutralização, devido ao fato de poder afetar o equilíbrio envolvido.

O equilíbrio do sistema carbonato esta representado na Equação 5.2.



Para saber se as curvas de calibração obtidas para os diferentes solventes utilizados ( $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{KOH}$ ) fornecem resultados compatíveis, foram feitas as regressões lineares nas curvas obtidas. Para isso utilizou-se escala log em ambos os eixos, com o intuito de linearizar a curva obtida, conforme equação 4.3. Realizou-se leituras de amostras de iguais concentrações para os dois solventes

utilizados no preparo das curvas, e os resultados das concentrações obtidas pelas curvas de calibração foram comparados entre si. A diferença apresentada entre eles foi, aproximadamente, 2 % em ambas concentrações (5 e 10 mmol L<sup>-1</sup>) utilizadas neste teste. Na Tabela 5.1 são apresentados os resultados obtidos para as diferentes amostras analisadas, assim como o erro em relação à concentração que foram preparadas. É possível observar que o sinal das amostras que possuem solução de KOH como solvente apresentam menor intensidade quando comparadas com as amostras que possuem água.

**Tabela 5.1:** Dados obtidos para o teste preliminar da interferência do solvente utilizado.

Solvente utilizado	Amostra preparada com concentração igual a 5,0 mmol L <sup>-1</sup>			Amostra preparada com concentração igual a 10,0 mmol L <sup>-1</sup>		
	Intensidade do sinal / u. a.	Concentração obtida / mmol L <sup>-1</sup>	Erro relativo / %	Intensidade do sinal / u. a.	Concentração obtida / mmol L <sup>-1</sup>	Erro relativo / %
Água	8,35	4,99	2,0	13,20	9,96	4,0
KOH 0,40 mol L <sup>-1</sup>	6,00	4,98	4,0	9,30	9,98	2,0

### 5.1.3 Influência do BaCl<sub>2</sub>

Nesta seção abordou-se a influência do cloreto de bário nas análises realizadas pelo sistema FIA. Para tanto, foram preparadas amostras de

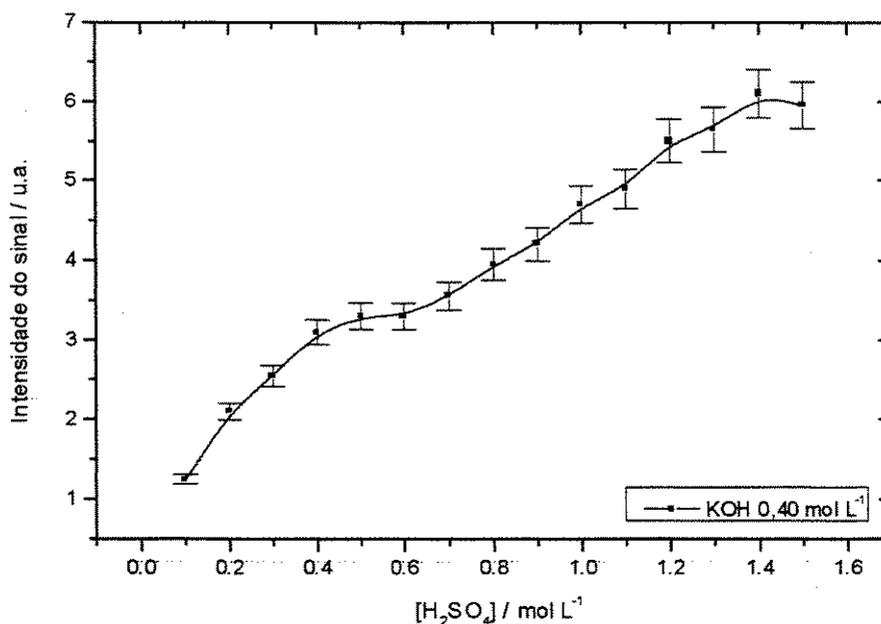
concentrações conhecidas de  $\text{NaHCO}_3$ , as quais após análise no sistema FIA, sofreram a adição de determinado volume da solução de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , conforme recomendado no Projeto de Norma da ABNT. Com isso foram analisadas novamente.

Com a adição do cloreto de bário, ocorreu a formação de um precipitado de cor branca, muito fino, devido a formação de carbonato de bário (sal insolúvel). Este composto impossibilitou as análises das amostras realizadas no sistema FIA, pois o sólido, mesmo após sua deposição no fundo dos recipientes, eram introduzidos no sistema juntamente com o sobrenadante, causando perfurações na membrana de Teflon<sup>®</sup> utilizada na cela de difusão. Além disso eram responsáveis por entupimentos do sistema.

Outro forte motivo para a sua não utilização é que o cloreto de bário ao reagir com o carbonato presente no meio vai estar retirando a espécie que está sendo analisada, uma vez que o sistema FIA que está sendo utilizado vem determinando justamente o carbonato presente no meio analisado.

#### 5.1.4 Efeito da concentração do fluxo carregador ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

Com o intuito de obter um melhor sinal nas análises no sistema FIA utilizado, foram realizados ensaios variando a concentração de ácido do fluxo carregador, onde a concentração do ácido sulfúrico se encontrava entre 0 e  $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ , em intervalos de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Para isso, foi utilizado a solução estoque de  $\text{KOH}$   $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ , diluídas 1:10. O resultado obtido está apresentado na Figura 5.5.



**Figura 5.5:** Estudo da variação da intensidade do sinal obtido em função da concentração de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para uma amostra da solução estoque de KOH 0,40 mol L<sup>-1</sup>.

Observando a Figura 5.5 pode-se notar que a medida que a concentração do fluxo carregador aumenta, o mesmo ocorre com a intensidade do sinal. Isto mostra que, para uma maior quantidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, o equilíbrio da reação mostrado na Equação 5.2 será deslocado mais rapidamente no sentido de formação de CO<sub>2</sub> (passando pela formação de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) resultando numa maior quantidade da espécie que permeia através da membrana de Teflon<sup>®</sup>. Consequentemente, um maior sinal é registrado.

Diante dos sinais registrados foi observado que a faixa de concentração entre 0,1 e 0,5 mol L<sup>-1</sup> permite uma boa determinação da intensidade do sinal obtido, visto que a mesma se encontra entre 1,00 e 3,00 cm, respectivamente.

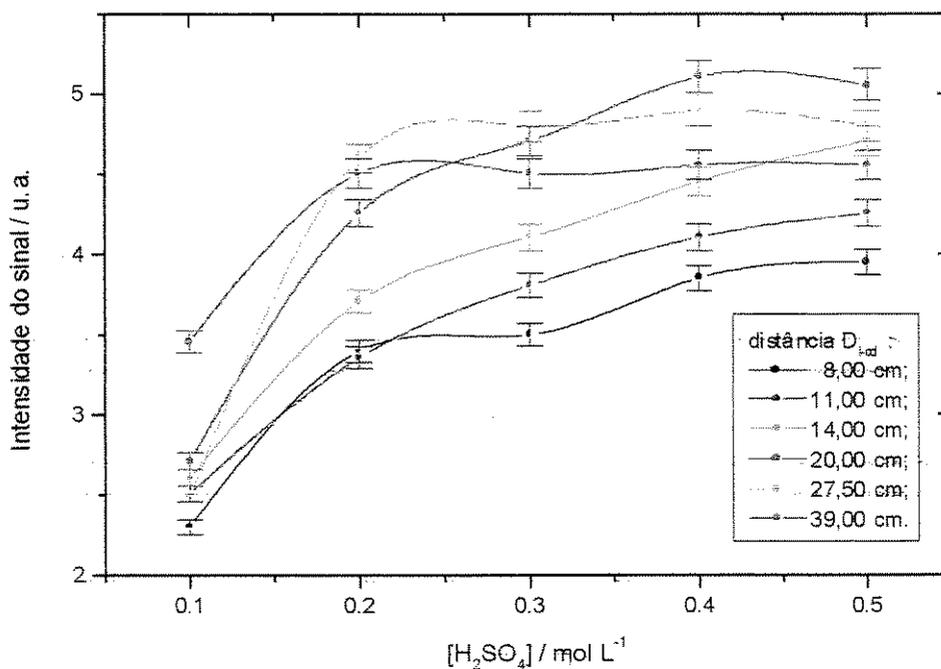
A determinação da concentração a ser utilizada depende ainda do estudo de um outro parâmetro do sistema FIA utilizado: a distância entre o injetor e a cela de difusão ( $D_{i-cd}$ ).

Tal estudo será abordado no Item a seguir.

### **5.1.5 Efeito da distância entre o injetor e a cela de difusão ( $D_{i-cd}$ )**

Devido a necessidade de estudar o efeito da distância entre o injetor e a cela de difusão ( $D_{i-cd}$ ) na otimização do sistema analítico utilizado, foram feitos ensaios onde foi variado a distância  $D_{i-cd}$  em função da concentração de ácido sulfúrico para uma mesma amostra de solução estoque, determinando assim a melhor concentração do ácido utilizado, bem como a variação da distância  $D_{i-cd}$  em função da concentração de  $\text{NaHCO}_3$ , determinando a distância entre o injetor e a cela de difusão a ser utilizada no sistema.

Na determinação da concentração do ácido a ser utilizada, a faixa de concentração de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  utilizada foi determinada no estudo anterior, entre 0,1 e 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ , em intervalos de 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Foram utilizados como condutores de reagentes sonda de polietileno, com diâmetro interno igual a 0,8 mm. Nos seguintes comprimentos: 8,00; 11,00; 14,00; 20,00; 27,50 e 39,00 cm. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 5.6:

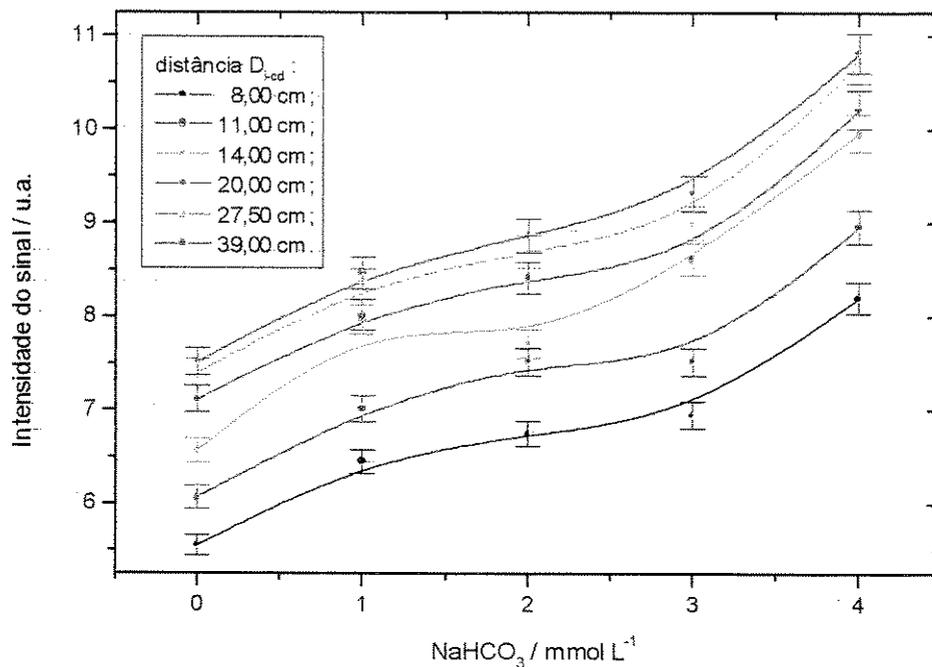


**Figura 5.6:** Estudo da variação do sinal obtido para diferentes distâncias entre injetor e cela de difusão ( $D_{t-cd}$ ) em função da concentração do fluxo carregador utilizado ( $H_2SO_4$ ), para uma mesma amostra.

Da Figura 5.6 pode-se notar que as concentrações de  $H_2SO_4$  que fornecem os maiores sinais são 0,4 e 0,5 mol L<sup>-1</sup>, independente da distância entre o injetor e a cela de difusão, sendo que em alguns casos, o ácido sulfúrico 0,4 mol L<sup>-1</sup> apresentou um maior sinal. Este comportamento pode ser atribuído à diluição da amostra no fluxo carregador que ocorre no percurso entre o injetor e a cela de difusão. Diante destes resultados, foi feita a escolha de se utilizar, como fluxo carregador, o  $H_2SO_4$  com concentração igual a 0,4 mol L<sup>-1</sup>.

Determinada a concentração do fluxo carregador, fez-se então o estudo da distância  $D_{t-cd}$  para amostras de diferentes concentrações de  $NaHCO_3$  tendo como solvente, solução de KOH 0,40 mol L<sup>-1</sup>. Para esta etapa do trabalho foram utilizadas amostras com as seguintes concentrações: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 e

4,0 mmol L<sup>-1</sup>. As distâncias  $D_{i-cd}$  utilizadas foram as mesmas do teste anterior. Na Figura 5.7 estão apresentados os resultados obtidos.



**Figura 5.7:** Gráfico obtido para o estudo da variação da distância  $D_{i-cd}$  em função da concentração de  $\text{NaHCO}_3$ .

Através de uma análise da Figura 5.7, foi possível concluir que a distância entre o injetor e a cela de difusão que registrou maior sinal para todas as concentrações analisadas, foi igual a 20,00 cm, sendo esta a distância utilizada nas próximas etapas.

### 5.1.6 Purificação do KOH

Realizou-se um teste qualitativo com a solução estoque de KOH, onde algumas gotas de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionadas a um determinado volume de amostra com o objetivo de verificar a presença de  $\text{CO}_2$  na solução já preparada. O resultado observado foi a formação imediata de um precipitado de cor branca, muito fino, correspondente à formação de  $\text{BaCO}_3$ , (sal insolúvel). Isto devido à presença de  $\text{CO}_2$  que em meio alcalino se encontra na forma de carbonato ( $\text{CO}_3^{-2}$ ).

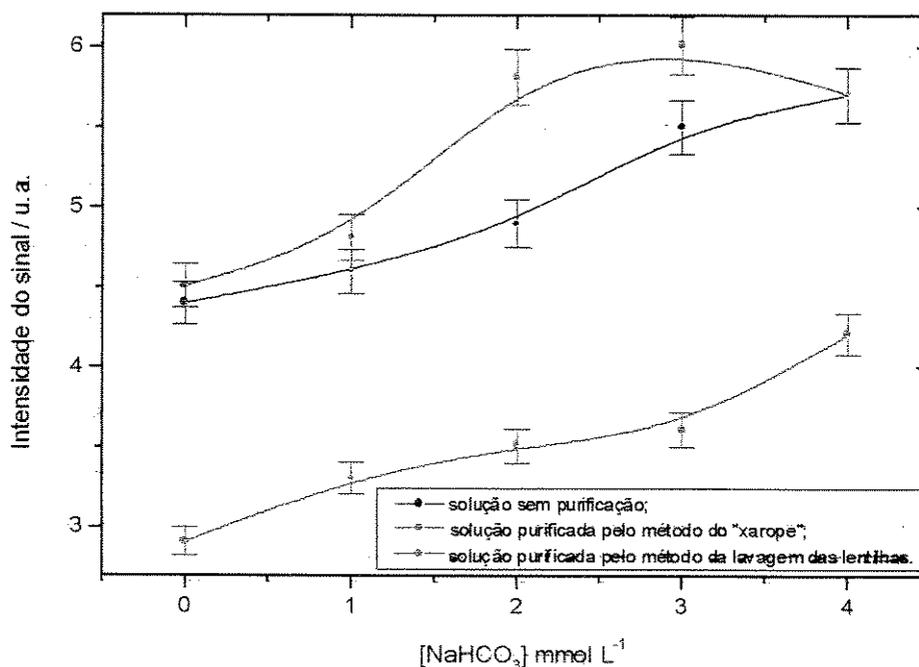
Este fato também foi comprovado no procedimento da titulação, onde a solução de cloreto de bário  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  foi adicionada para precipitar o  $\text{CO}_3^{-2}$  presente, eliminando assim a sua interferência na determinação da quantidade de  $\text{HO}^-$ . Na análise do sistema FIA, foi registrado um sinal de intensidade elevada para a amostra onde não havia sido adicionado a solução de  $\text{NaHCO}_3$ . Isto ocorre devido uma quantidade elevada de  $\text{CO}_2$  presente na solução estoque, a qual é utilizada no preparo das soluções.

Para minimizar o problema da presença de  $\text{CO}_2$  na solução de KOH utilizada nos ensaios (visto que justamente esta espécie é a de interesse) foram utilizados dois métodos de purificação do KOH. Estes foram escolhidos devido a simplicidade do procedimento a ser realizado (VOGEL, 1986). São eles: *i)* preparo de um “xarope”; e *ii)* lavagem das lentilhas utilizada no preparo da solução estoque.

Feito isso, o teste qualitativo, com adição de determinado volume de  $\text{BaCl}_2$ , foi refeito para mesmo volume de amostras. Foi observado então, a formação imediata de  $\text{BaCO}_3$  na solução-estoque anteriormente preparada e na obtida pelo método de purificação 1), ou seja, preparo do “xarope”. Na solução

obtida pelo método 2), lavagem das lentilhas, houve também a formação do carbonato de bário, porém não imediatamente após a adição da solução de  $\text{BaCl}_2$ .

Preparou-se também amostras utilizando as três soluções aqui estudadas, de iguais concentrações de  $\text{NaHCO}_3$ . Estas foram analisadas no sistema FIA e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 5.8.



**Figura 5.8:** Resultados obtidos para a solução estoque já preparadas, em comparação as soluções purificadas.

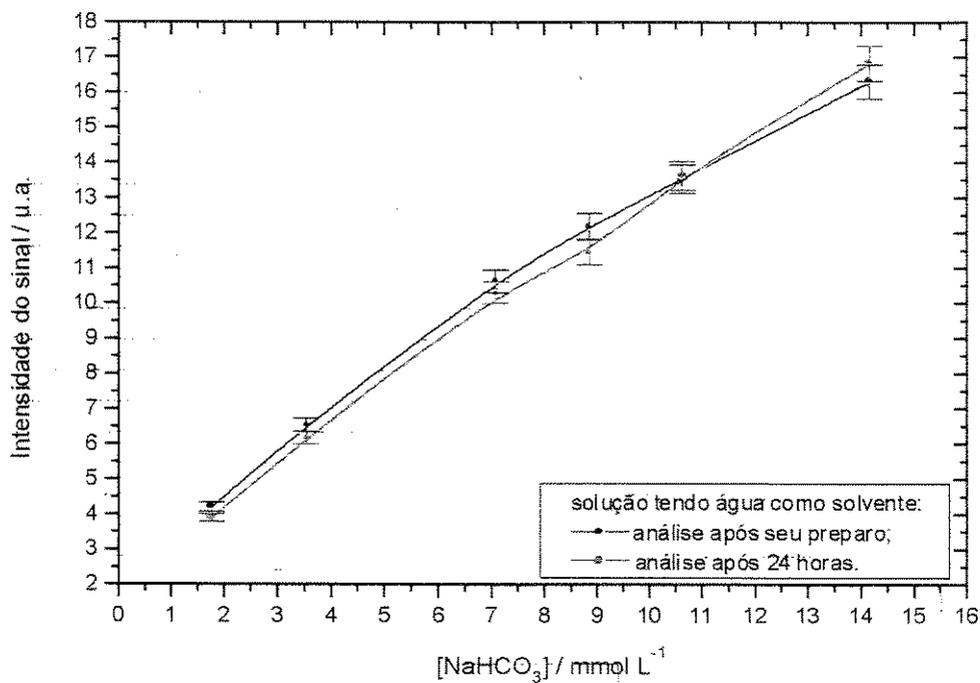
Com base nos resultados da Figura 5.8 foi possível notar que a purificação dada pelo método 2), apresentou uma maior redução na quantidade de  $\text{CO}_2$  quando comparada com o método 1). Este último, não apresentou diminuição na intensidade do sinal registrado, ou seja, não reduziu a quantidade de  $\text{CO}_2$  presente na solução, fato já observado no teste qualitativo realizado

anteriormente. Isto ocorreu porque durante o processo de purificação do "xarope" se obtém um meio altamente alcalino, precipitando o carbonato presente no mesmo, eliminando com isso a sua presença com a filtração. Este procedimento é recomendado no caso do NaOH, uma vez que o carbonato de sódio formado é insolúvel em meio alcalino. Já no caso do KOH, este método não apresenta o resultado desejado dado que o  $K_2CO_3$  apresenta certa solubilidade no meio em questão não permitindo com isso, sua eliminação da solução por meio de filtração como no caso anterior.

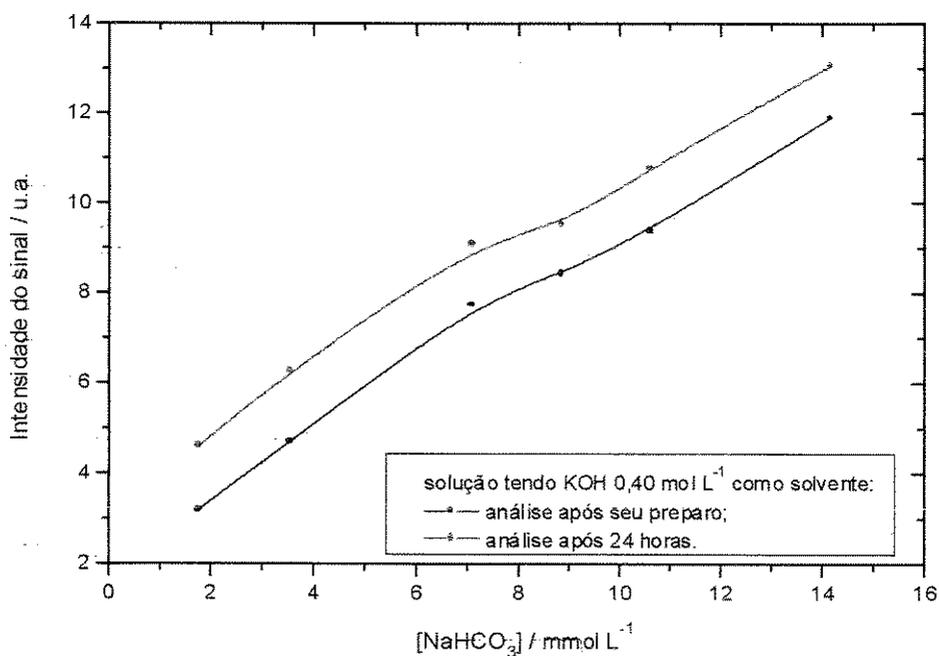
### **5.1.7 Armazenamento das soluções preparadas para a construção da curva de calibração**

Fez-se um estudo detalhado para ver a possibilidade de se armazenar por maior período de tempo as soluções destinadas à construção da curva de calibração. Para tanto, foram preparadas amostras com concentrações conhecidas de  $NaHCO_3$  com água e  $KOH$   $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  como solventes, que foram armazenadas em frascos plásticos à temperatura ambiente ( $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As amostras foram analisadas logo em seguida ao seu preparo bem como após um período de 24 horas. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 5.9 e 5.10, respectivamente.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE



**Figura 5.9:** Resultados obtidos para amostras de concentrações conhecidas de NaHCO<sub>3</sub>, tendo água como solvente, para análise após seu preparo, e após período de 24 horas.

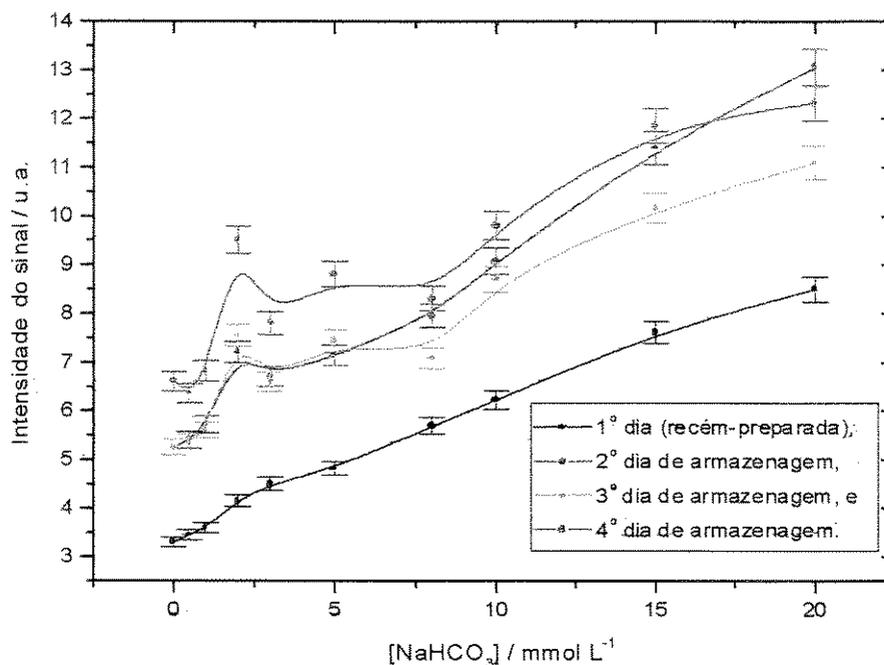


**Figura 5.10:** Resultados obtidos para amostras de concentrações conhecidas de NaHCO<sub>3</sub>, com KOH como solvente, para análise após seu preparo, e após um período de 24 horas.

Analisando as Figuras 5.9 e 5.10 foi possível verificar que as soluções aquosas apresentavam pouca diferença entre as curvas obtidas nos dias de leitura: recém preparada e após 24 horas. Já as amostras que possuíam KOH como solvente, apresentavam uma maior variação na intensidade, ao compararmos a análise realizada após seu preparo e a feita após 24 horas. Isto é devido a característica que o hidróxido de potássio tem de absorver  $\text{CO}_2$ , fato que provavelmente aconteceu durante este intervalo de tempo entre as análises. Assim, obteve-se um maior sinal devido à maior quantidade da espécie detectada no meio.

Neste teste as amostras foram armazenadas em frascos plásticos em temperatura ambiente ( $27^\circ\text{C}$ ).

Outro teste realizado, foi onde analisou-se as amostras armazenadas em frascos plásticos e conservadas sob resfriamento ( $10-15^\circ\text{C}$ ) por um período maior de tempo. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 5.11, onde o mesmo efeito, de acréscimo na quantidade de  $\text{CO}_2$ , foi observado.



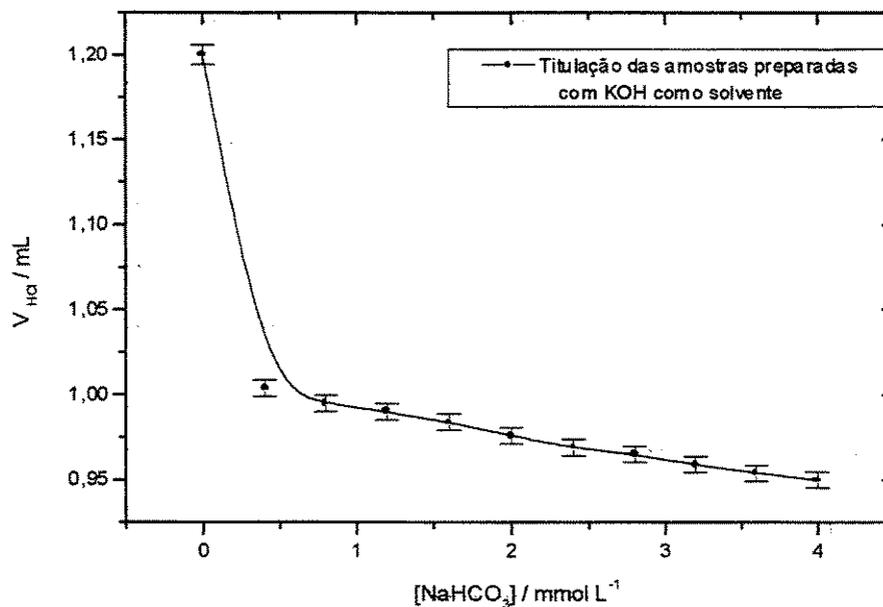
**Figura 5.11:** Resultados obtidos para amostras de concentrações conhecidas de  $\text{NaHCO}_3$ , tendo KOH como solvente, armazenadas por 4 dias em frasco plásticos estando sob refrigeração.

Com base nestes resultados, foi preparado uma curva de calibração para cada dia de análise no decorrer dos ensaios de respirometria.

## 5.2 Comparação entre a determinação da concentração de $\text{CO}_2$ utilizando titulação ácido-base e FIA-condutométrico.

Após a determinação dos parâmetros operacionais e da otimização do sistema FIA, realizou-se também estudos comparando os resultados obtidos pela titulação ácido-base (recomendado pelo Projeto de Norma ABNT), com aqueles obtidos através da análise em sistema FIA.

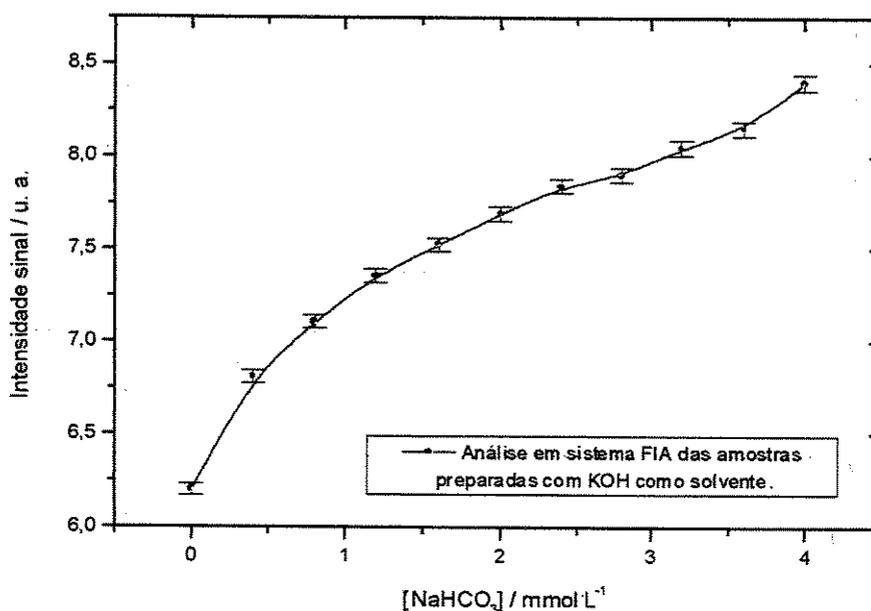
Para isso, foram preparadas soluções cujas concentrações eram conhecidas ( $0,0 \leq [\text{NaHCO}_3] \leq 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em intervalos de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Destas soluções retirou-se alíquotas para titulação e para preparação das soluções diluídas (FIA) com a finalidade de verificar se estas iriam apresentar o comportamento esperado, ou seja, diminuir o volume do ácido clorídrico utilizado no caso da titulação, e aumentar a intensidade do sinal obtido no sistema FIA em função do aumento da concentração de  $\text{NaHCO}_3$  das amostras conhecidas. Os resultados obtidos estão na Figura 5.12 para a titulação, e Figura 5.13 para a análise no sistema FIA.



**Figura 5.12:** Comportamento observado para a variação do volume de HCl utilizado em função da concentração de  $\text{NaHCO}_3$  das amostras durante a titulação.

De acordo com o observado na Figura 5.12, pode-se verificar o comportamento esperado para a determinação de  $\text{CO}_2$  por titulação. Isto ocorre, porque o bicarbonato adicionado ao meio vai reagir com o  $\text{HO}^-$  presente, tendo este último diminuindo sua concentração, formando com isso carbonato, como mostrado na Equação 5.1 citada anteriormente (Item 5.1.2)

Desta forma, ao ser adicionado a solução de  $\text{BaCl}_2$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , ocorrerá a formação do  $\text{BaCO}_3$  (precipitado de cor branca) ficando na solução o  $\text{HO}^-$  o qual não reagiu com carbonato, sendo titulado pelo  $\text{HCl}$  utilizado. Quanto mais  $\text{CO}_3^{2-}$  for adicionado à amostra, maior será a quantidade de  $\text{HO}^-$  que reagirá com esta espécie, e conseqüentemente, menor será o volume de  $\text{HCl}$  utilizado durante a titulação.



**Figura 5.13:** Comportamento observado para a variação da intensidade do sinal obtido no sistema FIA em função da concentração de  $\text{NaHCO}_3$  das amostras durante análise por FIA.

No caso do sistema FIA também pode ser observado, na Figura 5.13, o comportamento esperado, ou seja, quanto maior a concentração de  $\text{NaHCO}_3$ , maior será o sinal obtido, uma vez que o sistema detecta o  $\text{CO}_2$  presente.

Com base nestes resultados, foram preparadas soluções de  $\text{NaHCO}_3$ , simulando um ensaio de respirometria, onde foram adicionados volumes conhecidos de  $\text{NaHCO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $V_{\text{bicarbonato}}$ ) em 10 mL de  $\text{KOH}$ ,

representando o branco ( $V_{\text{bicarbonato}} = 0,0 \mu\text{L}$ ), respirômetro-controle ( $RC$ ) ( $V_{\text{bicarbonato}} = 80,0 \mu\text{L}$ ), e respirômetros-teste ( $RT$ ) ( $V_{\text{bicarbonato}} = 160,0$  e  $240 \mu\text{L}$ ). Foi preparada também uma curva de calibração para a análise em sistema FIA.

Das amostras, retirou-se alíquotas as quais foram tituladas, e outras que foram diluídas a 1:10 para depois serem analisadas pelo sistema FIA.

Com os dados obtidos, fez-se então cálculos para determinar a quantidade de  $\text{CO}_2$  no respirômetro-teste e controle; bem como a produção de  $\text{CO}_2$  devido à biodegradação,  $(\text{CO}_2)_b$ , também aqui chamado de  $\text{CO}_2$  biodegradado.

No caso da titulação, os cálculos foram realizados de duas maneiras: uma utilizando as fórmulas presentes no Projeto de Norma seguido, outra utilizando estequiometria e regras de diluição.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2:** Resultados obtidos para amostras conhecidas; simulando ensaios de respirometria, para titulação e sistema FIA.

	Titulação		FIA	Soluções preparadas / $\text{mmol L}^{-1}$
	Norma / $\text{mmol L}^{-1}$	Diluição / $\text{mmol L}^{-1}$	Escala log / $\text{mmol L}^{-1}$	
$(\text{CO}_2)_{\text{controle}}$	5,18	5,18	3,57	3,20
$(\text{CO}_2)_{\text{Teste1}}$	7,45	7,46	8,13	6,40
$(\text{CO}_2)_{\text{Teste2}}$	10,56	10,56	15,22	9,60
$(\text{CO}_2)_{bT1}$	2,27	2,25	4,27	3,20
$(\text{CO}_2)_{bT2}$	5,38	5,35	11,34	6,40

Observou-se, através da análise dos resultados apresentados na Tabela 5.2, que os valores obtidos nos cálculos para a titulação foram praticamente iguais. Já nos resultados obtidos por FIA, a quantidade de CO<sub>2</sub> biodegradado foi praticamente o dobro dos resultados obtidos na titulação.

Outras simulações foram realizadas e os resultados obtidos para o CO<sub>2</sub> biodegradado na titulação sempre foram a metade dos apresentados pelo sistema FIA.

Comprovada a possibilidade da determinação de concentração de CO<sub>2</sub> em soluções de KOH, utilizando sistema FIA com detecção condutométrica, uma vez que os resultados obtidos foram sistematicamente o dobro dos apresentados pela titulação, foi dado início à próxima etapa do trabalho.

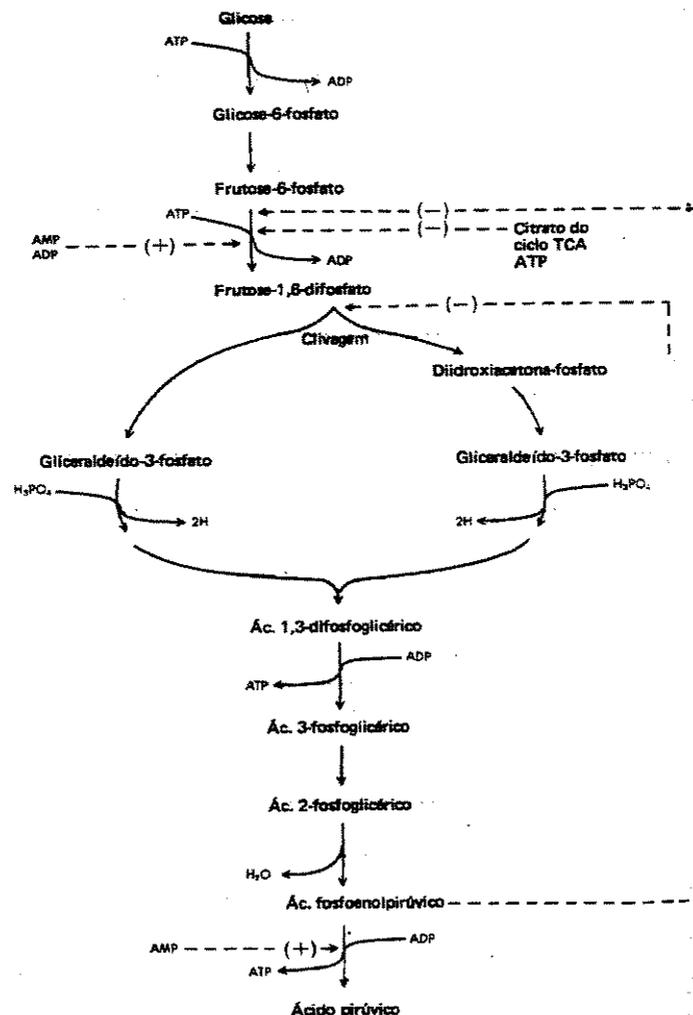
### **5.3 Ensaio de Respirometria seguindo o Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT, com determinação do (CO<sub>2</sub>)<sub>b</sub> usando FIA-condutométrico e titulação ácido-base.**

Para a realização desta etapa do projeto, 12 respirômetros foram preparados e incubados à 28°C, sendo 3 para controle (onde não foi adicionado glicose), e 03 para cada diferente taxa da substância misturada ao solo. Estas taxas foram: taxa 1: 0,25; taxa 2: 0,50 e taxa 3: 1,01 g de glicose / 50 g de solo, que correspondem a 8; 16 e 33 mmols de carbono, respectivamente.

As bactérias heterotróficas necessitam de compostos orgânicos como principal fonte de energia, e por isso a glicose é frequentemente utilizada.

A utilização de uma molécula de glicose pode ocorrer por uma seqüência de reações catalisadas por enzimas chamada glicólise (ou via de Embden-Meyerhof). Este processo tem como conseqüência a formação de duas moléculas de ácido pirúvico (Pelczar et al, 1980).

A Figura 5.14 mostra o esquema da decomposição da glicose até ácido pirúvico, via glicólise, e a reação total é dada pela Equação 5.3.



**Figura 5.14:** Esquema da decomposição da glicose a ácido pirúvico via Glicólise. Fonte: Pelczar et al, 1980.



O ácido pirúvico formado pode por sua vez, ser oxidado através de uma série de reações catalisadas por enzimas, resultando em acetil coenzima A (acetil-CoA) a qual pode participar do Ciclo de Krebs (ou Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos – TCA), como mostrado na Figura 5.15 (Pelczar et al, 1980).

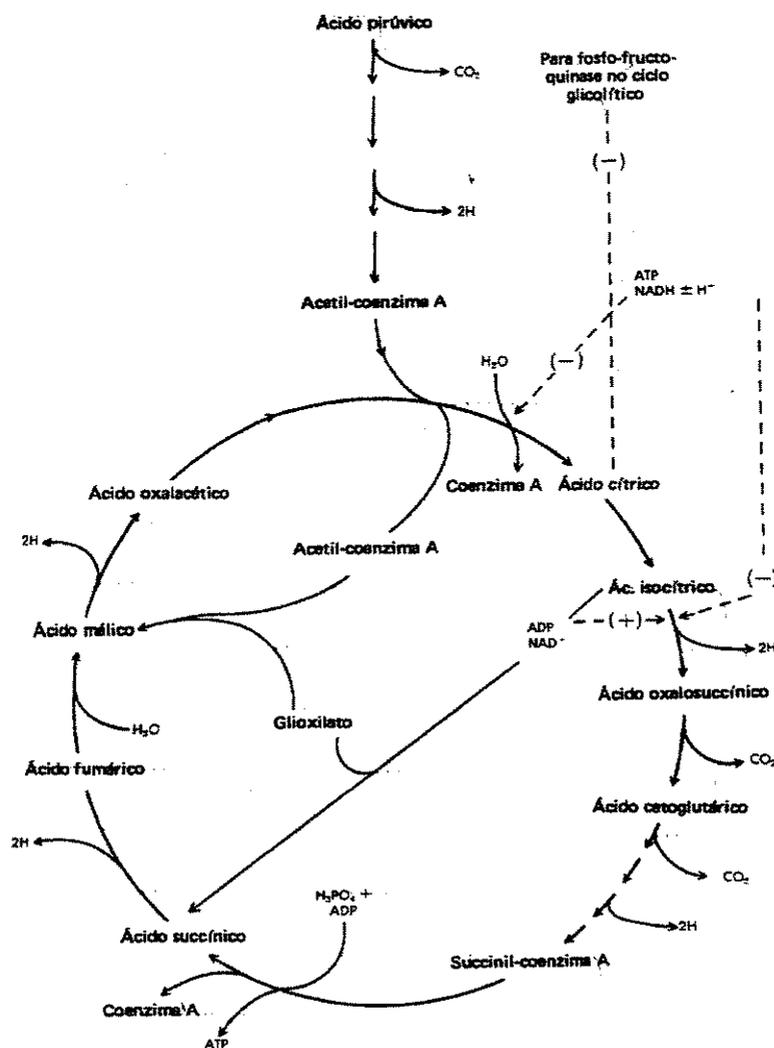
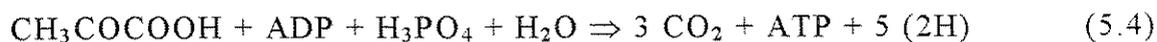


Figura 5.15: Esquema do Ciclo de Krebs. Fonte: Pelczar et al, 1980.

A reação total para este ciclo é mostrada na Equação 5.4.

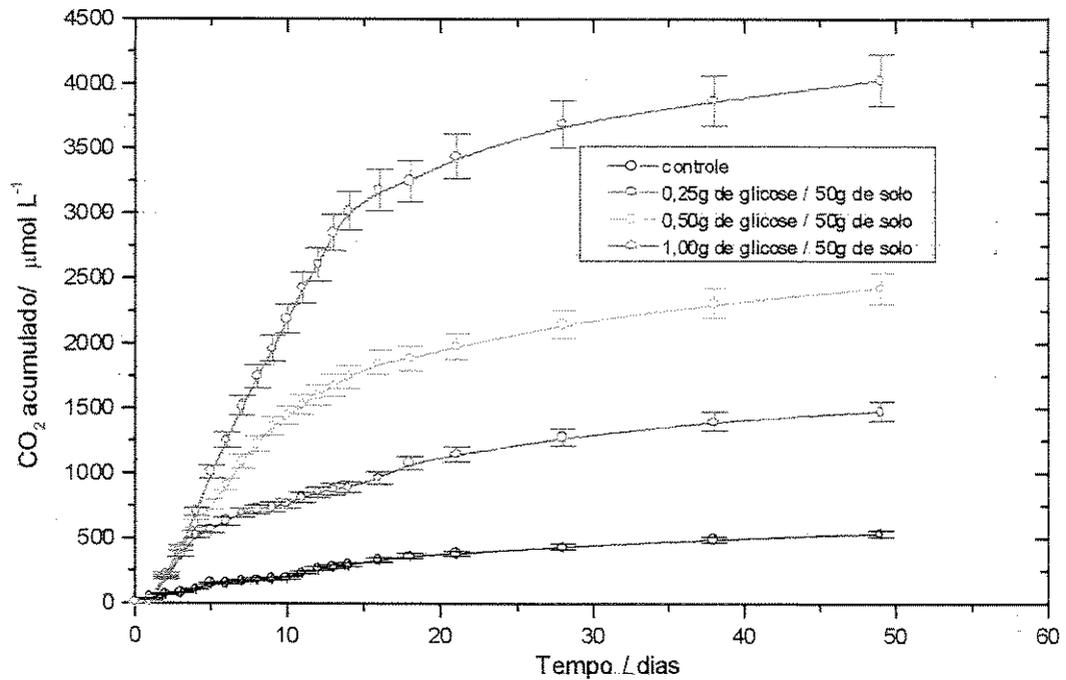


Ocorrendo a oxidação completa da glicose, os produtos finais serão  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , como mostrado na Equação 5.5.

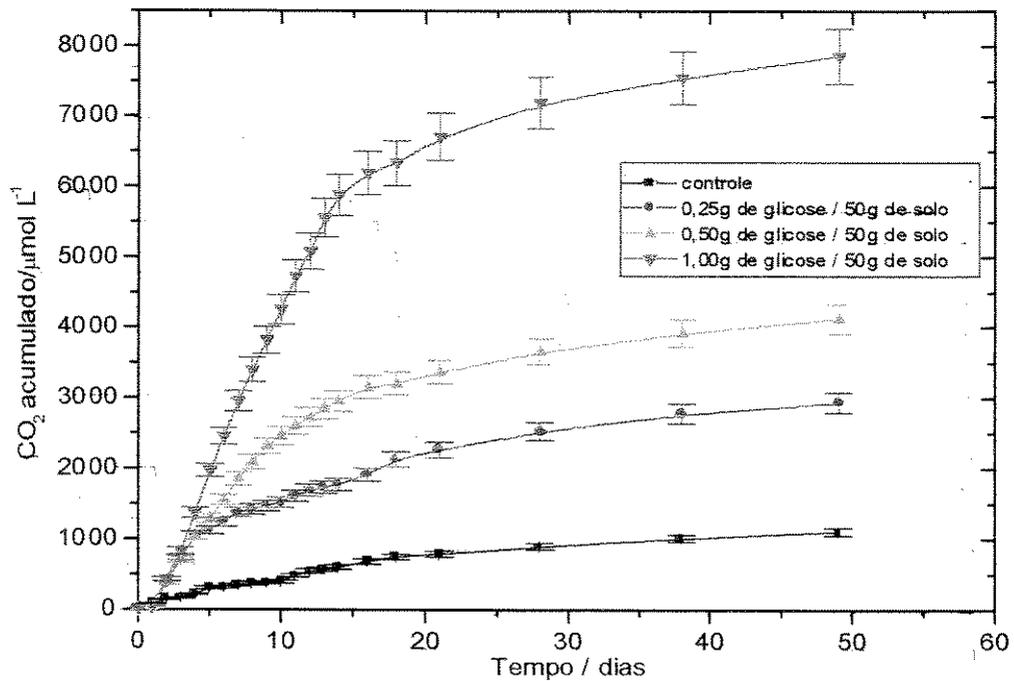


As amostras de solução de KOH que eram retiradas do interior do respirômetro tinham alíquotas tituladas e alíquotas diluídas para análise no sistema FIA, enquanto o interior do respirômetro era aerado com ar isento de  $\text{CO}_2$ , garantindo com isso,  $\text{O}_2$  para os microrganismos presentes no solo. A quantidade de  $\text{CO}_2$  biodegradado ( $(\text{CO}_2)_b$ ), para a titulação, foi calculada utilizando as fórmulas apresentadas no Projeto de Norma adotado.

Os resultados obtidos podem ser comparados nas Figuras 5.16 e 5.17 para as determinações via titulação e via sistema FIA, respectivamente.



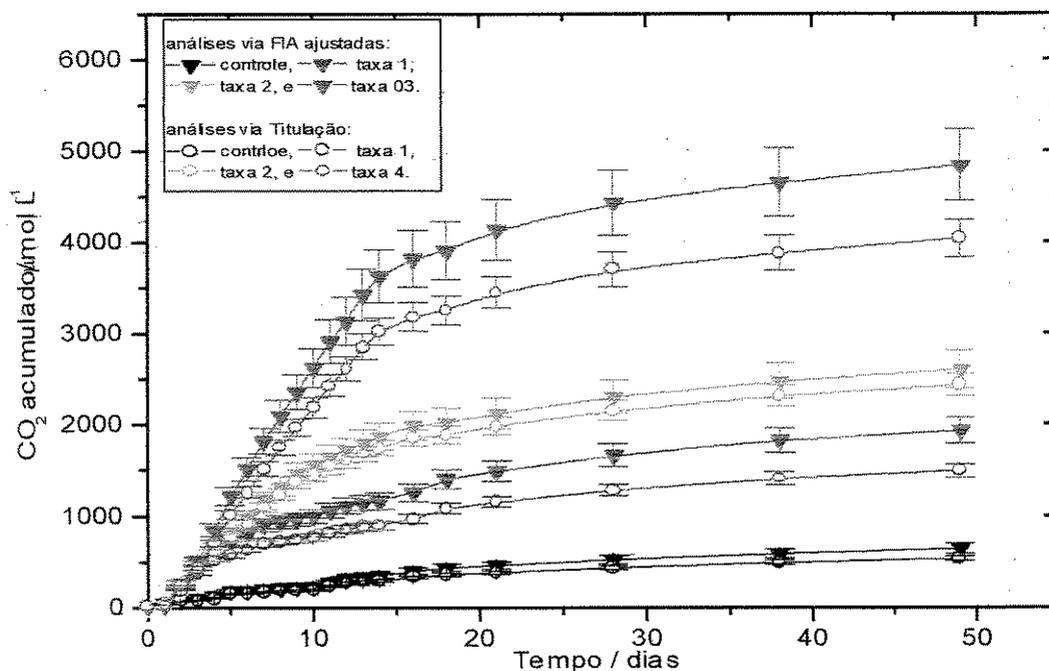
**Figura 5.16:** CO<sub>2</sub> acumulado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), determinado por titulação, pela biodegradação de glicose para as diferentes taxas de aplicação utilizadas em função do tempo de incubação.



**Figura 5.17:** CO<sub>2</sub> acumulado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), determinado pelo sistema FIA, pela biodegradação de glicose para as diferentes taxas de aplicação utilizadas em função do tempo de incubação.

Pode-se observar através das curvas mostradas nas Figuras 5.16 e 5.17, o mesmo comportamento para ambas. A explicação deste fato se dá ao acréscimo na quantidade de  $\text{CO}_2$  biodegradado acumulado por um período aproximado de 12 dias (fase lag), quando tem-se o início da formação de um patamar onde o  $(\text{CO}_2)_b$  acumulado tende a ser constante a medida que o tempo passa (fase endógena). Para a obtenção da curva "controle", onde não é adicionado a substância a ser degradada, considerou-se o  $\text{CO}_2$  produzido nos respirômetros controle (o qual é descontado dos respirômetros testes para determinação do  $(\text{CO}_2)_b$ ). É possível observar que os dados obtidos via sistema FIA, são aproximadamente o dobro dos resultados obtidos por titulação, conforme constatado no Item 5.2.

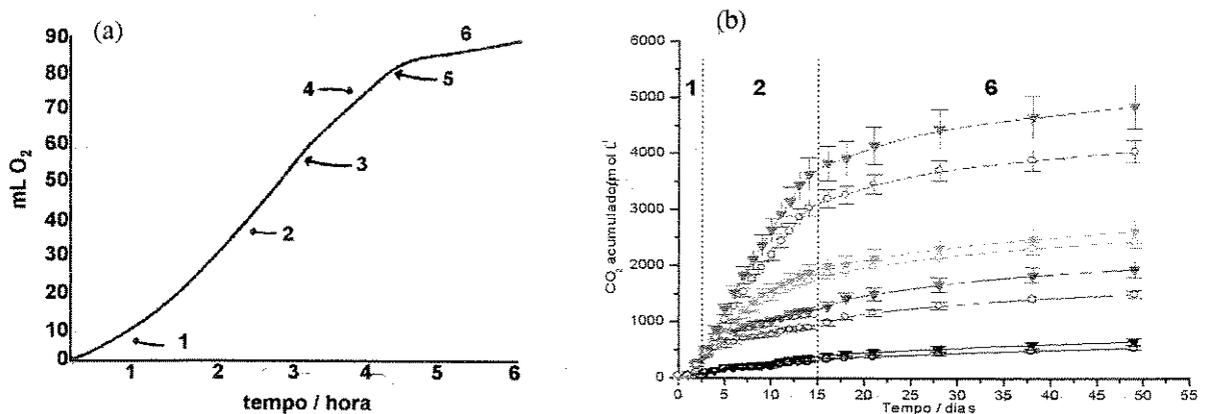
Diante deste fato, fez-se um ajuste nos valores de  $(\text{CO}_2)_b$  acumulados obtidos para a análise em sistema FIA sofreram um ajuste, normalizando por um fator 2. Os novos resultados estão mostrados na Figura 5.18. São apresentadas curvas obtidas via titulação como também curvas ajustadas para o respirômetro-controle e para as 3 taxas de glicose aplicadas.



**Figura 5.18:** Comparação dos resultados obtidos para as análises realizadas por titulação e por FIA após o ajuste.

É possível observar na Figura 5.18 que os resultados obtidos para as análises realizadas em sistema FIA ainda são um pouco maior que os resultados obtidos por titulação, mesmo após o ajuste. Este fato pode ser atribuído, certamente, a maior sensibilidade do sistema FIA em relação ao método titulométrico.

Contudo, o comportamento esperado para o crescimento bacteriano, de um modo geral, foi comprovado através do estudo das amostras analisadas aqui pelos métodos já citados para as 3 diferentes taxas do composto orgânico utilizado, como mostrado na Figura 5.19.



**Figura 5.19:** Comparação do comportamento esperado (a) e o obtido experimentalmente (b) na degradação de compostos orgânicos, ressaltando as fases observadas. Fonte (a): adaptado de Arthur, 1984.

A Figura 5.19 tem-se o comportamento, de um modo geral, para crescimento microbiano (a), como suas as fases, e também o comportamento obtido durante os ensaios de respirometria realizados (b). Observa-se que as determinações respirométricas foram feitas com medidas de diferentes parâmetros, mL O<sub>2</sub> em (a) e  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de CO<sub>2</sub> em (b), e mesmo assim tem-se o mesmo comportamento em ambas as determinações. Esta concordância ocorre devido à estequiometria da reação envolvida, onde o consumo de O<sub>2</sub> pelo microrganismos é diretamente proporcional à produção de CO<sub>2</sub> durante o

processo de respiração dos mesmos (ver Equação 5.5). Note-se a concordância existente entre as fases destacadas:

- 1) fase lag, onde ocorre adaptação dos microrganismos ao substrato adicionado;
- 2) fase log, na qual o crescimento dos microrganismos é máximo, e
- 6) fase endógena, onde os microrganismos estão sob dieta de inanição.

As fases, 3) e 5), primeira e segunda parada (“first” e “second break”), respectivamente, não são verificadas devido ao fato do substrato adicionado ao solo não ser uma mistura de componentes, e sim apenas uma substância: glicose.



## 6. Conclusões e Recomendações

A pesquisa desenvolvida neste projeto de mestrado é de grande utilidade, devido a importância dos ensaios de respirometria na avaliação da biodegradação de compostos orgânicos adicionados ao solo. Fato este comprovado pela análise de todos os dados apresentados até então.

Assim, os resultados aqui apresentados comprovam a possibilidade de se quantificar o  $\text{CO}_2$  biodegradado,  $(\text{CO}_2)_b$ , através do sistema FIA. Para isso utilizou-se glicose como composto orgânico. Logo, foi possível estabelecer uma correlação entre tal análise com os resultados obtidos por meio de titulação, sendo necessário a normalização da curva obtida por um fator 2.

Para que o sistema respondesse adequadamente à solução analisada, uma vez que notou-se uma alteração no solvente utilizado, foi necessário estabelecer a correção de alguns parâmetros, sendo estes:

- diluição a ser utilizada: proporção 1:10,
- análises sem adição de cloreto de bário (contrariando o procedimento do Projeto de norma adotado),
- concentração do fluxo carregador:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ,
- distância entre o injetor e a cela de difusão: 20 cm,
- preparo das soluções utilizadas na obtenção da curva de calibração para cada dia de análise, e
- purificação da solução estoque de KOH quando necessário.

As vantagens apresentadas pelo sistema utilizado foram:

- possibilidade de se refazer a medida no caso de dúvidas, pois não há destruição completa da amostra (apenas uma alíquota da solução a ser testada foi diluída);
- dados altamente reprodutíveis;
- alta frequência analítica (40 amostras / hora); e
- resultados compatíveis com o esperado.

Diante destas conclusões, recomenda-se

- estudos para a melhor purificação da solução de KOH utilizado no interior do respirômetro, garantindo com isso uma melhor determinação da espécie de interesse (o  $\text{CO}_2$  produzido pela respiração dos microrganismos presentes no solo), utilizando o sistema FIA aqui otimizado;
- ensaios de respirometria comparando o NaOH e KOH;
- ensaios de respirometria para novas substâncias químicas, onde a monitoração do  $\text{CO}_2$  seja feita utilizando o sistema FIA estudado neste trabalho;
- estudos onde as determinações do  $\text{CO}_2$  produzido pela respiração seja realizado para a espécie de interesse na fase gasosa utilizando um sistema FIA. Para tanto deve-se otimizar o sistema utilizado para tais determinações. Os resultados devem ser comparados com os obtidos nas análises onde o  $\text{CO}_2$  produzido é absorvido por uma solução alcalina (método adotado no Projeto de Norma ABNT).

## Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2<sup>a</sup> ed. New York: John Wiley & Sons, 1977, 476p. apud SIVIERO, A. R. Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição – areia fenólica – utilizando o método respirométrico. Rio Claro: IB, UNESP, 1999. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 1999.
- APPLETON, J. M. H. e TYSON, J. F. The Rapid Determination of Chemical Oxygen Demand in Wastewater and Effluents by Flow Injection Analysis. *Analytica Chimica Acta*, n. 179, p. 269-278, 1986.
- ARTHUR, R. M. Twenty Years of Respirometry. **Proceedings of the 39<sup>th</sup> Purdue Industrial Waste Conference**, W. Lafayette, Indiana, p.861-874, 1984.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). Projeto de Norma 01:603.06-007 (no prelo). Determinação da Biodegradação em Solos – Método Respirométrico. Jan. 1993.
- BACCAN, N., ANDRADE, J. C., GODINHO, O. E. S., BARONE, J. S. **Química Analítica Quantitativa Elementar**. 2<sup>a</sup> ed São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda/Universidade Estadual de Campinas, 1979, 259.

- BARTHA, R. e PRAMER, D. Features of a flask and Methods for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. **Soil Science**, v.100, n.1, p. 68-70, 1965
- BITTON, G. E DUTKA, B. J. Toxicity testing using microorganism. v. 1, CRC Press Inc., Boca Raton-Flórida, 1986.
- BOZA, F. L., CASTRO, D. L., CASES, M. V. Flow injection environmental analysis: a review. **Analisis**, v.13, n.4, p.147-159, 1985.
- CHERNICHARO, C. A. L., BORGES, A. M., MESQUITA, L. C. P., DIAS, A. M. A. Desenvolvimento de um respirômetro automatizado para avaliação da atividade microbiana anaeróbia. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.02, n.08, p.120-126, Jul-Set e n.04, Out-Dez, 1997.
- CLARK, G. D., WHITMAN, D.A., CHRISTIAN, G. D., RUZICKA, J. Sample handling and pretreatment using flow injection analysis. **Critical. Review Analitical Chemistry**, v.21, p. 357-375, 1990.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB), São Paulo. **L6.350:Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. São Paulo, 1990. 12p.
- CORAUCCI Fº, B.; FIGUEIREDO, R. F.; NOUR, E. A. A.; SIVIERO, A. R., ALBUQUERQUE, A. F.; VIEIRA, D. B. Efeito da freqüência de irrigação e das taxas de aplicação de efluente cítrico nas quantidades de óleos essenciais no solo. In: XXVI Congresso Interamericano de Ingenieria Sanitaria Y Ambiental, 1998 ( a ser realizado em novembro de 1998).
- CORAUCCI Fº, SIVIERO, A. R., SOUZA, L. C. F., ALBUQUERQUE, A. F. Avaliação da biodegradação de lodo de indústria cítrica no solo através do

ensaio de respirometria. In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu, setembro/1997.

GONZALO, E. R., PAVÓN, J. L. P., RUZICKA, J., CHRISTIAN, G. D. Flow-injection analysis determination of phenols in kerosene and naphtha by membrane extration-preconcentration. **Analytical Chimica Acta**, v. 259, p. 37-44, 1992.

GUIMARÃES, J. R. **Determinação do dióxido de carbono por FIA: aplicação em testes de toxicidade**. Campinas: IQ, UNICAMP, 1990. Tese de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. 84p.

GUIMARÃES, J. R. **Determinação e especiação de carbono inorgânico em águas e atmosfera por análise em fluxo**. Campinas: IQ, UNICAMP, 1995. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995. 99p.

HAINES, J. R., HOLDER, E. L., VENOSA, A. D. Respirometry as a Tool to Assess Effects of Environmental Variables in Bioremediation Research and Field Testing. **Proceedings of the 51<sup>st</sup> Purdue Industrial Waste Conference**, Chelsea, Michigan, p.463-471, 1996.

HMSO Books. The determination of Carbon Dioxide in Natural, Treated and Beverage Waters witha Supplement on Sampling Bottled and Canned Waters, Her Magesty's Stationary Office (Ed), Londres, 1987.

HORVAI, G., PUNGOR, E. Theoretical backgrounds of flow analysis. **Critical Review Analitical Chemistry**, v. 17, p. 231-264, 1987.

IANNOTTI, D. A., GREBUS, M. E., TOTH, B. L., MADDEN, L. V., HOITINK, H. A. J. Oxygen Respirometry to Assess Stability and Maturity of Composted

- Municipal Solid Waste. **Journal of Environmental Quality**, v.23, p.1177-1183, Nov-Dec, 1994.
- JARDIM, W. F., PASQUINI, C. GUIMARÃES, J.R. AND DE FARIA, L. C. Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: monitoring CO<sub>2</sub> production by flow injection analysis. **Water Science and Technology**, v. 24, n. 3, p. 351-354, 1990.
- JENKINS, D. The use of manometric methods in the study of sewage and trade wastes. **Waste Treatment**, Oxford, Pergamon Press, p. 99-121.
- KHANDAKER, N. R. Application of Anaerobic Respirometers for Treatability Assessment of Industrial Wastewaters. **Proceedings of the 51<sup>st</sup> Purdue Industrial Waste Conference**, Chelsea, Michigan, p.483-487, 1996.
- KING, E. F., DUTKA, B. J. Respirometric Techniques. In: BITTON, G. E. DUTKA, B. J. **Toxicity testing using microorganism**. Boca Raton-Flórida: CRC Press Inc., v. 1, 1986, p. 75-113.
- KORENAGA, T. e IKATSU, H. The Determination of Chemical Oxygen Demand in Wastewaters with Dichromate by Flow Injection Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 141, p. 301-309, 1982.
- KORENAGA, T. Flow Injection Analysis Using Potassium Permanganate: na Approach for Measuring Chemical Oxygen Demand in Organic Wastes and Waters. **Analytical Letters**, v. 13, n. A11, p. 1001-1011, 1980.
- KUBÁN, V. Gas permeation and preconcentration in the flow-injection determination of acid-available cyanide in waste water. **Analytical Chemistry Acta**, v. 259, p. 45-52, 1992.

- LEE, E. W., OSWALD, W. J. Comparative studies of the dilution and warburg methods for determining BOD. **Sewage and Industrial Wastes**, v. 26, p. 1097-1108, 1954.
- MAHENDRAKER, V., VIRARAGHAVAN, T. Respirometry in Environmental Engineering. **Journal of Environmental Science Health**, v.A30, n.4, p.713-734, 1995.
- MONTGOMERY, H. A. C. The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. **Water Research**, v. 1 p. 631-662, 1967.
- MOTOMIZU, S., TOEI, K., KUWAKI, T., OSHIMA, M. Gas diffusion with tubular microporous poly(tetrafluorethylene) membrane for flow-injection determination of carbon dioxide. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 2930-2932, 1987.
- NUVOLARI, A. **Aplicação de lodo de esgotos municipais no solo: Ensaio de respirometria para avaliar a estabilização do lodo**. Campinas: FEC, UNICAMP, 1996. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 1993.
- PAVÓN, J. L. P., GONZALO, E. R., CHRISTIAN, G. D., RUZICKA, J. Universal sandwich cell and detector for optical flow injection analysis. **Analytical Chimica**, v. 64, p. 923-929, 1992.
- PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. 4<sup>a</sup> ed. Editora: McGraw-Hill do Brasil, 1980, v.1, 566p.
- ROZICH, A. F., COLVIN, R. J. Formulating Strategies for Activated Sludge Systems. **Water/Engineering & Management**, p.39-41, Oct, 1990.

- RUZICKA, J., HANSEN, E. H. Flow Injection Analysis, 2ª edição, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1988.
- SIVIERO, A. R. **Avaliação da biodegradação em solo de resíduos sólidos de fundição – areia fenólica – utilizando o método respirométrico.** Rio Claro: IB, UNESP, 1999. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 1999.
- SPANJERS, H., VANROLLEGHEM, P., OLSSON, G., DOLD, P. Respirometry in control of the activated sludge process. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 3, p. 117-126, 1996.
- SPILLMAN, R. W., SHERWIN, M. B. Gas separation membranes: The first decade. **Chemtech**, p. 378-384, 1990.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER, 18<sup>th</sup>. Edition, 1992, edited by Arnold E. Greenberg, Lenore S. Clesceri, Andrew D. Eaton.
- VALCÁRCEL, M., LUQUE DE CASTRO, M. D. Análisis por Inyección en Flujo. 2ª edição, Imprenta San Pablo, Córdoba, 1984.
- VAN DER LINDEN, W. E. Membrane separation in flow injection analysis-gas diffusion. **Analytical Chemistry Acta**, v. 151, p. 359-369, 1983.
- VOGEL, A., BASSET, J., DENNEY, R. C., JEFFERY, G. H., Mendham, J. **Vogel: Análise Inorgânica Quantitativa.** 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1986, 690p.
- YOUNG, J. C. Fundamentals of Respirometry: Instrument Types and Basis of Operation. **Proceedings of the 51<sup>st</sup> Purdue Industrial Waste Conference**, Chelsea, Michigan, p.441-451, 1996.

## Referências Consultadas

- BEL, M., STOKES, L., UPTON, J., WATTS, J. Applications of a respirometry based toxicity monitor. **Water Science Technology**, v.33, n.1, p.289-296, 1996.
- BOZA, F. L., CASTRO, D. L. Gas diffusion/flow injection analysis: applications and trends. **Analisis**, v.16, n.4, p.216-220, 1988.
- CAÑETE, F., RÍOS, A., CASTRO, M. D. L., VALCÁRCEL, M. Analysis of gaseous samples by flow injection. **Analytica Chimica Acta**, v.224, p. 127-132, 1989.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores Anaeróbios**. Belo Horizonte : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG, 1997. Cap. 3: Biomassa nos sistemas anaeróbios. p. 79-95.
- CORAUCCI F°, FIGUEIREDO, R. F., VIEIRA, D. B., SOUZA, L. C. F. Avaliação da qualidade sanitária da água infiltrada no solo localizado em área de despejo de efluentes da indústria cítrica. In: 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu, setembro/1997.
- HICKEY, W. J. In-situ respirometry: field methods and implications for hydrocarbon biodegradation in subsurface soils. **Journal of Environmental Quality**, v.24, p.583-588, Jul-Aug. 1995.

- JARDIM, W. F., GUIMARÃES, J. R., ALLEN, H. E. Flow-injection conductimetry of dissolved inorganic carbon. **Ciência e Cultura**, v. 43, n. 6, p. 454-456, Nov/Dec. 1991.
- MORITA, T., ASSUMPTÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes & solventes. Padronização, preparação e purificação.** São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 1995.
- NUVOLARI, A., CORAUCCI, F. B., SILVA, L. G., FADINI, P. S. Estudos para orientar o aproveitamento de um lodo oriundo de um valo de oxidação na melhoria de um solo. In: 19<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, Foz do Iguaçu, setembro/1997.
- POLLARD, P. C., STEFFENS, M. A., BIGGS, C. A., LANT, P. A. Bacterial growth dynamics in activated sludge batch assays. **Water Research**, v. 32, n. 3, p. 587-596, 1998.
- ROS, M. **Respirometry of Activated Sludge.** Pensilvânia: Technomic Publishing Company, 1993. 147 p.
- SPANJERS, H., OLSSON, G., KLAPWIJK, A. Determination short-term biochemical oxygen demand and respiration rate in aeration tank by using respirometry and estimation. **Water Science and Technology**, v. 28, n. 7, p. 1571-1583, 1994.
- SPANJERS, H., VANROLLEGHEM, P. Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. **Water Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 105-114, 1995.
- SPERLING, M.V. **Lodos Ativados.** Belo Horizonte : Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental-UFMG, 1997. XXp.

TISINGER, J. L., DRAHOS, D. J. Use of respirometry to evaluate the efficacy of biological products for the biodegradation of wastewater grease and oil. **Proceedings of the 51<sup>st</sup> Purdue Industrial Waste Conference**, Chelsea, Michigan, p.473-482, 1996.

WITTEBORG, A., LAST, A., HAMMING, R., HEMMERS, I. Respirometry for determination of the influent  $S_5$ -concentration. **Water Science Technology**, v.33, n.1, p.311-323, 1996.

WORSFOLD, P. J. The Bio-Analytical Potencial Of Flow Injection Analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 145, p. 117-124, 1983.

## **Abstract**

Andreo, Ana Paula. **Assays of Respirometry: Monitoring of CO<sub>2</sub> through FIA System with Conduometric Detection.** Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, 1999. 104 page. Master Dissertation.

Respirometry is a technique frequently used for the determination of biodegradation of residues that are mixed to the soil, through the action of microorganisms present in it. The respirometer normally used is the Bartha and Pramer, in which the CO<sub>2</sub> produced during the process is determined through acid-base volumetric analysis (conventional). The present work had as an objective the determination of the biodegraded CO<sub>2</sub>, (CO<sub>2</sub>)<sub>b</sub>, through the Flow Injection Analysis (FIA) with conduometric detection, a respected technique whose characteristics are precision, sensibility and shot response time. For this, the study of operation parameters of the FIA system used was made necessary. Assay of respirometry were done following the Project of Norm 01:603.06-007/1993 of ABNT, with the determination of (CO<sub>2</sub>)<sub>b</sub> through volumetric analysis and FIA system. The results obtained are very satisfactory. It was possible to identify that the obtained curves present the same behavior as expected in theory, allowing the identification of the phase of microbiological growth.

**Keywords: Respirometry, Flow Injection Analysis (FIA), biodegraded CO<sub>2</sub>**

## Apêndice A – Preparo das soluções utilizadas

Neste apêndice se encontra a descrição do modo de preparação das soluções necessárias para a realização dos ensaios propostos.

a. Preparação de solução padrão de carbonato de sódio: o sal deve ser aquecido por período de tempo entre 30 e 45 minutos com temperatura entre 260 e 270 °C e ser resfriado em um dessecador. Atenção para que a temperatura não ultrapasse 270 °C, pois pode ocorrer perda de CO<sub>2</sub> acima desta. Com o sal já frio, preparar a solução com a concentração desejada (padrão primário) (Baccan et al, 1979).

b. Calibração de pipetas volumétricas: 3 erlenmeyers, para cada pipeta volumétrica, devem ser secos em estufa com temperatura de 100°C por aproximadamente 45 minutos e resfriados em dessecador. Enquanto isso, um frasco contendo água deve ser colocado na sala onde a aferição será realizada, para que esta atinja a temperatura ambiente. Um termômetro deve ser usado para determinar a temperatura que a água se encontra durante a realização da medida. Deve-se anotar a massa do erlenmeyer vazio; completar a pipeta a ser calibrada com a água já em equilíbrio com o ambiente e ajustar seu nível (menisco), deixar seu conteúdo escoar no erlenmeyer cuja massa já foi anotada, e verificar a nova massa obtida, agora com o erlenmeyer contendo água. Por diferença das massas e

sabendo a densidade da água naquela temperatura, é possível determinar o volume da pipeta de interesse, segundo a equação b.1 (Baccan et al, 1979).

$$V_{pipeta} = \frac{m_c - m_v}{d_{T/^\circ C}^{H_2O}} \quad (b.1)$$

onde:  $m_c$  = massa do erlenmeyer cheio,  $m_v$  = massa do erlenmeyer vazio,

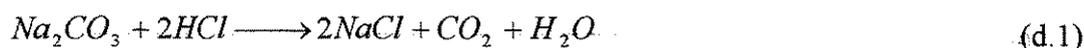
$d_{T/^\circ C}^{H_2O}$  = densidade da água na temperatura T em  $^\circ C$ ,

T/ $^\circ C$  = temperatura marcada pelo termômetro utilizado, em  $^\circ C$ .

c. Preparação de solução de ácido clorídrico 0,2 M: para preparar 1 L de HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>, serão necessários 16,7 mL de ácido clorídrico concentrado (12 mol L<sup>-1</sup>), para a determinação da quantidade de CO<sub>2</sub> através de titulação ácido-base, seguindo o procedimento do Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT.

d. Padronização da solução de HCl 0,2 mol L<sup>-1</sup>: Deve-se obter uma massa de aproximadamente 0,4 ± 0,0001 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> anidro, e em seguida adicionar entre 50 e 75 mL de água, além de 2 gotas de vermelho de metila, que será usado como indicador, desde que o CO<sub>2</sub> que exista em solução seja eliminado, por ebulição, próximo ao ponto final da titulação. Quando tem-se elevadas concentrações de CO<sub>2</sub>, este indicador fornece uma coloração vermelha, como as produzidas durante as titulações com carbonato, acarretando erro na determinação do fim da análise. Desta forma, a solução, quando mudar de cor, deve ser aquecida, permanecendo em ebulição durante 2 minutos, e assim eliminar o CO<sub>2</sub>. A cor original do indicador retornará. Resfrie a solução em água corrente. Repita o processo até que a cor não mude mais durante a fervura (geralmente são necessárias duas fervuras). Deve-se tomar cuidado para não

haver perda de líquido durante a ebulição. O cálculo da concentração obtida para o ácido recém padronizado se processa da seguinte forma (Baccan et al, 1979):



$$2M_{\text{HCl}}V_{\text{HCl}} = \frac{m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{MM_{\text{Na}_2\text{CO}_3}} \quad (\text{d.2})$$

$$2n_{\text{HCl}} = n_{\text{CO}_3^{2-}} \quad (\text{d.3})$$

onde:  $n_{\text{HCl}}$  = número de mols de ácido clorídrico,

$n_{\text{CO}_3^{2-}}$  = número de mols de carbonato,

$M_{\text{HCl}}$  = molaridade do ácido clorídrico,

$V_{\text{HCl}}$  = volume gasto de ácido clorídrico,

$m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$  = massa de carbonato de sódio,

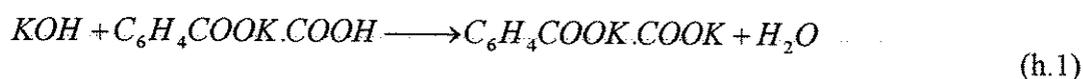
$MM_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$  = massa molecular do carbonato de sódio.

e. Preparação de solução de ácido sulfúrico 0,2 mol L<sup>-1</sup>: para se preparar 1 L desta solução, serão necessários 11 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, que será utilizado como fluxo carregador no sistema FIA na determinação de CO<sub>2</sub> na fase aquosa (Baccan et al, 1979).

f. Preparação de soluções padrões de carbonato de sódio em várias concentrações a partir da diluição da solução padrão recém preparada, utilizando as pipetas volumétricas e balões volumétricos calibrados. O solvente utilizado será hidróxido de potássio 0,40 mol L<sup>-1</sup>.

g. Preparação da solução de hidróxido de potássio  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ : para se preparar 1 L desta solução, será necessário  $22,4 \pm 0,01 \text{ g}$  de KOH, que será utilizada como solvente das soluções padrão de carbonato de sódio, além de ser utilizado durante os ensaios de respirometria com a finalidade de absorver o  $\text{CO}_2$  produzido durante o processo de respiração dos microrganismos do solo. Manter em recipiente plástico, com filtro de ascarita ou cal sodada. Esta solução deve ser padronizada cada vez que for utilizada (Baccan et al, 1979).

h. Padronização da solução de KOH  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ : Deve-se titular 100 mL de solução de ftalato de potássio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  com a solução de KOH que se deseja padronizar, utilizando vermelho de metila como indicador. A mudança de coloração vai do vermelho para amarelo. O cálculo da concentração obtida para a solução de KOH recém padronizado se processa da seguinte forma (Baccan et al, 1979):



$$M_{\text{KOH}} V_{\text{KOH}} = M_{\text{ftalato}} V_{\text{ftalato}} \quad (\text{h.2})$$

$$n_{\text{KOH}} = n_{\text{ftalato}} \quad (\text{h.3})$$

onde:  $n_{\text{KOH}}$  = número de mols de hidróxido de potássio,

$n_{\text{ftalato}}$  = número de mols de ftalato de potássio,

$M_{\text{KOH}}$  = molaridade do hidróxido de potássio,

$V_{\text{KOH}}$  = volume gasto de hidróxido de potássio,

$M_{\text{ftalato}}$  = molaridade do ftalato de potássio,

$V_{\text{ftalato}}$  = volume gasto de ftalato de potássio.

i. Preparação de solução padrão de ftalato de potássio  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ : o sal deve ser aquecido em estufa por período de tempo de 30 minutos com temperatura entre 110 e 120 °C e ser resfriado em um dessecador. Com o sal já frio, pesar ( $40,860 \pm 0,0001$ ) g para preparar 1 L da solução desejada. Guardar em recipiente de vidro (Baccan et al, 1979).

j. Preparação de solução de cloreto de bário  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ : para se preparar 100 mL desta solução será necessário  $12,22 \pm 0,01$  g deste sal. Esta solução tem a função de precipitar o carbonato, na forma de carbonato de bário presente no meio que será titulado na determinação volumétrica adotada pelo Projeto de Norma 01:603.06-007/1993 da ABNT.