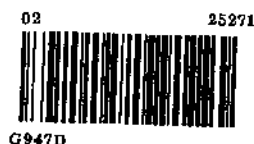


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESE DE DOUTORADO

JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES

***DETERMINAÇÃO E ESPECIAÇÃO DE
CARBONO INORGÂNICO EM ÁGUAS
NATURAIS E ATMOSFERA POR
ANÁLISE EM FLUXO***



Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES e aprovada pela comissão julgadora no dia 22 de junho de 1995.

Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

Orientador: Prof. Dr. WILSON DE FIGUEIREDO JARDIM
JUNHO/1995



UNIDADE 10
N.º CHAMADA:
1000000000
1000000000
V. Ex
TOMBO BC 25271
PROC. 433/95
C ☐ D ☒
PREÇO R\$ 11,00
DATA 10/08/95
N.º CPD

G947d Guimarães, José Roberto
Determinação e especiação de carbono inorgânico em
águas naturais e atmosfera por análise em fluxo / José Rober-
to Guimarães. -- Campinas, [SP : s.n.], 1995.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química.

1. Dióxido de carbono. 2. *Escherichia coli*. 3.*Respirometria. I. Jardim, Wilson de Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

À

Cecília e Martha,

dedico esta Tese.

Aos meus sobrinhos,

Ana Flávia,

Luiz Fernando,

Maria Claudia,

Maria Fernanda e

Rita de Cássia

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu grande amigo Wilson pela orientação no trabalho.

Aos amigos de laboratório, Marco, Airton, Ana Tereza, Sônia, Vera, Raquel, Sandra, Rosana, Cristina, Roberta, Fabiane, Edgard, Soraya, Martha, Claudía, Ronei, Ileana, Bellato, Dena, Margarete e Fernando pela convivência sempre agradável durante todos esses anos.

Ao Jarbas, Célio, Ivo, Paulão e Lori, grandes companheiros.

Aos amigos do DHS, Pedro, Edinho, Beto, Geraldo e Bruno pelas trocas de informações e grandes ajudas.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, professores e funcionários, pelo apoio demonstrado.

À Faculdade de Engenharia Civil da UNICAMP, especialmente ao Departamento de Hidráulica e Saneamento, pela oportunidade a mim concedida.

À D. Iara pelo capricho e paciência na reprodução da Tese.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foi desenvolvido um método para a determinação da concentração do carbono inorgânico total (**CO₂-total**), do carbono inorgânico dissolvido (**DIC**), do carbono inorgânico livre (**H₂CO₃^{*}**) em amostras aquosas e do dióxido de carbono gasoso (**CO₂(g)**) atmosférico. A técnica utilizada foi a Análise por Injeção em Fluxo contínuo (**FIA**) com detecção condutométrica.

O método é baseado na difusão do dióxido de carbono através de uma membrana de Teflon da amostra para um fluxo de água desionizada. A mudança na condutividade desse fluido é proporcional à concentração da espécie do dióxido de carbono presente na amostra.

Os resultados obtidos para **DIC** em amostras aquosas utilizando-se esse procedimento foram comparados com aqueles obtidos por titulação potenciométrica, via **pH** e **alcalinidade**. Os valores foram significativamente diferentes para $P = 0,01$ e $n = 10$.

Amostras de água foram colocadas em contacto com uma atmosfera contendo 425 ppmv em **CO₂**, por um período de 48 horas para que se atingisse um equilíbrio. Os resultados experimentais para a concentração da espécie **H₂CO₃^{*}** foram superiores àqueles calculados pela lei de Henry.

Foi monitorada a absorção do **CO₂(g)** por uma amostra de água proveniente de um lago. O fluxo de **CO₂** variou desde 3,3 até 14,0 mol **CO₂/m².ano**, dependendo do grau de turbulência na interface água/atmosfera. Estes resultados ficaram bem próximos daqueles descritos na literatura para sistemas lacustres, ou seja, entre 5,28 e 18,66 mol **CO₂/m².ano**.

Testes de toxicidade aguda foram realizados monitorando-se a respiração da bactéria *Escherichia coli*. Este monitoramento foi realizado tanto na fase aquosa (**CO₂-total**) quanto na fase gasosa (**CO₂(g)**), dependendo do tipo do sistema **FIA** empregado. A ordem decrescente de toxicidade para combustíveis automotivos foi **MEG** (mistura contendo 33 % de metanol, 60 % de etanol e 7 % de gasolina) > **M-etanol** (95 % de etanol e 5 % de gasolina) > **M-gasolina** (88 % de gasolina e 12 % de etanol), enquanto que para os componentes individuais a sequência foi **Etanol** > **Gasolina** > **Metanol**.

Também foram feitos testes de toxicidade dos íons **Hg(II)**, monitorando-se o dióxido de carbono na fase gasosa. Ocorreu um aumento no tempo de duplicação (**t_D**) da cultura bacteriana numa razão de aproximadamente 1,9; 2,6 e 3,1 para suspensões microbianas contaminadas com 12,5; 25 e 50 µg **Hg(II)/L**, respectivamente, quando comparadas com o controle. Para o desinfetante doméstico **Pinho Sol**, em culturas contaminadas com 0,4 e 1 %, essa razão foi de 1,6 e 4,8, respectivamente, sendo que foi observada uma inibição total de crescimento na concentração de 2 %.

ABSTRACT

In this work it was developed a method to determine the total inorganic carbon (**CO₂-total**), dissolved inorganic carbon (**DIC**), free inorganic carbon (**H₂CO₃^{*}**) in aqueous samples as well as atmospheric carbon dioxide (**CO₂(g)**) using Flow Injection Analysis (**FIA**) with a conductometric detector.

The method is based on the diffusion of **CO₂** through a PTFE (polytetrafluorethylene) from the sample to a stream of deionized water. The change in the conductance in this water stream is proportional to the carbon dioxide present in the sample.

The **FIA** method was used in the determination of **DIC** in water samples and the results obtained were compared to the ones obtained by using potentiometric titration, via **pH** and **alkalinity**. The data showed that the results differ statistically ($P = 0.01$; $n = 10$).

Water samples were allowed to equilibrate for a period of the 48 hours to a 425 ppmv carbon dioxide atmosphere. Experimental results obtained for **H₂CO₃^{*}** were higher than the ones expected according to Henry's law.

A continuous determination of the absorption of the **CO₂(g)** by lake water samples was carried out using **FIA**. The flux of carbon dioxide ranged from 3.3 up to 14.0 mol **CO₂/m².year**, according to the turbulence level in the water/atmosphere interface. The literature data shows values between 5.28 and 18.66 mol **CO₂/m².year** to similar samples.

Short-term toxicity tests using *Escherichia coli* were carried out for different stressing agents. Inhibition of the microbial respiration was monitored in the aqueous (**CO₂-total**) or gaseous (**CO₂(g)**) phase, according of the **FIA** system. The decreasing order of fuel toxicity was **MEG** (a mixture containing 33 % methanol, 60 % ethanol, and 7 % gasoline) > **M-ethanol** (95 % ethanol and 5 % gasoline) > **M-gasolina** (88 % de gasoline and 12 % ethanol), whereas for the individual sequence the observed behavior was **Ethanol** > **Gasoline** > **Methanol**.

Similar toxicity test using **Hg(II)** ions was also carried out, where the concentration of gaseous carbon dioxide (**CO₂(g)**) was monitored. For a bacterial suspension contaminated with 12.5; 25 and 50 µg **Hg(II)/L** an increase in the bacterial doubling time (**t_D**) rate of 1.9; 2.6 and 3.1, respectively, was observed when compared to the control. For a domestic disinfectant in the concentration of the 0.4 and 1 % this rate was 1.6 and 4.8, respectively, and a total inhibition at 2 % was observed.

ÍNDICE

pág.

I - INTRODUÇÃO

I.1 - O ciclo do carbono

I.2 - Metas do trabalho

01

01

05

II - DETERMINAÇÃO DO CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO (DIC) USANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (FIA)

06

II.1 - A Análise em Fluxo

06

II.2 - O sistema FIA/conducométrico

11

II.3 - Determinação da alcalinidade e DIC por titulação potenciométrica

13

II.4 - Teste de recuperação de alcalinidade e carbonato

16

II.5 - Aplicação em testes de toxicidade (respirometria): Estudo comparativo da toxidez aguda de combustíveis automotivos utilizando a bactéria *Escherichia coli*

19

II.5.1 - Procedimento do teste de toxicidade

22

II.5.2 - Determinação do CO₂-total pelo sistema de análise por injeção em fluxo contínuo

23

II.5.3 - Amostras

24

II.5.4 - Resultados e discussão

24

II.5.5 - Conclusão

31

III - DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO LIVRE (H₂CO₃^{*}) E TOTAL (CO₂-TOTAL) PELO SISTEMA FIA/CONDUTOMÉTRICO

32

III.1 - Introdução

32

III.2 - Especificação do carbono inorgânico/sistema FIA

34

III.3 - Determinação da espécie H₂CO₃^{*} (estado estacionário)

37

III.4 - Determinação da espécie H₂CO₃^{*} e CO₂-total através da injeção de um volume discreto de amostra

45

III.5 - Monitoramento da concentração da espécie H₂CO₃^{*} resultante da absorção do CO₂ gasoso

52

IV - DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO GASOSO PELO SISTEMA FIA/CONDUTOMÉTRICO	55
IV.1 - Introdução	55
IV.2 - Sistema FIA/condutoométrico utilizando injeção de volumes discretos de amostra/padrão	57
IV.2.1 - Otimização dos principais parâmetros	58
IV.2.2 - Estudo de interferentes	64
IV.3 - Aplicação do método: Teste de toxicidade aguda frente a bactéria <i>Escherichia coli</i>	68
IV.3.1 - Ensaio com íons Hg(II)	68
IV.3.2 - Variação no tempo de duplicação (t_D) microbiano sob forte agitação	70
IV.3.3 - Ensaio com desinfetante	71
IV.4 - Sistema FIA/condutoométrico para monitoramento contínuo do CO ₂ atmosférico	73
IV.4.1 - Estudo da fração gasosa permeada pela membrana	73
IV.4.2 - Estudo da troca de dióxido de carbono na interface gás-líquido para uma amostra de água natural	76
V - CONCLUSÃO GERAL	83
VI - REFERÊNCIAS	87

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO:

L1 - O ciclo do carbono.

O ciclo de carbono na biosfera tem sido significativamente alterado pela atividade do Homem nos últimos 150 anos. A queima de combustíveis fósseis fez com que a concentração do dióxido de carbono na atmosfera, que era de 250 ppmv antes da revolução industrial, atingisse a 315 ppmv em 1958, por volta de 350 ppmv em 1989 (Hileman, 1989) e hoje está próximo de 365 ppmv.

Atualmente, o CO₂ emitido através da atividade humana é da ordem de 8,5 bilhões de toneladas anuais, sendo que apenas metade desse total permanece na atmosfera. A outra metade acredita-se que seja incorporada pelo solo, florestas (Aiken e colaboradores, 1991; Vitousek, 1991) e oceanos (Walt e colaboradores, 1993), cujos mecanismos ainda não são completamente esclarecidos.

O papel da hidrosfera no mecanismo de absorção de CO₂ atmosférico é de vital importância, pois esta cobre 7/10 da superfície da Terra. Bradshaw e Brewer (1988), mostram que as águas oceânicas superficiais estão tendo um incremento de 1 µmol CO₂/kg/ano em relação ao dióxido de carbono total (CO₂-total).

Lerman e Stumm (1989), descrevem que embora os lagos de água doce cubram apenas cerca de 2 % de toda superfície continental, se eles atuassem como um compartimento de absorção da fração de todo CO₂ atmosférico emitido nos últimos 20 anos, a concentração média de carbono inorgânico dissolvido (DIC) poderia aumentar cerca de 20 mg C/L. Esse valor é cerca de 2 - 3 vezes maior que a concentração média atual.

Esses dois exemplos mostram como a hidrosfera é um importante reservatório no ciclo do CO_2 . Infelizmente, muitos aspectos da química aquática do CO_2 ainda são obscuros, especialmente em situações de não equilíbrio com respeito ao CO_2 atmosférico. Esta situação é causada principalmente por atividades biológicas, por exemplo a respiração e a fotossíntese, onde a produção e o consumo do dióxido de carbono aquoso pode exibir uma cinética rápida ou lenta, resultando em corpos d'água supersaturados ou insaturados em comparação com a concentração do gás na atmosfera.

Do ponto de vista analítico, a determinação de espécies carbônicas inorgânicas, tanto na água doce como na água de mar, pode ser dividida basicamente em duas partes: (a) a determinação do **CO_2 -total** em amostras não perturbadas e (b) determinação após acidificação da amostra e arraste do CO_2 com gás inerte.

Em amostras não perturbadas, o procedimento mais usual para a determinação do **CO_2 -total** é via titulação potenciométrica (Dyrssen, 1965; Dyrssen e Sillen, 1967; Perez e Fraga, 1987; Van den Berg e Rogers, 1987 e Wedborg, 1988). Quando uma amostra aquosa é perturbada por acidificação e todo o CO_2 é arrastado com gás inerte, o dióxido de carbono é usualmente determinado utilizando, principalmente, análises coulométricas e absorção na região do infravermelho (Swinnerton e outros, 1962; Roberts e Smith, 1988; Glab e Hulanicki, 1989).

É importante mencionar que o termo "dissolvido" é baseado no tratamento que a amostra recebeu antes da análise. Frequentemente, as determinações são realizadas em amostras não filtradas. Neste caso a notação **CO_2 -total** é utilizada no lugar de **DIC**.

$$\text{CO}_2\text{-total} = [\text{H}_2\text{CO}_3^*(\text{aq})] + [\text{HCO}_3^-(\text{aq})] + [\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})] + \Sigma (\text{formas particuladas de carbono inorgânico}) \quad (\text{I.1})$$

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*(\text{aq})] = [\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})] + [\text{CO}_2(\text{aq})] \quad (\text{I.2})$$

Desde que o carbono inorgânico dissolvido (**DIC**) possa ser expresso como:

$$\text{DIC} = [\text{H}_2\text{CO}_3^*(\text{aq})] + [\text{HCO}_3^-(\text{aq})] + [\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})] \quad (\text{I.3})$$

e a alcalinidade carbônica total (**ALC**) como:

$$\text{ALC} = [\text{HCO}_3^-(\text{aq})] + 2[\text{CO}_3^{2-}(\text{aq})] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+] \quad (\text{I.4})$$

então, os valores de **DIC** podem ser inferidos a partir de valores de **pH** e **alcalinidade** de acordo com a **equação I.5**, válida para um **sistema fechado** e não necessariamente em equilíbrio com o CO_2 atmosférico (Lerman e Stumm, 1989 e Kubala e outros, 1989). Isso é mostrado na seguinte expressão:

$$\text{ALC} = \text{DIC} (\alpha_1 + 2\alpha_2) + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+] \quad (\text{I.5})$$

onde,

$$\alpha_1 = ([\text{H}^+]\text{K}_1)/([\text{H}^+]^2 + \text{K}_1[\text{H}^+] + \text{K}_1\text{K}_2) \quad (\text{I.6})$$

e,

$$\alpha_2 = (\text{K}_1\text{K}_2)/([\text{H}^+]^2 + \text{K}_1[\text{H}^+] + \text{K}_1\text{K}_2) \quad (\text{I.7})$$

Os termos K_1 e K_2 são as constantes de dissociação do ácido carbônico.

Note que a concentração de todas as espécies podem ser determinadas em função de dois parâmetros facilmente mensuráveis, o **pH** e **DIC**, juntamente com **K₁** e **K₂**. Por exemplo para a espécie **[H₂CO₃^{*}]** a expressão fica:

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*]_{\text{(aq)}} = \text{DIC} \{ [\text{H}^+]^2 / (\text{K}_1\text{K}_2 + \text{K}_1[\text{H}^+] + [\text{H}^+]^2) \} \quad (\text{I.8})$$

Se for considerado um **sistema aberto** para a atmosfera, ou seja, onde haja uma troca de gases entre as duas fases, a concentração de todas as espécies carbonáceas na fase aquosa será dependente da concentração do **CO₂** presente na atmosfera.

Por exemplo, a espécie **H₂CO₃^{*}** e a pressão parcial do dióxido de carbono, **pCO₂**, estão interrelacionados pela lei de Henry (**equação 1.9**). Se o sistema aquoso está em equilíbrio com a fase gasosa, a pressão parcial do gás na solução é igual à pressão parcial do gás na fase gasosa.

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = \text{K}_\text{H} \text{pCO}_2 \quad (\text{I.9})$$

e

$$\text{pCO}_2 = x_{\text{CO}_2} (\text{P}_\text{T} - \text{pH}_2\text{O}) \quad (\text{I.10})$$

combinando as duas equações, **I.9** e **I.10**,

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = \text{K}_\text{H} x_{\text{CO}_2} (\text{P}_\text{T} - \text{pH}_2\text{O}) \quad (\text{I.11})$$

onde, **xCO₂** é a fração molar ou fração de volume do gás, **P_T** é a pressão total e **pH₂O** é a pressão de vapor da água.

Neste caso (**sistema aberto**) é importante salientar que a concentração de todas as espécies do ácido carbônico também podem ser expressas em função de $p\text{CO}_2$ e pH , desde que o sistema esteja em equilíbrio entre as duas fases.

I.2 - Metas do trabalho.

Este trabalho tem por objetivo desenvolver um procedimento analítico não perturbativo que permita a especiação e a quantificação do carbono inorgânico em diferentes situações de interesse ambiental. A técnica utilizada na quantificação do dióxido de carbono dissolvido (**DIC**) é a Análise por Injeção em Fluxo contínuo (**FIA**) acoplado a um detector condutométrico. A quantificação do dióxido de carbono livre (H_2CO_3^*) utiliza o mesmo princípio, com algumas modificações no sistema. Também é desenvolvida uma metodologia para a quantificação do dióxido de carbono gasoso (CO_2 em amostras gasosas) com algumas adaptações no método original. Este método de análise é baseado na difusão da espécie H_2CO_3^* ou CO_2 gasoso, proveniente da amostra onde contêm as espécies carbonáceas, por uma membrana de Teflon. O gás permeado é absorvido num fluxo de água desionizada e a diferença na sua condutividade é proporcional à concentração da amostra. Como aplicação do método são realizados testes de toxicidade aguda utilizando-se a bactéria *Escherichia coli* como organismo teste. Tais ensaios são baseados no monitoramento da respiração microbiana, tanto na fase aquosa (meio de cultura) quanto na fase gasosa, dependendo do tipo do sistema FIA empregado.

CAPÍTULO II

DETERMINAÇÃO DO CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO (DIC) USANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (FIA)

II - DETERMINAÇÃO DO CARBONO INORGÂNICO DISSOLVIDO (DIC) USANDO ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO (FIA):

II.1 - A Análise em Fluxo.

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 os processos fossem sendo automatizados, tornando os resultados menos sujeitos à 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.

Segundo Valcárcel e Luque de Castro (1984) os métodos automáticos de análise podem ser classificados em: (a) Métodos Automáticos Descontínuos; (b) Métodos Automáticos Contínuos; e (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, os métodos contínuos segmentados, as amostras são aspiradas sequencialmente e segmentadas pela inclusão de bolhas de ar que são eliminadas antes que o fluido atinja o sistema de detecção. No segundo não há inclusão de bolhas de ar (Ruzicka e Hansen, 1988).

Segundo van der Linden (1994), a denominação *Análise em Fluxo* é um nome genérico atribuído para todos os métodos analíticos que são baseados na introdução e processamento (tratamento) da amostra num meio que esteja fluindo. Na **figura II.1** é mostrado de forma esquemática praticamente todas as possíveis variações desse sistema. A sigla CFA é derivada do inglês "Continuous Flow Analysis; FIA, "Flow Injection Analysis"; LC, "Liquid Chromatograph" e MSFA, "Mono Segmented Flow Analysis".

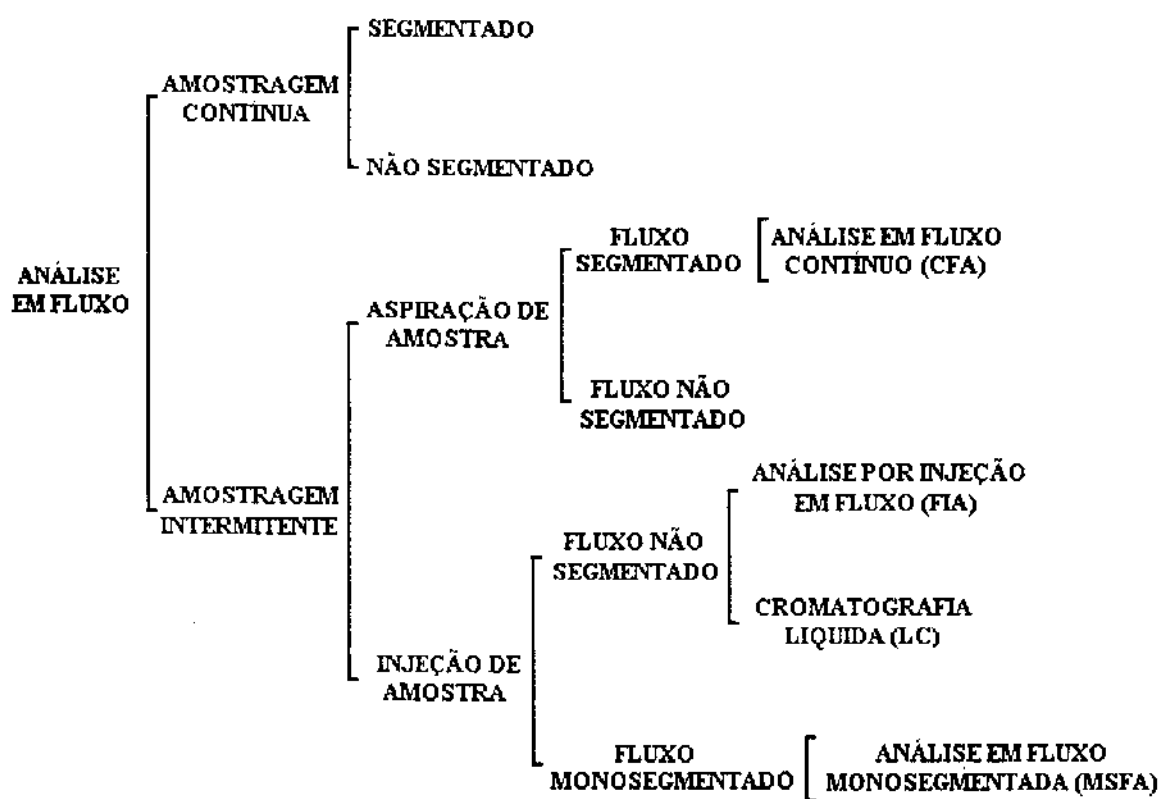


Figura II.1 Esquema de classificação dos métodos de análise em fluxo.

As Análises por Injeção em Fluxo (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.

A **figura II.2** mostra um sistema **FIA** simplificado e esquematizado. Também é mostrado como é a forma de registro (Clark e colaboradores, 1990).

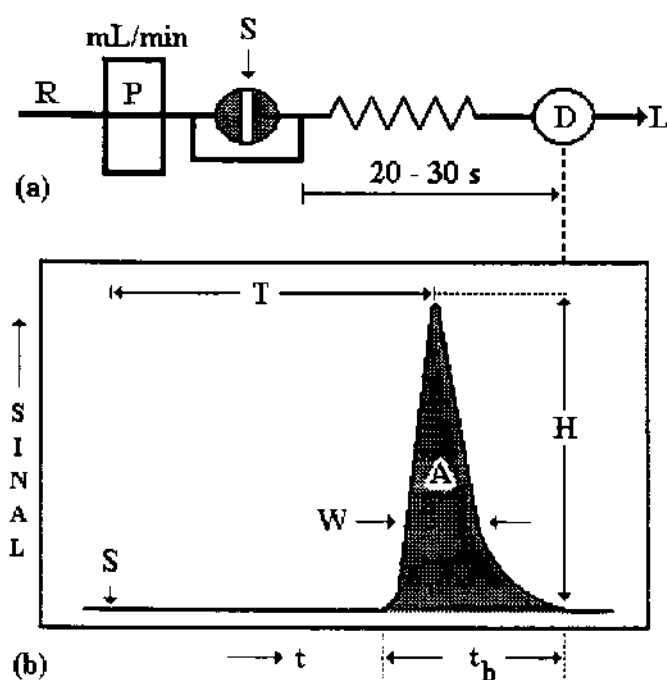


Figura II.2 (a) Sistema **FIA** de linha única, onde a amostra (S) é injetada num fluxo carregador (R), movimentado por uma bomba peristáltica (P), detectada em (D) e descartada em (L). (b) Parâmetros usualmente utilizados para caracterizar um sistema **FIA** de linha única, onde (W) é a largura do pico, (H) a sua altura, (A) sua área, (T) o tempo de residência e (t_b) a largura do pico na base.

As técnicas de análise em fluxo contínuo apresentam, normalmente, uma alta frequência analítica, baixo consumo de amostras e reagentes, alta precisão e/ou exatidão, alta sensibilidade e baixo custo de equipamentos e operação. Além

disso, apresentam uma alta versatilidade, podendo numa mesma amostra serem 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 semi-permeáveis tem sido considerada como altamente seletiva, visto que poucas espécies são geradas como gases à temperatura ambiente (Motomizu e colaboradores, 1987), diminuindo consideravelmente o problema de interferentes.

A tecnologia de membranas para a separação de fluxos contendo líquido/líquido e líquido/sólido foi (e tem sido) praticada na indústria por muitos anos através da osmose reversa, ultrafiltração e microfiltração entre outras aplicações (**figura II.3**).

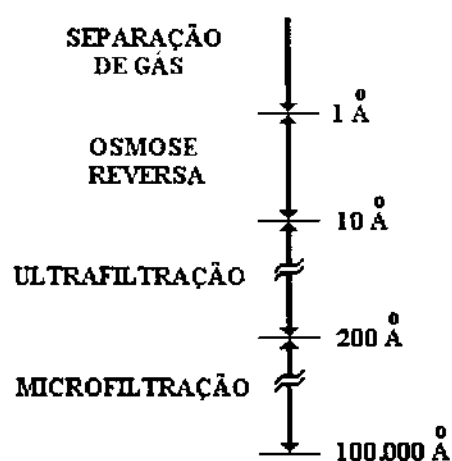


Figura II.3 Porosidade de membranas utilizadas em vários processos.

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 molecular por pequenos poros através da membrana (**figura II.4A**). A vasta maioria das aplicações comerciais é baseada em membranas não porosas. Elas não contêm nenhum poro (buraco, no sentido mais comum) e funcionam baseados no princípio de que gases se dissolvem e difundem através de materiais sólidos (**figura II.4B**).

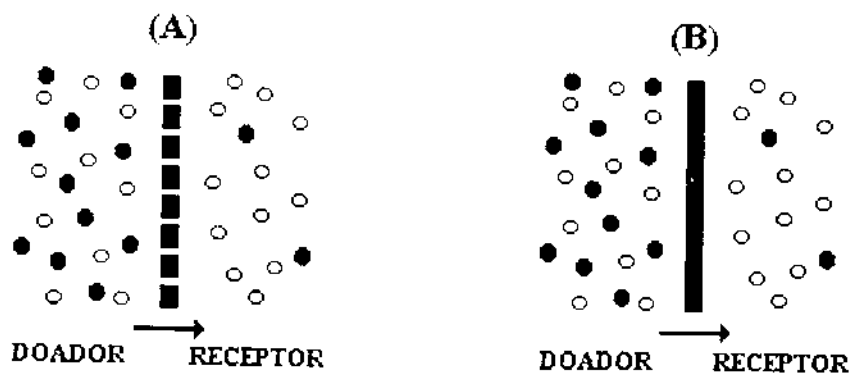


Figura II.4 Membrana porosa (A) e membrana não porosa (B).

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 semi-permeável e são absorvidos por um fluxo líquido receptor. A grande maioria dos trabalhos utilizam filmes confeccionados em polímeros tais como Teflon (PTFE = politetrafluoretileno), polipropileno (Van Der Linden, 1983; Pavón e colaboradores, 1992) e silicone (Kubán, 1992; Gonzalo e colaboradores, 1992).

II.2 - O sistema FIA/conducométrico.

Nessa primeira etapa do trabalho é apresentado o sistema **FIA** com detector conducométrico para a determinação de **DIC** em amostras aquosas. Os resultados de análises em amostras foram comparados com aqueles obtidos por titulação potenciométrica (alcalinidade). Testes de recuperação foram realizados em amostras de água de lago e de mar, nas quais foram adicionadas quantidades conhecidas de uma solução de carbonato.

O esquema do sistema **FIA** para a determinação do **DIC** é apresentado na **figura II.5**. Basicamente, este sistema é o mesmo utilizado por Jardim e colaboradores (1990) num teste de toxicidade aguda, onde foi monitorado o crescimento bacteriano (*Escherichia coli*) através da produção de CO_2 proveniente do processo de respiração desse microorganismo.

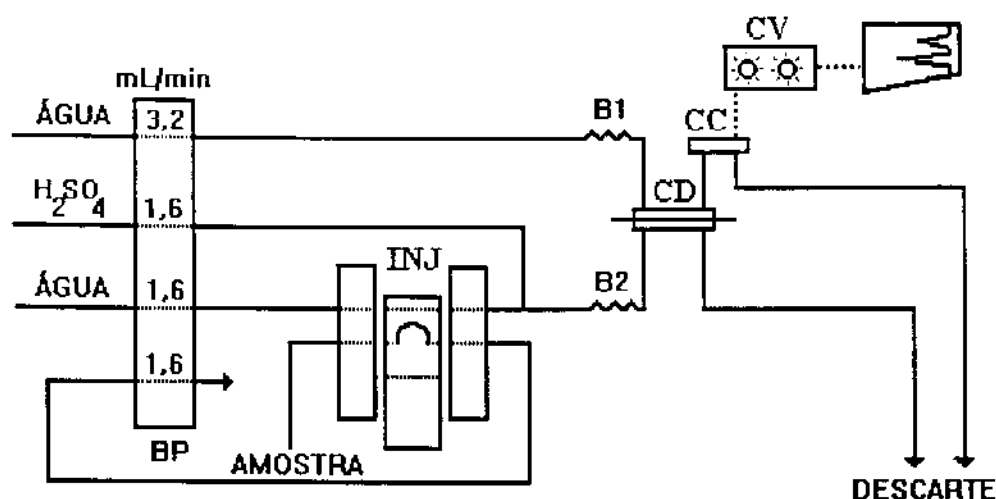
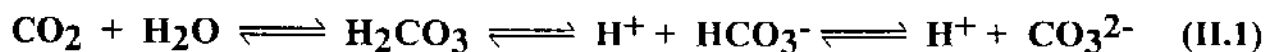


Figura II.5 Esquema do sistema FIA/conducométrico.

De acordo com a **figura II.5**, o sistema **FIA** é composto basicamente de uma bomba peristáltica - ISMATEC, tipo IPS-12/B - (**BP**); de uma válvula de injeção/comutação de amostras ou padrões (**INJ**), construída com base no trabalho de Reis e colaboradores (1989); de uma cela de difusão (profundidade = 0,1 mm, largura = 3 mm e comprimento = 100 mm) (**CD**) e de uma cela de condutividade constituída de dois cilindros concêntricos (volume = 50 µL) (**CC**), similar aquela apresentada por Pasquini e Faria (1987). O comprimento das bobinas de reação **B1** e **B2** é de 100 e 20 cm, respectivamente. Os tubos - sonda de polietileno, CPL medical's - condutores de reagentes de diâmetro interno = 0,8 mm. Os sinais são obtidos através de um condutivímetro - MICRONAL, modelo B-331- (**CV**) e enviados para um registrador - ECB, modelo RB 201.

O procedimento de análise é o seguinte: uma alíquota de 300 µL, a qual pode ser da amostra a ser analisada ou de uma solução padrão, contendo as espécies carbônicas H_2CO_3^* , HCO_3^- e CO_3^{2-} é manualmente injetada no fluxo carregador (H_2O desionizada e livre de CO_2) a qual conflui com um fluxo de ácido sulfúrico (H_2SO_4 MERCK), na concentração de aproximadamente 0,2 mol/L.

Segundo a **equação II.1**, o equilíbrio é deslocado e as espécies carbônicas presentes nesse meio ácido, praticamente são CO_2 e H_2CO_3 . Essas duas formas são definidas operacionalmente como H_2CO_3^* (**equação I.2**).



Uma fração do dióxido de carbono gasoso formado permeia na cela de difusão, através de uma membrana de Teflon (PULVITEC S.A. Ind. Com. e AKROS Industrial de Plástico Ltda), para um outro fluxo de água desionizada e o equilíbrio é novamente favorecido principalmente para a formação das espécies $\text{H}^+(\text{aq})$ e $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$. Como esse último fluxo vem sendo monitorado

constantemente quanto a sua condutividade, a presença desses íons provoca um incremento nesse parâmetro a qual é proporcional à concentração das espécies carbônicas na amostra, ou seja, **DIC** ou **CO₂-total** se a amostra não for previamente filtrada. Para uma solução de concentração 1000 µmol/L foi observado um desvio padrão relativo de 1,20 % (n = 30).

As soluções padrões de dióxido de carbono, foram preparadas a partir de uma solução estoque de Na₂CO₃ (FISHER) 0,100 mol/L. O sal foi previamente aquecido a 270 °C < T < 300 °C por 01 hora (Baccan e colaboradores, 1979). Após esse tratamento térmico uma massa conhecida do mesmo foi dissolvida num balão volumétrico, previamente calibrado, utilizando-se água destilada, desionizada e livre de CO₂. A solução estoque foi mantida num frasco de plástico (NALGENE) com rolha de borracha, a qual possuía dois tubos de polietileno, um para retirada de alíquotas para composição das soluções padrões e outro para entrada de ar propiciando o equilíbrio de pressão durante essa operação. Uma coluna de cal-sodada (VETEC) foi acoplada no segundo tubo para absorver o dióxido de carbono atmosférico.

Na **figura II.6** são mostrados os sinais típicos de uma curva de calibração. A equação que melhor descreve a curva de calibração é $Y = A X^B$, onde **Y** é a altura do sinal (condutividade arbitrária), **X** é a concentração do CO₂ (mol/L) e **A** e **B** são parâmetros ajustáveis.

II.3 - Determinação da alcalinidade e DIC por titulação potenciométrica.

As amostras de água doce, ou seja, proveniente de lago e de rio foram coletadas na superfície da coluna d'água e analisadas imediatamente após uma filtração numa membrana de 0,45 µm (MILLIPORE®). Amostras de águas marinhas foram armazenadas a -18 °C para transporte. Para análise elas foram

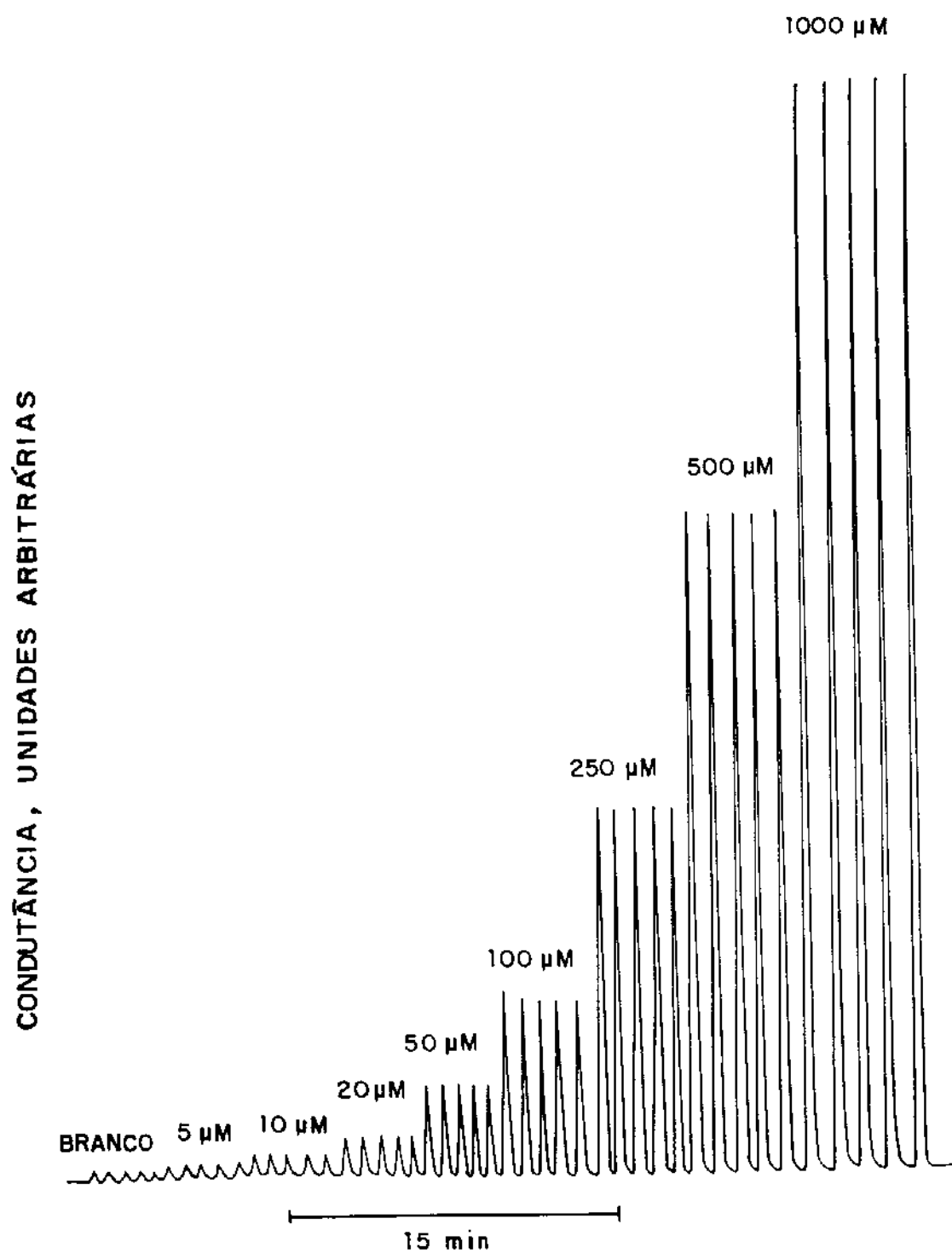


Figura II.6 Sinais de calibração típicos do sistema FIA para DIC.

descongeladas espontaneamente até atingir a temperatura ambiente. Amostras de águas minerais foram analisadas imediatamente após a abertura do frasco.

A **alcalinidade** da amostra foi determinada da seguinte forma: amostras de 49,825 mL foram tituladas com HCl (MERK) na concentração de 0,1008 mol/L, usando uma microbureta de volume total de 2000 μ L (GILMONT, modelo S-1200 A. O pH foi monitorado, à cada adição de alíquotas de ácido, com um eletrodo combinado (ROSS ORION, modelo 81-04) acoplado a um pHmetro digital (PROCYON, modelo PHD-10). O ponto final da titulação foi determinado através da equação de linearização de Ingman e Still (1966) modificada por Aleixo e Godinho (1984).

As determinações de carbono inorgânico dissolvido foram realizadas e os valores obtidos usando **FIA** foram comparados com aqueles calculados via titulação potenciométrica (alcalinidade) de acordo com a **equação 1.5**. A **tabela II.1** mostra que os valores de **DIC** inferidos à partir da **alcalinidade** e do **pH** foram na maioria das vezes superiores àqueles obtidos pelo sistema **FIA**. O teste *t* de dados pareados aplicado às duas populações mostrou que ambas são significativamente diferentes para $P = 0,01$ e $n = 10$.

Bradshaw e Brewer (1988) realizaram um levantamento detalhado a respeito da química do dióxido de carbono em ambientes marinhos. Nenhum dado confiável a respeito de alcalinidade foi obtido, para águas marinhas, até o início da década de 1960. Eles também chamaram à atenção para o fato de que mesmo tratando-se de dados recentes, há discrepâncias entre os resultados obtidos usando processos manométricos e titulação potenciométrica. Embora o método manométrico não seja sujeito às mesmas fontes de erro comumente encontrados em titulações com ácido, os autores sugerem que essas discrepâncias possam ser devido, principalmente, à fatores tais como: a) a erros assumidos em modelos

físico-químicos, b) a problemas de contaminação da amostra ou c) a contribuição de protólitos não conhecidos de ocorrência natural em águas.

Tabela II.1 Comparação entre os valores de **DIC** ($\mu\text{mol/L}$) obtidos pelo sistema **FIA** e titulação potenciométrica (**POT**).

Amostra	pH	FIA	POT	Diferença
Água mineral	7,70	2469	2432	+37
Água de rio	7,46	428	376	+52
Água de lago (A)	8,77	741	948	-207
Água de lago (B)	9,23	1078	1285	-207
Água de lago (C)	8,93	728	958	-230
Água de lago (D)	8,99	1056	1219	-163
Água de lago (E)	9,33	1009	1166	-157
Água de lago (F)	8,65	1035	1243	-208
Água de mar (A)	7,82	1752	1923	-171
Água de mar (B)	7,89	1531	1947	-416

II.4 - Teste de recuperação de alcalinidade e carbonato.

Amostras de águas superficiais tanto de um lago eutrofizado, como de mar, foram contaminadas com quantidades conhecidas de uma solução de carbonato (503 e 1006 μmol) imediatamente antes da titulação. As amostras contaminadas e não contaminadas foram então analisadas para valores de **DIC** e **alcalinidade total** de acordo com o procedimento descrito.

O erro máximo obtido para ambas as medidas **DIC-FIA** e **alcalinidade** foram -1,4 % e -1,5 %, respectivamente. Entretanto, quando os valores de **DIC** foram inferidos usando a **equação I.5 (DIC-POT)**, foram obtidos erros de até +15,0 % (**tabela II.2**).

Tabela II.2 Teste de recuperação para amostras de água de rio e de mar na qual foram adicionadas aliquotas de uma solução de carbonato (todos os dados estão em $\mu\text{mol/L}$).

adição CO_3^{2-}	sem adição	503 μmol	1006 μmol	recuperado % ^a
ÁGUA DE LAGO				
pH	8,65	9,33	9,52	-----
Alcalinidade	1260	1766	2264	101,0/100,2
DIC-FIA	1035	1286	1514	100,1/98,6
DIC-POT ^b	1243	1631	2017	109,2/115,3
ÁGUA DE MAR				
pH	7,82	8,28	8,53	-----
Alcalinidade	1988	2494	2975	101,0/98,5
DIC-FIA	1752	2000	2247	99,9/99,9
DIC-POT ^c	1923	2223	2473	102,3/102,0

^a Valores de recuperação refere-se às respectivas adições de soluções de carbonato.

^b Valores calculados à partir da **equação I.5** assumindo $\text{pK}_1 = 6,389$ e $\text{pK}_2 = 10,368$, à 21°C.

^c Valores calculados à partir da **equação I.5** assumindo $\text{pK}_1 = 6,000$ e $\text{pK}_2 = 9,115$, salinidade de 30‰, à 25°C.

Fukushi e Hiroy (1987) usaram um teste de recuperação de carbonato com o objetivo de uma avaliação da exatidão do método eletroforese capilar usado

em seus trabalhos. Para amostras de água de mar, erros da ordem de até -12 % foram observados, enquanto que em águas provenientes de regiões de estuários esse valor chegou em até -21 %.

Esse fato pode ser explicado com base na **equação I.5**. Os termos α_1 e α_2 são muito dependentes do pH e em menor extensão de K_1 e K_2 . Embora os valores de K_1 e K_2 já estejam bem documentados na literatura, à diferentes valores de temperatura e salinidade (Butler, 1982; Goyet e Poisson, 1989; Dickson e Millero, 1987; HMSO, 1987), para águas continentais a escolha desse parâmetro torna-se um problema, uma vez que a força iônica nessas águas apresenta-se com valores muito diferenciados.

Entretanto, a medida exata de pH é o parâmetro mais problemático na **equação I.5**. Por exemplo, uma pequena variação desse parâmetro de 9,33 (água de rio - **tabela II.2**) para 9,00 altera o valor de **DIC-POT** em +3,8 %.

Este comportamento também mostra que há uma utilização duvidosa no uso de valores de alcalinidade para inferir valores de **DIC**, uma vez que águas naturais frequentemente não estão em equilíbrio com o CO_2 atmosférico devido principalmente a atividades biológicas. Além disso, os valores de pH medidos experimentalmente podem exibir valores diferentes daqueles esperados devido principalmente à cinética lenta do fluxo de CO_2 na interface atmosfera/água.

Em termos analíticos, a alcalinidade considerada nos cálculos, ou seja, a alcalinidade carbônica total (**ALC**) poderia ser operacionalmente definida como a Capacidade de Neutralização de Ácidos (**CNA**), ou **alcalinidade total**. Isso quer dizer que além dos protólitos já considerados, como aqueles oriundos do sistema ácido carbônico, amostras de águas podem ter outros protólitos como por exemplo bases orgânicas fracas na forma de substâncias húmicas e fúlvicas, principalmente em águas continentais e espécies derivadas do ácido bórico (H_3BO_3), as quais

estão na faixa de $4,1 \times 10^{-4}$ mol/L em águas marinhas (Stumm e Morgan, 1981; Bisogni Jr, 1991; Dickson, 1992; Melo, 1993).

II.5 - Aplicação em testes de toxicidade (respirometria): Estudo comparativo da toxidez aguda de combustíveis automotivos utilizando a bactéria *Escherichia coli*.

No cenário atual, as fontes tradicionais de energia tais como o carvão, o gás natural e a energia nuclear não podem ser aproveitadas no setor de transportes com grande êxito sob o aspecto custo/benefício ou risco/benefício. Desta maneira, as misturas de hidrocarbonetos, principalmente a gasolina e mais recentemente o óleo diesel têm sido os principais combustíveis no suprimento de parte da demanda energética e principalmente da indústria automotiva (Ecklund e Mills, 1989). Com a crise mundial do petróleo, por volta de 1973, muitos foram os países que dedicaram esforços para a obtenção de outros recursos energéticos, principalmente fontes de energias renováveis (Azevedo e Borges, 1990; Mills e Ecklund, 1989; Manahan, 1984; Moreira e colaboradores, 1990).

Aliado ao interesse recente dispensado aos problemas de preservação ambiental, esta busca dos chamados "combustíveis renováveis" têm sido norteadas visando a obtenção de combustíveis que causem menos danos ao meio ambiente do que aqueles já usados tradicionalmente. Os combustíveis ditos "limpos" com relação às emissões provocadas pela sua queima estão em destaque.

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de se obter combustíveis alternativos para a frota automotiva. Os principais combustíveis pesquisados, e já em uso em alguns países, são aqueles conhecidos como combustíveis oxigenados. As duas principais classes desses combustíveis compreendem os álcoois e éteres.

Os álcoois e éteres têm despertado grande interesse por vários fatores. Eles possuem uma maior octanagem quando comparados principalmente com a gasolina e diesel e podem ser obtidos à partir de várias fontes tais como o carvão, o gás, o petróleo e principalmente de biomassa e produtos e/ou rejeitos agrícolas. Do ponto de vista ambiental, esses combustíveis apresentam uma grande vantagem por serem menos deletérios ao meio ambiente. Quando comparados à gasolina, emitem geralmente uma quantidade menor dos compostos NO_x , SO_x , CO e hidrocarbonetos (Azevedo e Borges, 1990; Mills e Ecklund, 1989; Manahan, 1984).

Os principais combustíveis oxigenados atualmente utilizados e pesquisados globalmente são o metanol, o etanol, o álcool isopropílico, o álcool *s*-propílico, o álcool *t*-butílico, o metil *t*-butil éter (MTBE), o etil *t*-butil éter (ETBE), o *t*-amino-butil éter, além de possíveis misturas envolvendo dois ou mais desses compostos (Ecklund e Mills, 1989; Moreira e colaboradores, 1990).

O metanol é um dos combustíveis que vem se firmando como um dos mais promissores para o futuro. Esta substância já foi utilizada em motores desde a segunda guerra mundial (Fundacentro, 1990) e devido a escassez sazonal do etanol no mercado brasileiro, o metanol voltou a ocupar um lugar de destaque dentre os combustíveis alternativos.

Os produtos emitidos na queima da mistura combustível metanol/gasolina, contendo desde 0 a 100 % (V/V) de metanol e a várias temperaturas, têm sido largamente pesquisados. As principais substâncias estudadas são os hidrocarbonetos, o monóxido de carbono, os óxidos de nitrogênio, o formaldeído e o próprio metanol (Snow e colaboradores, 1989; Gabele, 1990; Williams e colaboradores, 1990; Sodhi e colaboradores, 1990).

O metanol, sendo um composto de cadeia orgânica muito pequena, tende a apresentar uma oxidação mais completa do que outros combustíveis (por exemplo a gasolina), que possuem cadeias longas de carbono, necessitando um

maior número de reações para a completa oxidação a dióxido de carbono (Gray e Alson, 1989).

Os efeitos tóxicos do metanol em exposições agudas e crônicas são fartamente documentados (Azevedo e Borges, 1990; Moreira e colaboradores, 1990). A entrada desse composto no organismo pode ocorrer por três vias: a respiração, a cutânea e a digestiva, sendo que a probabilidade de absorção é maior pelas vias respiratória e cutânea (Fundacentro, 1990).

A maior parte do metanol absorvido pelo organismo é passível de oxidação, originando o formaldeído e o ácido fórmico, compostos esses responsáveis pela ação tóxica do metanol. Entretanto, uma pequena parte é eliminada através do ar expirado e pela urina na sua forma original (Azevedo e Borges, 1990).

No início dessa década, a chamada mistura combustível ternária, contendo 33 % de metanol, 60 % de etanol e 7 % de gasolina foi largamente utilizada nos grandes centros brasileiros. Neste sentido, houve a necessidade de um melhor monitoramento dos produtos de combustão, bem como do próprio combustível quanto ao seu potencial tóxico. Não apenas para o ser humano, mas quanto ao seu possível comprometimento da qualidade ambiental do ecossistema como um todo.

Cabe ressaltar que os órgãos responsáveis pela liberação desse novo combustível tomam como base os estudos toxicológicos do composto metanol e não da mistura contendo o metanol. Como consequência, estes dados toxicológicos podem não refletir a toxicidade real da mistura combustível por não considerar os possíveis efeitos sinérgicos, bem como antagônicos, uma vez que o combustível é composto por três substâncias discretas (na verdade uma mistura quaternária devido à água presente no metanol).

Testes de toxicidade usando microorganismos, particularmente bactérias, têm sido descritos por vários autores (ver Bittton e Dutka, 1986). Dentre os testes de toxicidade nos quais são utilizadas bactérias como organismo teste, o Microtox têm sido o mais empregado. Este teste foi desenvolvido pela Beckman Instruments, Inc. (1981) para avaliar a toxicidade aguda em amostras aquosas. O teste é baseado na medida da atividade da bactéria marinha bioluminescente *Photobacterium phosphoreum*, a qual emite luz sob condições normais.

Neste trabalho comparou-se a toxicidade aguda dos três tipos de combustíveis, os quais foram largamente utilizados no Brasil, para a bactéria *Escherichia coli*. Foram também estudados os efeitos dos componentes individuais das misturas combustíveis.

II.5.1 - Procedimento do teste de toxicidade.

Os testes de toxicidade aguda em *Escherichia coli* foram baseados na inibição da respiração microbiana (medida via CO₂) causada pelas misturas combustíveis, bem como pelos seus componentes individuais.

O meio de cultura líquido (1 litro) foi inoculado com *E. coli* (mantida em agar) e deixado à temperatura ambiente até que a suspensão bacteriana começasse a turvar. Em seguida, colocou-se num banho de água a 37 °C e fez-se o monitoramento do CO₂ até que sua concentração atingisse 0,25 mmol/L de CO₂. Cuidadosamente, alíquotas de 100 mL foram transferidas desta suspensão estoque de bactéria para Erlenmeyers de 150 mL, também mantidos no banho a 37 °C. A cultura foi então contaminada com agente tóxico. O frasco que não recebeu nenhuma adição atuou como controle. Um meio de cultura sem bactéria atuou como prova em branco. O monitoramento de CO₂ foi feito a cada 20 minutos de acordo com a seguinte ordem de análise: primeiramente analisou-se o controle; em

seguida, as culturas contaminadas e finalmente o branco. Após a determinação do CO₂ nesta série de frascos, o controle era novamente analisado. A concentração de CO₂ nos diversos frascos foi obtida por interpolação da curva de calibração.

A bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi cedida pelo Departamento de Patologia Clínica/Serviço de Microbiologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

O meio de cultura para a bactéria *E. coli* foi preparado pela adição de 1,6 g de K₂HPO₄ (MERK), 1,6 g de KH₂PO₄ (CARLO ERBA), 1,0 g de NaCl (SYNTH), 4,0 g de (NH₄)₂SO₄ (ECIBRA), 0,7 g de MgSO₄ (FISHER) e 0,3 g de ácido cítrico (MERCK) em 1 litro de água destilada (Doward e Barisas, 1984). O pH final foi ajustado em 7,00 usando uma solução de NaOH (MERCK) 4 mol/L. O meio de cultura foi colocado num forno de microondas (NATIONAL, modelo NE 7660 BH), levado até a fervura e fechado com rolha de algodão. Após o resfriamento até aproximadamente 90 °C, 2,5 g de glucose (VETEC) foram adicionados na solução e o meio de cultura foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente.

II.5.2 - Deteminação do CO₂-total pelo sistema de análise por injeção em fluxo contínuo.

O procedimento para a determinação do dióxido de carbono no meio de cultura é o mesmo descrito no **item II.2** e o esquema completo do sistema FIA/conduutométrico é mostrado na **figura II.5**.

II.5.3 - Amostras.

As amostras de combustíveis foram adquiridas em postos de vendas ao consumidor e utilizadas sem nenhum pré-tratamento. Foram utilizados os seguintes tipos de combustíveis: **M-gasolina** (mistura contendo 88 % de gasolina e 12 % de etanol anidro, **M-etanol** (mistura contendo 95 % de etanol e 5 % de gasolina) e **MEG** (mistura contendo 60 % de etanol, 33 % de metanol e 7 % de gasolina).

Neste trabalho, as misturas combustíveis serão denominadas de **M-gasolina**, **M-etanol** e **MEG** para diferenciá-las de seus componentes.

A fim de se avaliar possíveis efeitos antagônicos e/ou sinérgicos entre os componentes de cada um dos combustíveis testados, foram realizados ensaios utilizando-se individualmente a gasolina, o etanol e o metanol nas proporções equivalentes àquelas em que estes componentes estão presentes na mistura **MEG**.

A gasolina pura foi obtida tratando-se a **M-gasolina** com excesso de água para a extração do etanol. O etanol utilizado foi grau P.A. (QUIMIS) e o metanol também grau P.A. (MERCK).

II.5.4 - Resultados e discussão.

Testes de toxicidade são baseados no uso de material vivo para definir a natureza e o grau de efeitos nocivos produzidos por um simples agente tóxico ou por uma mistura de agentes tóxicos. Nesse tipo de ensaio, certos organismos selecionados são usualmente expostos a um contaminante com potencial tóxico por um determinado período de tempo. Os testes de toxicidade podem ser feitos para determinar inúmeros parâmetros, tais como a taxa de mortalidade, a imobilidade, a taxa de respiração, as taxas de reprodução e de crescimento, entre outras (Bitton e Dutka, 1986; HMSO Books, 1983).

Os testes de toxicidade são categorizados por subdivisões baseados na duração do teste, isto é, sobre o período de exposição ou sobre o período de observação, se ambos diferirem. Os dois mais utilizados compreendem a exposição crônica e a exposição aguda. Para uma melhor classificação, tem-se que analisar os resultados quanto ao tempo de resposta do ensaio e tempo de vida do organismo testado (Guimarães, 1990).

A **figura II.7** mostra o comportamento do crescimento das bactérias frente aos combustíveis **M-gasolina**, **M-etanol** e **MEG** na concentração de 1 % (V/V). Os resultados indicam que houve uma inibição da respiração microbiana frente ao combustível **M-gasolina** quando comparado ao controle. Para o **M-etanol**, a inibição foi mais acentuada, enquanto que o combustível **MEG** foi o que mais inibiu a respiração microbiana.

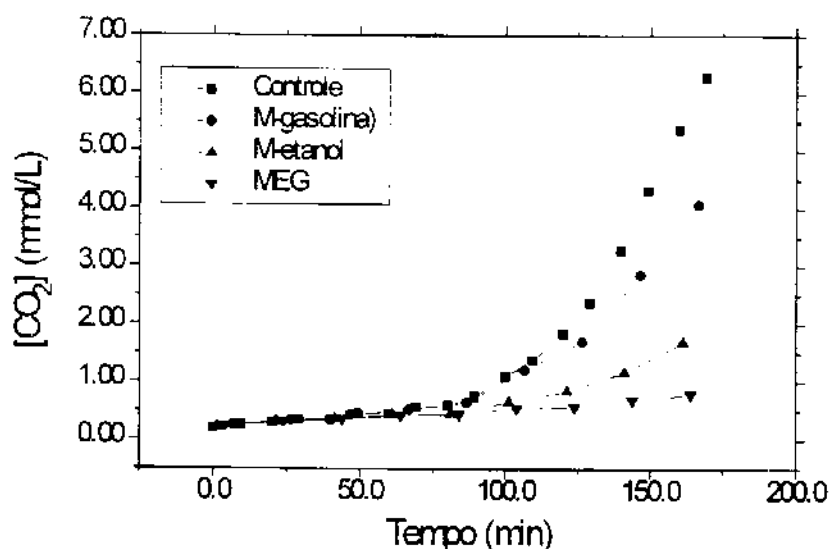


Figura II.7 Comportamento microbiano frente aos vários combustíveis na concentração de 1 % (V/V).

A título de comparação, foram realizados testes de toxicidade com os mesmos combustíveis na concentração de 2 % (V/V). O comportamento na respiração da bactéria *Escherichia coli* é mostrado na **figura II.8**. Nota-se que tal comportamento foi semelhante àquele da **figura II.7**, porém com um efeito nocivo mais acentuado. Este comportamento já pode ser notado num tempo relativamente curto após o contato das bactérias com o contaminante, ou seja, em aproximadamente 20 minutos a concentração de CO₂ no controle e das culturas contaminadas era significativamente diferente.

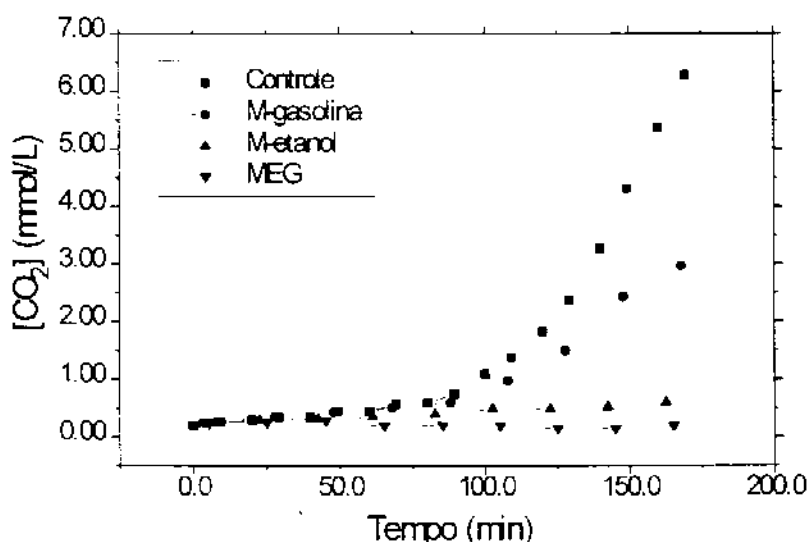


Figura II.8 Comportamento microbiano frente aos vários combustíveis na concentração de 2 % (V/V).

Na **tabela II.3** são apresentados estes resultados na forma do **tempo de duplicação (t_D)** da população das bactérias. A equação utilizada para esse cálculo foi a seguinte:

$$\ln (C_t/C_0) = kt \quad (II.2)$$

onde C_t é a concentração do dióxido de carbono (mmol/L) num tempo qualquer, C_0 é a concentração do dióxido de carbono (mmol/L) presente no meio de cultura no início de cada bioensaio, k (1/min) é a constante relacionada com o crescimento bacteriano e t é o tempo expresso em minutos. Note que $(\ln 2)/k$, ou $0,693/k$, fornece o tempo de duplicação da biomassa bacteriana (em minutos) nas condições experimentais utilizadas.

Tabela II.3 Tempo de duplicação (t_D) das culturas contaminadas com três combustíveis nas concentrações de 1 e 2 % (V/V).

	Tempo de duplicação (min)	
	1 % (V/V)	2 % (V/V)
Controle	26	26
M-gasolina	33	36
M-etanol	44	133
MEG	107	inibição total*

* durante o tempo de duração do ensaio (160 min).

Como foi observado nas **figuras II.7 e II.8**, o combustível **MEG** foi o que apresentou uma maior inibição da respiração microbiana quando comparado aos outros dois combustíveis (**M-gasolina** e **M-etanol**). Quando comparado com o tempo de duplicação do controle (26 min), note que a cultura contaminada com **MEG** 1 % (V/V) necessita agora de 107 min para duplicar sua biomassa.

Realizaram-se também testes de toxicidade com os três componentes do combustível separadamente e na sua proporção na qual eles estão presentes na mistura combustível (**MEG**), quando utilizado na concentração de 1 e 2 % (V/V). Os resultados desses ensaios estão apresentados nas **figuras II.9 e II.10**, os quais

mostram diferenças significativas quando comparados com os resultados obtidos para as misturas combustíveis.

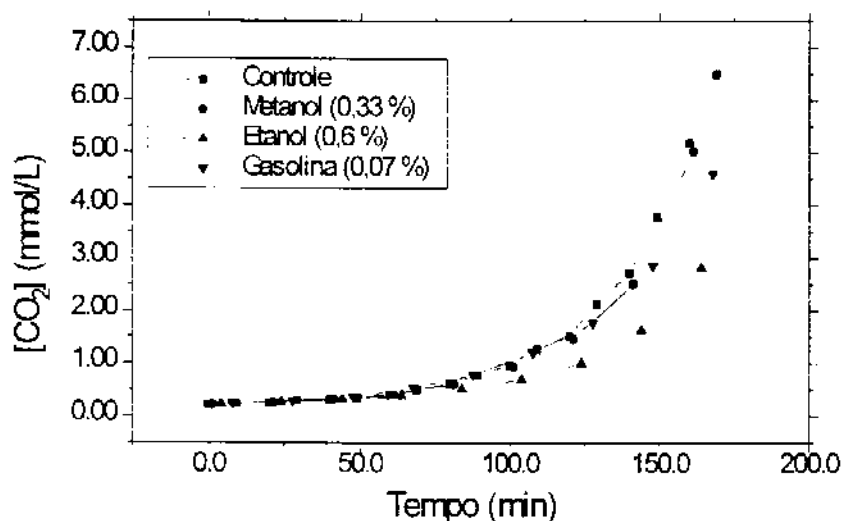


Figura II.9 Comportamento microbiano frente aos vários componentes do combustível MEG na proporção relativa de 1 % (V/V).

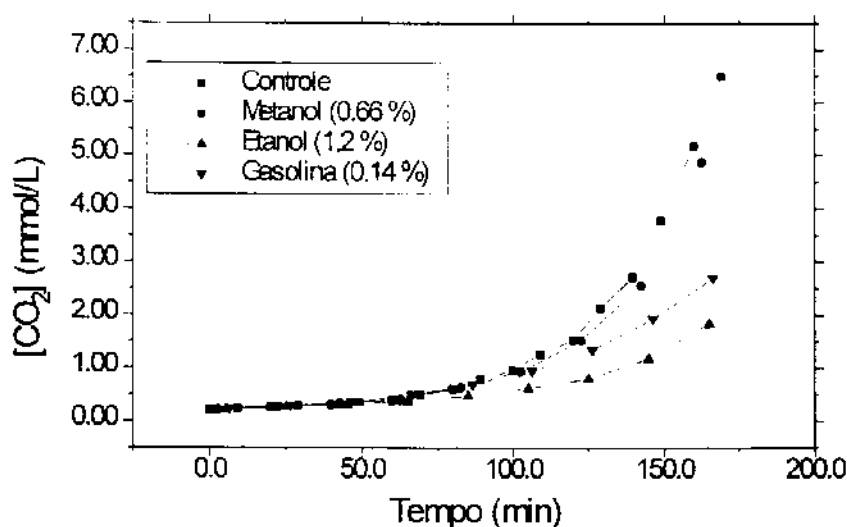


Figura II.10 Comportamento microbiano frente aos vários componentes do combustível MEG na proporção relativa de 2 % (V/V).

Para uma melhor comparação entre estes resultados, a **tabela II.4** apresenta os resultados dos ensaios com os componentes puros na forma do tempo de duplicação microbiana.

Tabela II.4 Tempo de duplicação das culturas contaminadas com os três componentes do combustível **MEG** em concentração relativa de 1 e 2 % (V/V).

	Tempo de duplicação (min)			
	1 % (V/V)		2 % (V/V)	
Controle		26		26
Metanol	0,33	28	0,66	28
Gasolina	0,07	32	0,14	41
Etanol	0,60	39	1,20	49

É importante comparar os resultados mostrados na **tabela II.3** com aqueles da **tabela II.4**. Nos testes de toxicidade aguda utilizando-se as misturas combustíveis, o **MEG** mostrou ser o mais tóxico deles para a bactéria *Escherichia coli*, apresentando inclusive uma inibição total da respiração microbiana quando utilizado na concentração de 2 % (V/V). Este comportamento não se repete, entretanto, quando os bioensaios utilizam os componentes individuais presentes nas misturas combustíveis. Na **tabela II.4**, por exemplo, fica claro que o metanol puro é menos tóxico do que a gasolina e o etanol.

Cabe ressaltar que nos resultados obtidos para o estudo da gasolina pura observou-se uma tendência na inibição da respiração bacteriana com aumento da concentração desse composto (0,07 a 0,14 %). Esse comportamento foi muito menos acentuado nos ensaios realizados com a mistura **M-gasolina**, apesar da

gasolina estar presente numa concentração bem maior (0,88 e 1,76 %). Esses dados sugeram um possível efeito antagônico entre o etanol e a gasolina, diminuindo assim o efeito tóxico deste último para o organismo teste nas condições experimentais utilizadas neste ensaio.

No caso do etanol, efeitos sinérgicos ou antagônicos não foram detectados. No entanto, pode ser observado que a inibição aumenta com aumento da concentração no meio de cultura, independentemente do composto estar presente na forma pura ou misturado à gasolina.

Esses resultados vêm comprovar que os efeitos sinérgicos, bem como antagônicos, não podem ser desconsiderados em se tratando da avaliação do potencial tóxico das misturas combustíveis. Infelizmente, os procedimentos utilizados usualmente na avaliação da toxicidade dos combustíveis são baseados em dados obtidos para os componentes separadamente (Moreira e colaboradores, 1990). Estudos mais detalhados desta possível interação certamente serão necessários para esclarecer pontos ainda obscuros nestes estudos de ecotoxicidade.

Num estudo realizado por Branco e colaboradores (1990), os mesmos afirmam que "A despeito de não terem sido desenvolvidos estudos específicos para o gerenciamento de acidentes e o manuseio de "metanol-combustível", pode-se admitir que os procedimentos indiscutivelmente aceitos para o "metanol-produto-químico" e para outros combustíveis líquidos são suficientes para o controle dos riscos envolvidos neste caso...". Esta afirmativa pode ser questionada a partir dos dados apresentados neste trabalho, que mostram claramente que a toxicidade aguda do metanol para um organismo ubíquo no meio ambiente é muito menor do que a toxicidade da mistura combustível contendo este composto.

II.5.5 - Conclusão.

Pelos dados obtidos nos testes de toxicidade aguda utilizando *E. coli* pode-se concluir que:

a) A ordem decrescente de toxicidade para as misturas combustíveis estudadas foi:
MEG > M-etanol > M-gasolina.

b) A ordem decrescente de toxicidade para os componentes individuais foi:
Etanol > Gasolina > Metanol.

Deste modo, pode-se afirmar que estudos para a avaliação do potencial tóxico de combustíveis automotivos devem ser realizados com a mistura combustível e não apenas com seus componentes separadamente. Os resultados dos testes de toxicidade obtidos neste trabalho indicam um possível efeito sinérgico nas misturas combustíveis.

CAPÍTULO III

**DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO
LIVRE (H_2CO_3^*) E TOTAL ($\text{CO}_2\text{-TOTAL}$) PELO
SISTEMA FIA/CONDUTOMÉTRICO**

III - DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO LIVRE (H_2CO_3^*) E TOTAL (CO_2 -TOTAL) PELO SISTEMA FIA/CONDUTOMÉTRICO:

III.1 - Introdução.

A hidrosfera tem um papel importante como fonte e absorção do dióxido de carbono, uma vez que 7/10 da superfície do planeta é coberta por águas (marinhas e continentais). A troca de CO_2 entre a atmosfera e os oceanos é de grande importância para o entendimento das consequências de alterações climáticas, principalmente pela produção antrópica do dióxido de carbono (Weiss e colaboradores, 1982). Quando a pressão parcial do CO_2 em águas marinhas é superior àquela do próprio ar na interface água/ar, o dióxido de carbono tende a escapar para a atmosfera e vice-versa (Takahashi, 1989).

As várias concentrações de espécies derivadas do sistema ácido carbônico em solução aquosa, em contato direto com a atmosfera, e em equilíbrio, podem ser calculadas utilizando-se dois dos quatro parâmetros: dióxido de carbono total (CO_2 -total), alcalinidade carbônica (ALC), pH, e pressão parcial do CO_2 ($p\text{CO}_2$) juntamente com as constantes termodinâmicas (Stumm e Morgan, 1981; Butler e Mackey, 1992; Poisson e colaboradores, 1990; Goyet e colaboradores, 1992). A escolha é feita de acordo com o objetivo do trabalho, bem como da facilidade em se realizar as medidas (Takahashi e Kaiteris, 1976).

Os dados obtidos a partir do monitoramento da pressão parcial do dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) são normalmente utilizados para a confecção de mapas, nos quais são mostradas áreas de liberação ou absorção do gás em oceanos e mares. O parâmetro $p\text{CO}_2$ pode ser expresso em solução real em termos de fugacidade ($f\text{CO}_2$). Essa medida é feita equilibrando-se uma amostra de água com um volume conhecido de ar, e determinando-se a fração molar do CO_2 resultante no ar. Os

dados de concentração de CO_2 no ar, antes e após o contacto entre as duas fases são comparados, e o resultado é expresso em termos dessa diferença ($\Delta p\text{CO}_2$) (Takahashi, 1989; Metzel e colaboradores, 1991).

Takahashi e colaboradores (1976), desenvolveram um sistema, no qual acontecia o equilíbrio entre as fases gasosa e aquosa, para avaliar a pressão parcial do dióxido de carbono ($p\text{CO}_2$) em águas marinhas. Um analisador de gás, na região de infravermelho, foi utilizado para a determinação da concentração do CO_2 . Os trabalhos foram realizados durante um cruzeiro e os resultados tiveram uma precisão de $\pm 2 \%$ para $p\text{CO}_2$.

Uma estimativa de $p\text{CO}_2$ foi realizada por Butler e Mackey (1992) em águas oceânicas (Tasman Sea e numa região próxima à Nova Zelândia) utilizando determinações de pH e alcalinidade. No entanto, quando esses dados foram comparados com aqueles obtidos por um analisador de gás (região de infravermelho) houve uma diferença de aproximadamente 20 ppmv, ou seja, os dados obtidos via pH e alcalinidade foram sistematicamente inferiores.

Murphy e colaboradores (1991) também realizaram estudos no Oceano Pacífico Sul, empregando a cromatografia gasosa para determinação do CO_2 tanto no ar como no gás proveniente do sistema de equilíbrio ar/água de mar. O CO_2 das amostras gasosas era convertido cataliticamente em metano e quantificado num detector de ionização em chama. Esses estudos mostraram que o Pacífico Sul não se comporta como um absorvedouro de CO_2 , pelo menos durante o outono austral. Uma metodologia similar foi utilizada por Robertson e colaboradores (1993) em estudos em regiões do Atlântico Norte.

Um sensor óptico para $p\text{CO}_2$ em água de mar foi desenvolvido por Goyet e colaboradores (1992), o qual foi baseado num indicador de fluorescência e dois corantes encerrados por duas membranas de silicone permeável a gases. Uma fibra óptica servia como transmissora de sinais. No intervalo de 400-500 ppmv de

pCO₂ a exatidão foi de 3 % quando comparado com cromatografia gasosa para cinco amostra marinhas coletadas a diferentes profundidades.

Recentemente, Lefèvre e colaboradores (1993) utilizaram o mesmo princípio, ou seja, membrana de silicone-fibra óptica, porém um método colorimétrico. A variação no pH da solução do corante azul timol era detectada por um espectrofotômetro e relacionada com a concentração do dióxido de carbono (pCO₂) na água de mar. No intervalo de 340-590 μ atm uma variação de $\pm 1 \mu$ atm acusada pelo sensor e um desvio padrão de aproximadamente $\pm 3 \mu$ atm e $\pm 5 \mu$ atm de acordo com o tipo de curva de calibração.

Nessa parte do presente trabalho foi desenvolvido um sistema de Análise por Injeção em Fluxo contínuo (FIA) acoplado a um detector condutométrico para determinação do dióxido de carbono total (CO₂-total), carbono inorgânico dissolvido (DIC) e principalmente dióxido de carbono livre (H₂CO₃^{*}) em amostras aquosas. O método é baseado na difusão da espécie H₂CO₃^{*} através de uma membrana de Teflon (PTFE) a partir da amostra para uma corrente de água desionizada. A alteração na condutividade da água desionizada é proporcional a concentração de CO₂-total, DIC ou H₂CO₃^{*} na amostra, dependendo da espécie em estudo.

III.2 - Especificação do carbono inorgânico/sistema FIA.

Para realizar a especificação do carbono inorgânico foi construído um reator fechado, ou seja, um aparelho que não permitia a troca de gases na interface líquido/gás. Este reator é mostrado na **figura III.1**.

O reator, com volume de aproximadamente 700 mL foi construído com vidro borossilicato. Este componente do sistema possui três orifícios e um êmbolo. Um dos orifícios é utilizado para acoplar o eletrodo de pH (parâmetro fundamental

para a especiação), um segundo para a retirada da amostra, para quantificação da espécie H_2CO_3^* e CO_2 -total e o terceiro para adição de ácido (H_2SO_4 com concentração de aproximadamente 0,5 mol/L).

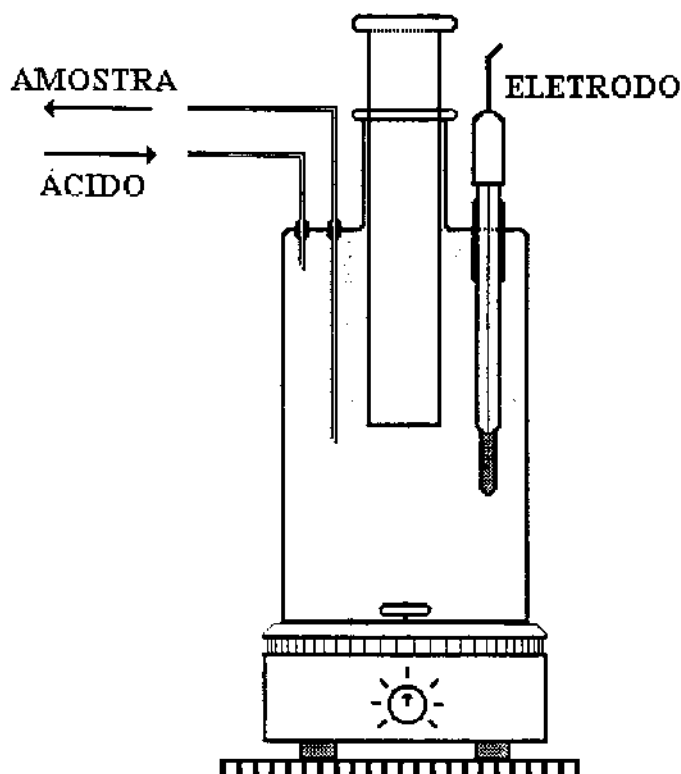


Figura III.1 Reator utilizado para a especiação.

Como o sistema proposto é de análise contínua, à medida em que a solução é retirada para quantificação, o êmbolo é deslocado para o seio da solução, não permitindo assim que se forme um "head space", ou seja, uma interface líquido/gás. Principalmente, para que o dióxido de carbono gasoso formado na solução com valores baixo de pH, não escape para a atmosfera.

O esquema completo de funcionamento do sistema FIA/conducométrico para especiação é mostrado na **figura III.2**. O procedimento

baseia-se na determinação da concentração da espécie H_2CO_3^* através da diferença de concentração da espécie em dois fluxos separados por uma membrana de PTFE, politetrafluoretileno, ou seja, uma membrana de Teflon obtida no comércio.

Como pode ser observado, este sistema possui duas válvulas de injeção/comutação, V_1 e V_2 . A primeira válvula (V_1) é utilizada para uma eventual comutação de uma amostra para outra ou de um padrão para outro, sem que seja necessário a interrupção do funcionamento da bomba peristáltica (**BP**). A segunda válvula (V_2) é utilizada para injeção de ácido (H_2SO_4 0,1 mol/L) na obtenção da curva de calibração e da concentração do carbono inorgânico total (CO_2 -total). Além disso o sistema possui uma cela de difusão (**CD**), uma cela de condutividade (**CC**), uma coluna com resina mista de troca iônica (**R**) (MERCK) e o descarte é representado por (**E**).

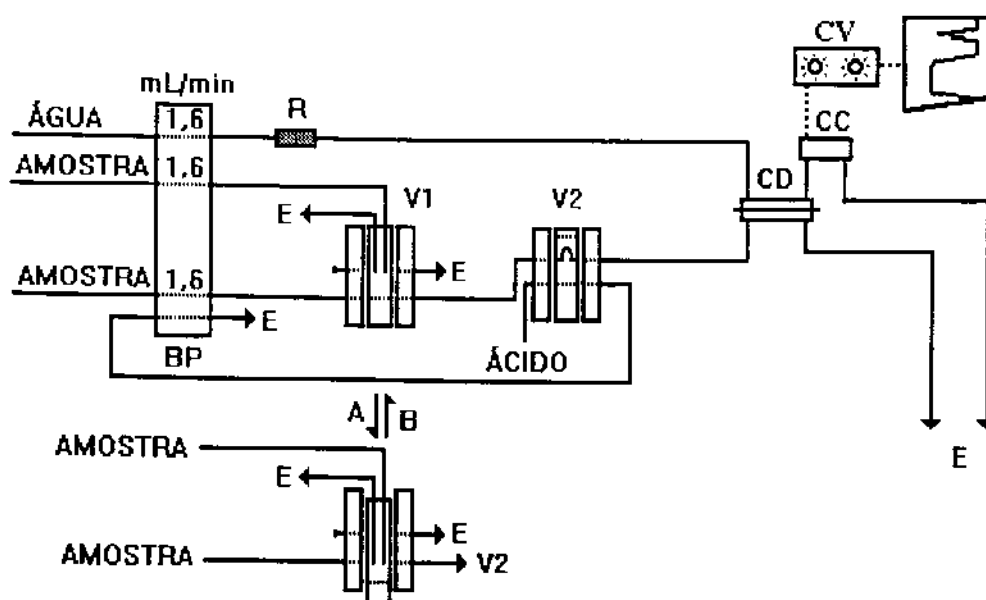


Figura III.2 Esquema de funcionamento do sistema FIA/conducométrico para a especiação.

No reator, a solução contendo as espécies H_2CO_3^* , HCO_3^- , e CO_3^{2-} é mantida à temperatura constante e sofre uma variação de pH por adição de H_2SO_4 na concentração de 0,5 mol/L, sob agitação vigorosa, para que seja homogeneizada rapidamente. Um dos tubos de polietileno serve como condutor da amostra e o outro tubo como condutor de água desionizada, a qual é monitorada constantemente quanto a sua condutividade. A cada adição de ácido na amostra a concentração de H_2CO_3^* aumenta e conseqüentemente essa espécie permeia pela membrana, atingindo o fluxo de água desionizada. A linha base é deslocada e o registro sai em forma de escada (**figura III.3**). Quando não houver mais variação na altura desses degraus, mesmo com adição de um excesso de ácido, indica que todas as espécies carbônicas estão na forma ácida.

É construída uma curva de calibração para interpolação das alturas dos degraus obtidos. Essa curva de calibração é obtida pelo sistema FIA com injeção de reagentes, onde um volume determinado de H_2SO_4 0,1 mol/L (15 μL) é introduzido no fluxo carregador do padrão, através da válvula V_2 .

III.3 - Determinação da espécie H_2CO_3^* (estado estacionário).

Como é mostrado na **figura III.3**, a curva para a quantificação da espécie H_2CO_3^* apresenta-se na forma de escada e a leitura de pH e altura do respectivo degrau é feita no **estado estacionário**. Entretanto, por questões operacionais a curva de calibração é obtida injetando-se volumes discretos das soluções padrões de carbonato e apresenta-se na forma de pico. Desse modo, para se utilizar a curva de calibração foi necessário uma otimização entre as duas formas de registro.

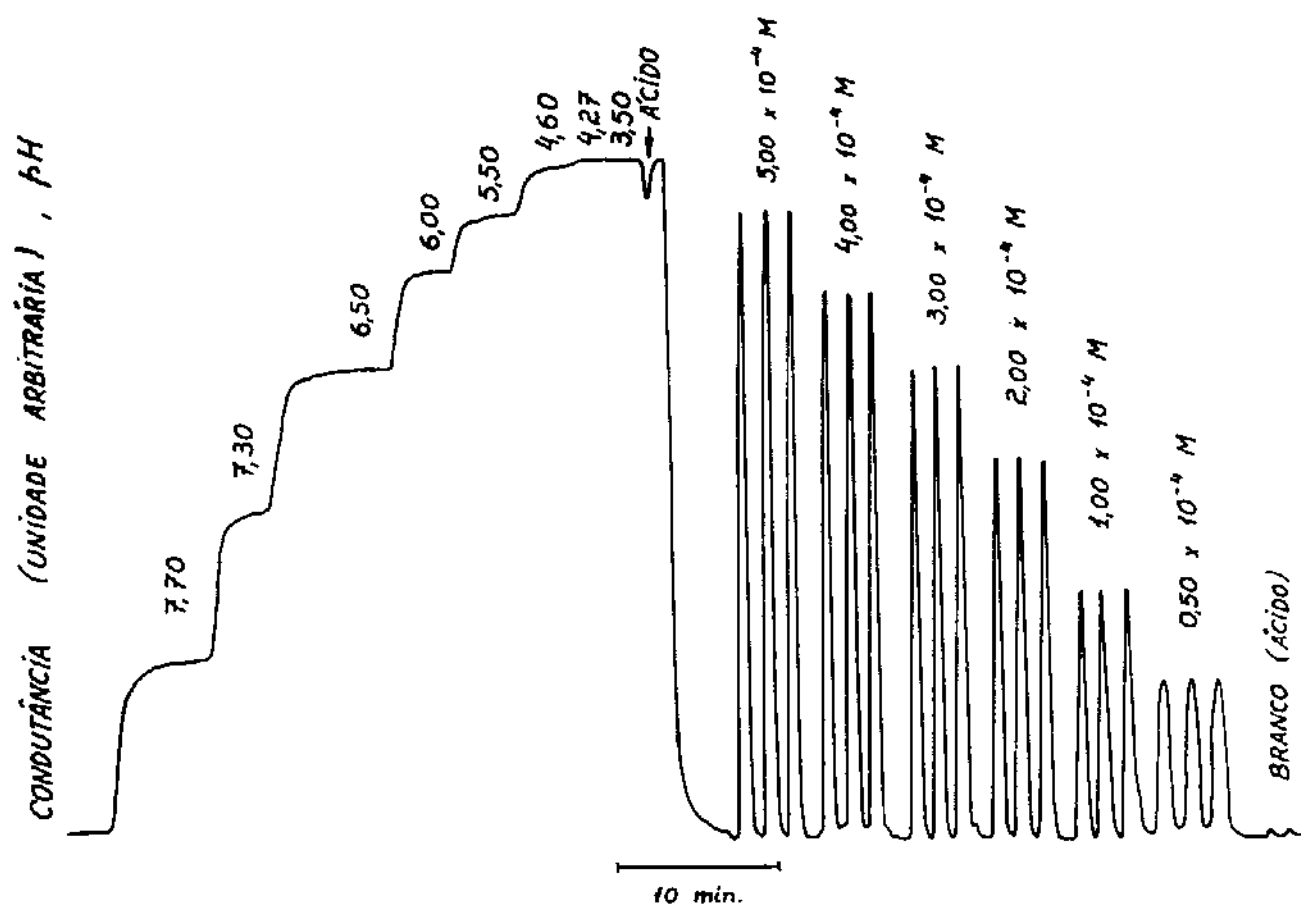


Figura III.3 Curva característica para o sistema FIA modificado e a curva de calibração.

Para esta normalização foi estudada a razão entre estes dois tipos de curva, da seguinte maneira: Primeiramente um padrão de concentração conhecida era submetido ao sistema FIA e injetava-se ácido (em triplicata) para se obter o pico. Em seguida o mesmo padrão era acidulado até pH 3,50, que correspondia a altura máxima do patamar. Para os padrões de concentração entre $1,00 \times 10^{-4}$ e $5,00 \times 10^{-4}$ mol/L, as alturas dos patamares foram sempre superiores as alturas dos picos numa razão de aproximadamente 1,12, como é mostrado na **figura III.4**.

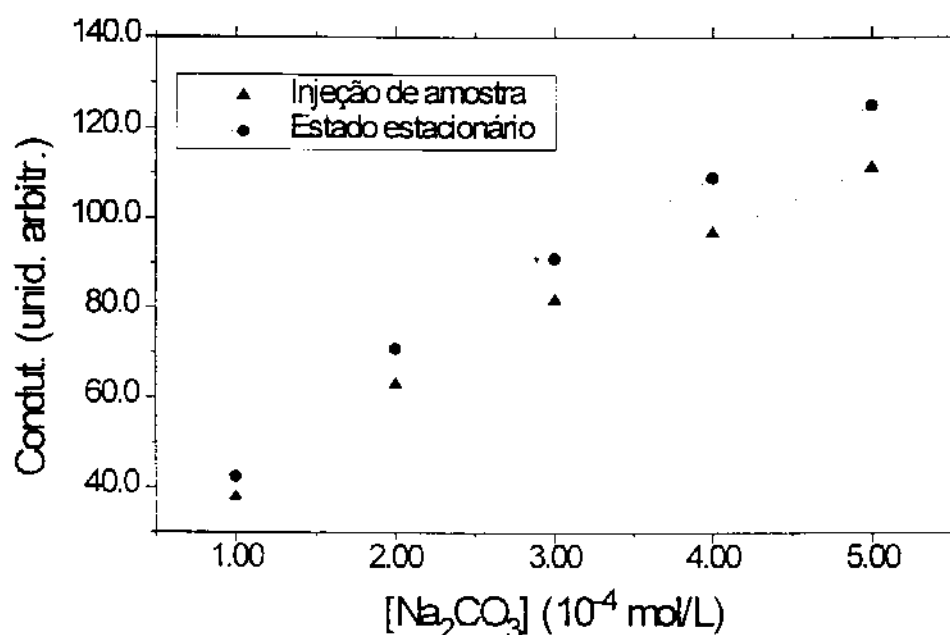


Figura III.4 Comparação entre os sinais sob duas condições experimentais para padrões de carbonato.

Foram realizados alguns experimentos, com amostras sintéticas, com o objetivo de uma especiação das formas inorgânicas H_2CO_3^* e HCO_3^- , bem como uma otimização do sistema proposto para a sua utilização em amostras naturais.

Uma comparação entre os dados experimentais e os valores teóricos esperados para H_2CO_3^* encontram-se nas figuras abaixo (**figura III.5 e III.7**), as quais serão comentadas. Estes valores foram calculados com base na **equação I.8**. Entretanto, como o valor da concentração de CO_3^{2-} no intervalo de pH estudado (abaixo de 8,0) é muito pequeno, a concentração desta espécie foi considerada desprezível frente às outras duas (H_2CO_3^* e HCO_3^-) e a **equação I.8** pode ser simplificada e re-escrita como,

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = \text{DIC} / \{ (K_1 / [\text{H}^+]) + 1 \} \quad (\text{III.1})$$

Primeiramente foi realizado um experimento utilizando uma solução de bicarbonato de sódio (VETEC) na concentração de $5,00 \times 10^{-4}$ mol/L, em duas condições de força iônica. A **figura III.5** mostra as curvas correspondentes aos valores teóricos e experimentais, considerando a força iônica apenas da solução do bicarbonato.

Analisando os resultados da **figura III.5** podemos observar um erro sistemático nas determinações experimentais, ou seja, os valores obtidos experimentalmente foram significativamente inferiores àqueles obtidos através de cálculos teóricos.

Como o pH é de fundamental importância nos cálculos teóricos, uma vez que a concentração da espécie carbônica H_2CO_3^* varia diretamente com a concentração de H^+ medida (**equação III.1**). Um pequeno erro de leitura no pH pode comprometer o resultado teórico quando comparado com o valor experimental, uma vez que em meio com baixa força iônica a estabilidade de eletrodo de vidro é seriamente comprometida.

Segundo Skoog e Leary (1992), as leituras de pH podem ter erros significativos de 1 a 2 unidades quando a determinação é realizada em soluções com baixa força iônica, tal como amostras provenientes de rios ou lagos, principalmente se o eletrodo de referência for calomelano. Além disso, se o pH de uma solução não tamponada, com baixa força iônica e próximo da neutralidade, for determinado com eletrodo de vidro, um período muito longo de tempo é requerido para que o mesmo estabilize, ou seja, a leitura é muito demorada (Christian, 1994).

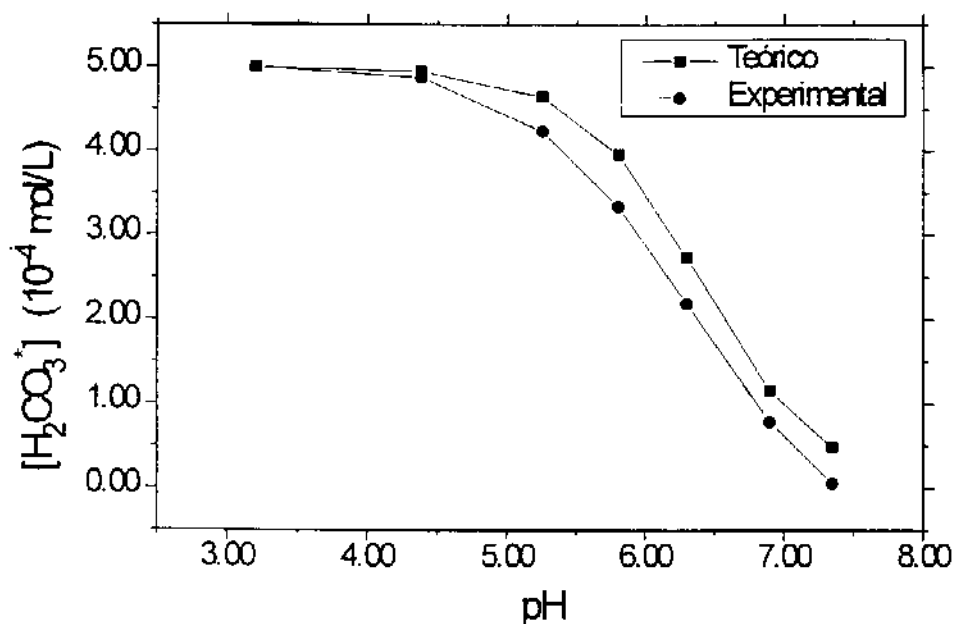


Figura III.5 Concentração da espécie H_2CO_3^* em função do pH, sob as seguintes condições: $T = 22^\circ\text{C}$; $\text{pK}_1 = 6,38$ e $I = 5,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$. Solução de bicarbonato de sódio $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Outra fonte provável de erro pode ser referente ao valor de pK_1 considerado. Por exemplo, uma pequena variação no valor da constante pK_1 de 0,10 unidades pode resultar num erro de aproximadamente 20 % no cálculo teórico da concentração da espécie H_2CO_3^* , quando utilizada a **equação III.1**. Esses dois parâmetros utilizados, provavelmente, podem não corresponder às reais condições experimentais. A **figura III.6** mostra as curvas referentes à concentração da espécie H_2CO_3^* , na concentração total de $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$, em função do pH, quando utilizado os valores de pK_1 igual a 6,28; 6,38 e 6,48. Caso este erro seja de 0,05 unidades, tanto de pH como de pK_1 , pode-se obter um erro máximo de 11,5 % na concentração da espécie H_2CO_3^* , quando utilizada a **equação III.1**.

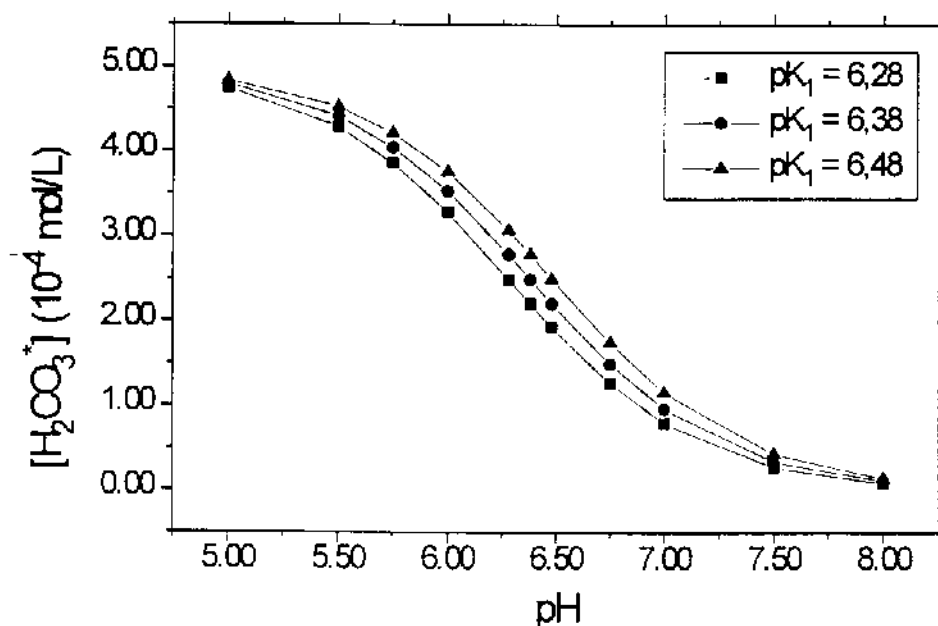


Figura III.6 Concentração da espécie H_2CO_3^* em função do pH.

Entretanto, um outro estudo foi feito ajustando-se o valor da força iônica da solução de NaHCO_3 pela adição de nitrato de sódio (NaNO_3 , ECIBRA) 0,05 mol/L. A **figura III.7** mostra os gráficos correspondentes a essa nova situação.

Nessa nova condição, como podemos observar pela **figura III.7**, as curvas correspondentes aos valores experimentais e teóricos foram praticamente iguais. Provavelmente a resposta do eletrodo nesse meio, de força iônica mais elevada, deva ser bem mais rápida, ou seja, apresenta uma estabilização num intervalo de tempo mais curto. Dessa forma, o valor de pH obtido deva ser bem mais exato e o cálculo teórico mais confiável.

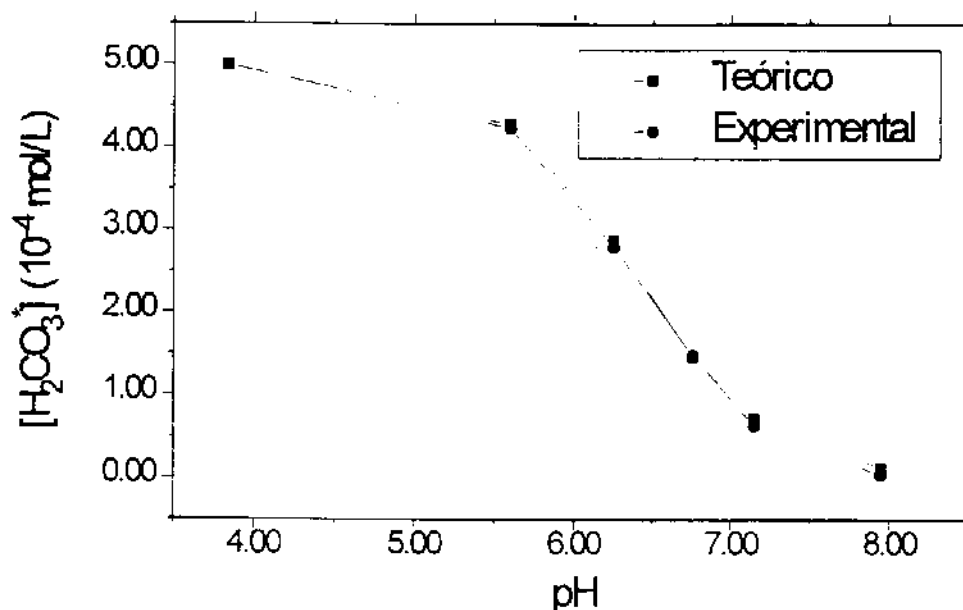


Figura III.7 Concentração da espécie H_2CO_3^* em função do pH, sob as seguintes condições: $T = 22^\circ\text{C}$; $\text{pK}_1 = 6,38$ e $I = 0,05 \text{ mol/L}$. Solução de bicarbonato de sódio $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

Apesar dos desvios encontrados no primeiro experimento (**figura III.5**), é importante salientar que o método mostrou-se muito eficiente em algumas condições (**figura III.7**), e suficientemente sensível para aplicação em sistemas aquosos naturais quanto à especiação das formas inorgânicas do carbono.

Uma outra variação no tratamento dos dados também foi proposta visando uma simplificação e independência de valores de pK obtidos através da literatura. Neste caso o pK era obtido através dos dados experimentais e utilizados na equação teórica (**equação III.1**). Note que o valor de K_1 , que corresponde ao coeficiente angular, é obtido lançando-se em gráfico a $[\text{H}^+]$ em função de $[\text{H}_2\text{CO}_3^*]/[\text{HCO}_3^-]$ (**equação III.2**), ou seja, é apenas um rearranjo da expressão que define a primeira constante de dissociação do ácido carbônico.

$$[\text{H}^+] = K_1 ([\text{H}_2\text{CO}_3^*]/[\text{HCO}_3^-]) \quad (\text{III.2})$$

Foi realizado um estudo com uma solução de bicarbonato de sódio considerando esse novo parâmetro proposto. Conforme observa-se na **figura III.8** houve uma grande concordância entre as três curvas do gráfico.

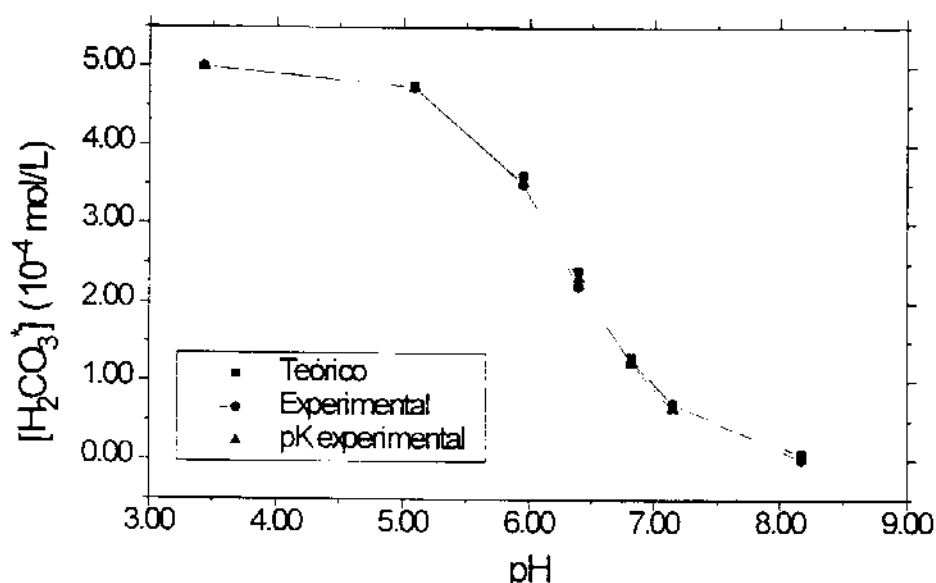


Figura III.8 Concentração da espécie H_2CO_3^* em função do pH, sob as seguintes condições: $T = 23,5^\circ\text{C}$; $\text{p}K_1 = 6,369$ e $I = 0,1 \text{ mol/L}$ (NaNO_3). Solução de bicarbonato de sódio $5,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

O mesmo experimento foi repetido utilizando-se água de lago (Lago central da UNICAMP) e um comportamento semelhante foi observado. A curva referente aos dados calculado teoricamente (**equação III.1**) foi inferior as outras duas curvas, pelo menos em alguns pontos. No entanto, quando comparamos a curva obtida experimentalmente com aquela obtida a partir do K_1 experimental notamos uma excelente concordância entre, praticamente, todos os pontos. Dessa forma podemos concluir que esses resultados, tanto da **figura III.8** como da

figura III.9, indicam que erros relativos aos valores de K considerados nos cálculos podem ser minimizados quando utilizado o procedimento proposto no tratamento dos dados.

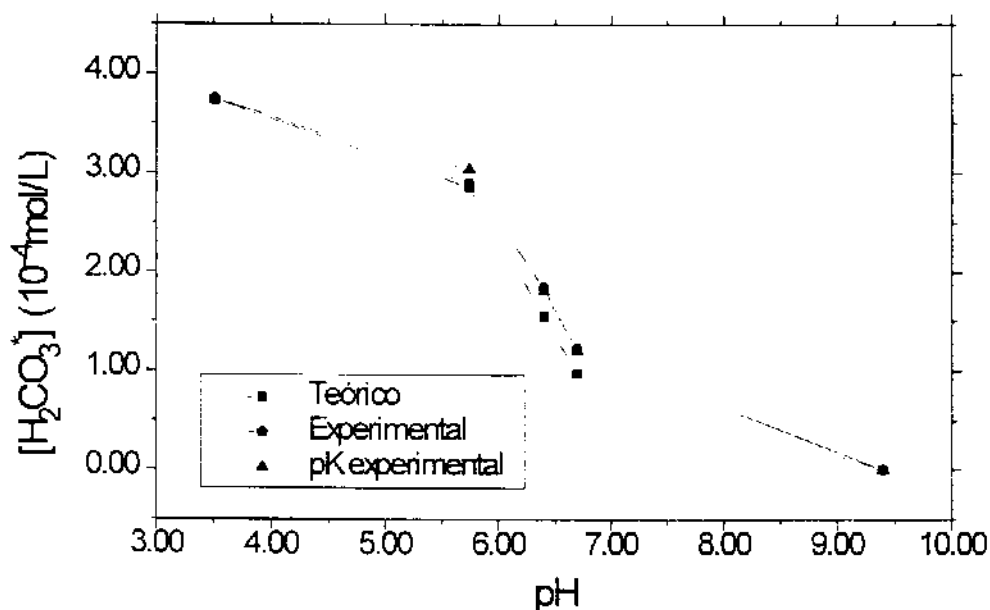


Figura III.9 Concentração da espécie H_2CO_3^* em função do pH, para água de lago, sob as seguintes condições: $T = 23^\circ\text{C}$; $\text{p}K_1 = 6,372$ e $I = 0,1 \text{ mol/L}$ (NaNO_3). Concentração de bicarbonato total de $3,74 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$.

III.4 - Determinação da espécie H_2CO_3^* e CO_2 -total através da injeção de um volume discreto de amostra.

Feita a calibração do sistema, foi proposto uma nova variação do método no sentido de aumentar a frequência analítica e minimizar o volume de amostra. Neste caso, a amostra era injetada no fluxo carregador em lugar de passar continuamente pela cela de difusão. Utilizou-se a mesma montagem do sistema FIA do caso anterior com uma pequena modificação, principalmente no que diz respeito

a utilização de apenas um injetor-comutador (V2), a qual é apresentada na figura III.10.

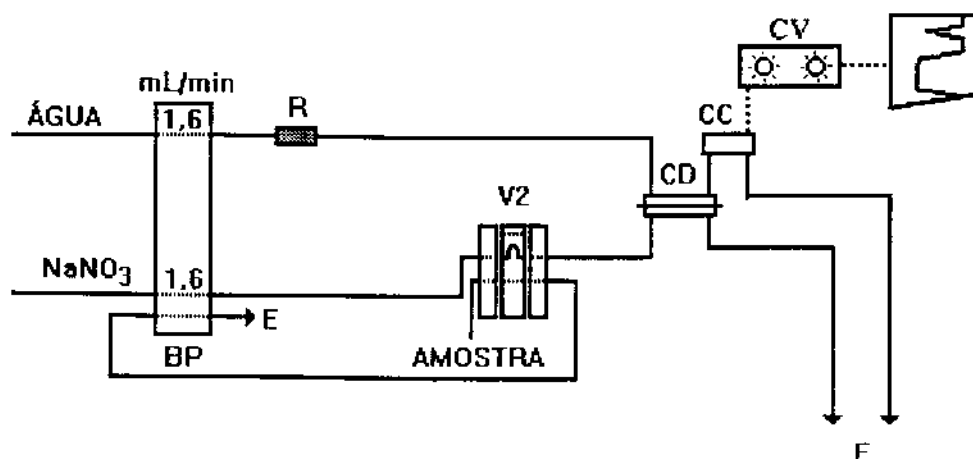


Figura III.10 Esquema de funcionamento do sistema FIA/conducométrico para a especiação das formas de carbono inorgânico.

Um ensaio foi realizado para a determinação do volume ideal de amostra para injeção. Foi utilizado um padrão de concentração 0,50 mmol/L da espécie H_2CO_3^* e o volume da amostra, na válvula V₂, foi variado de 50 a 2000 μL , alterando-se o tamanho da alça de amostragem. É importante realçar que o volume de amostra não podia ser muito reduzido, uma vez que uma fração significativa da amostra necessariamente tinha que passar pela cela de difusão sem perturbação. Uma alteração de pH da amostra poderia deslocar o equilíbrio entre as várias espécies do sistema carbonato, com consequentes danos a representatividade da medida, principalmente para a determinação da concentração da espécie H_2CO_3^* . Em grandes volumes de amostra, apenas na "cabeça" e na "cauda" da secção da amostra poderia ocorrer tal fenômeno. No caso da determinação do CO_2 -total apenas a diluição da amostra seria o problema.

A **figura III.11** mostra o sinal analítico (altura de pico) bem como a variação da frequência analítica (número de injeções de amostra por intervalo de tempo) em relação ao volume de amostra injetado. Note que o sinal analítico praticamente não sofreu alteração com volumes superiores a 1000 μL , porém a frequência analítica diminuiu de 33 para 20 amostras/hora empregando-se alças de amostragem de 1000 μL e 2000 μL , respectivamente. Em todos os trabalhos com águas naturais o volume de amostra injetado foi de 1000 μL .

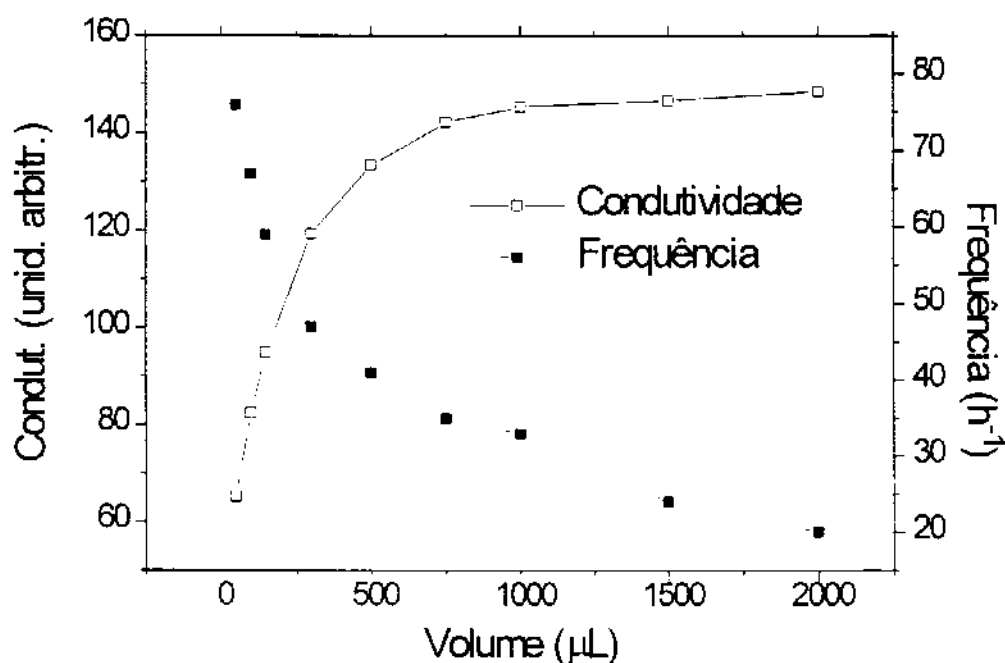


Figura III.11 Estudo do volume ideal de amostra para a espécie H_2CO_3^* .

Na **figura III.12** são apresentados os sinais de calibração com padrões de bicarbonato utilizados para a determinação de H_2CO_3^* e na **figura III.13** para determinação do $\text{CO}_2\text{-total}$, ou seja, duas curvas em diferentes faixas de concentração.

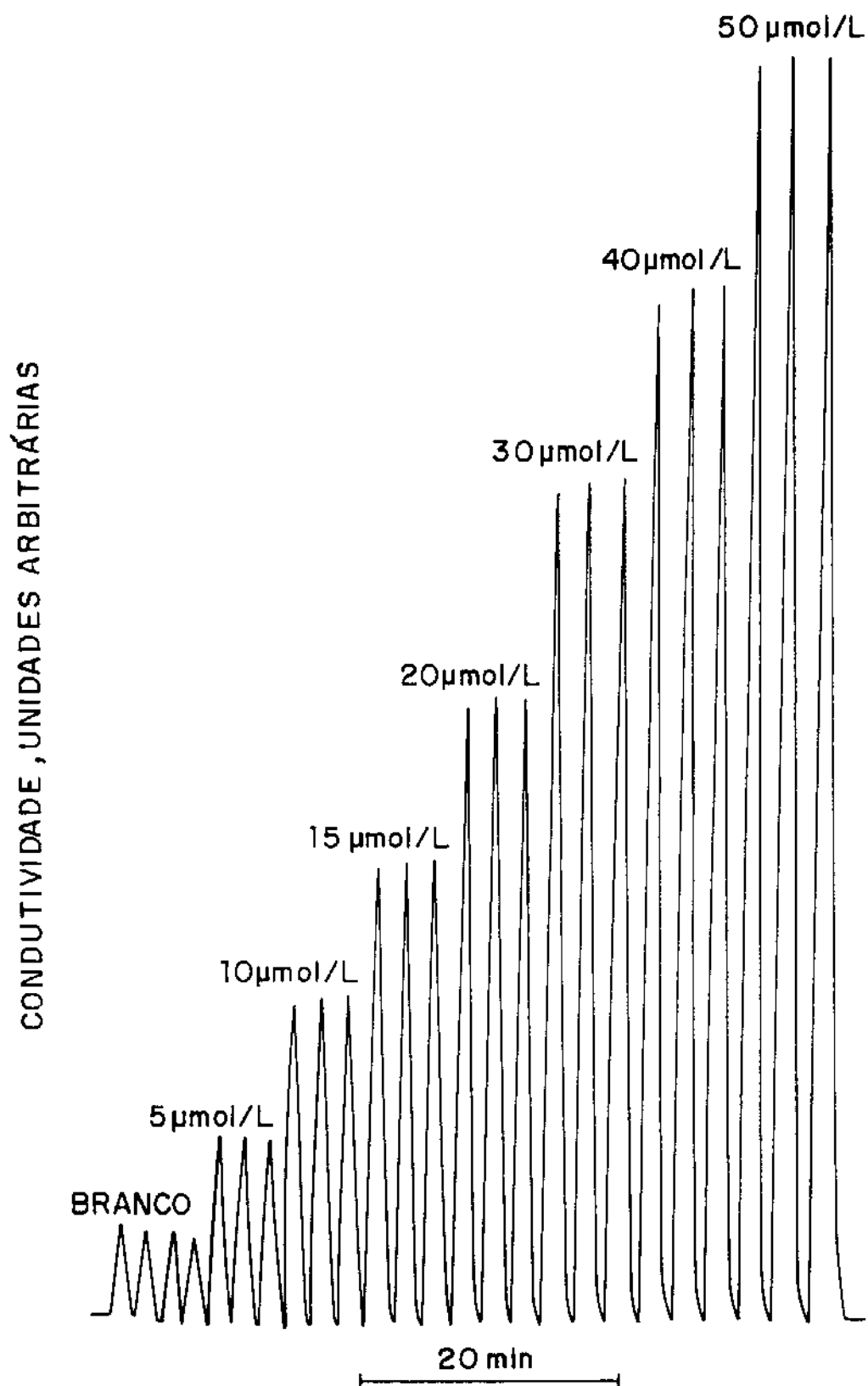


Figura III.12 Sinais típicos de calibração para determinação da espécie H_2CO_3^* .

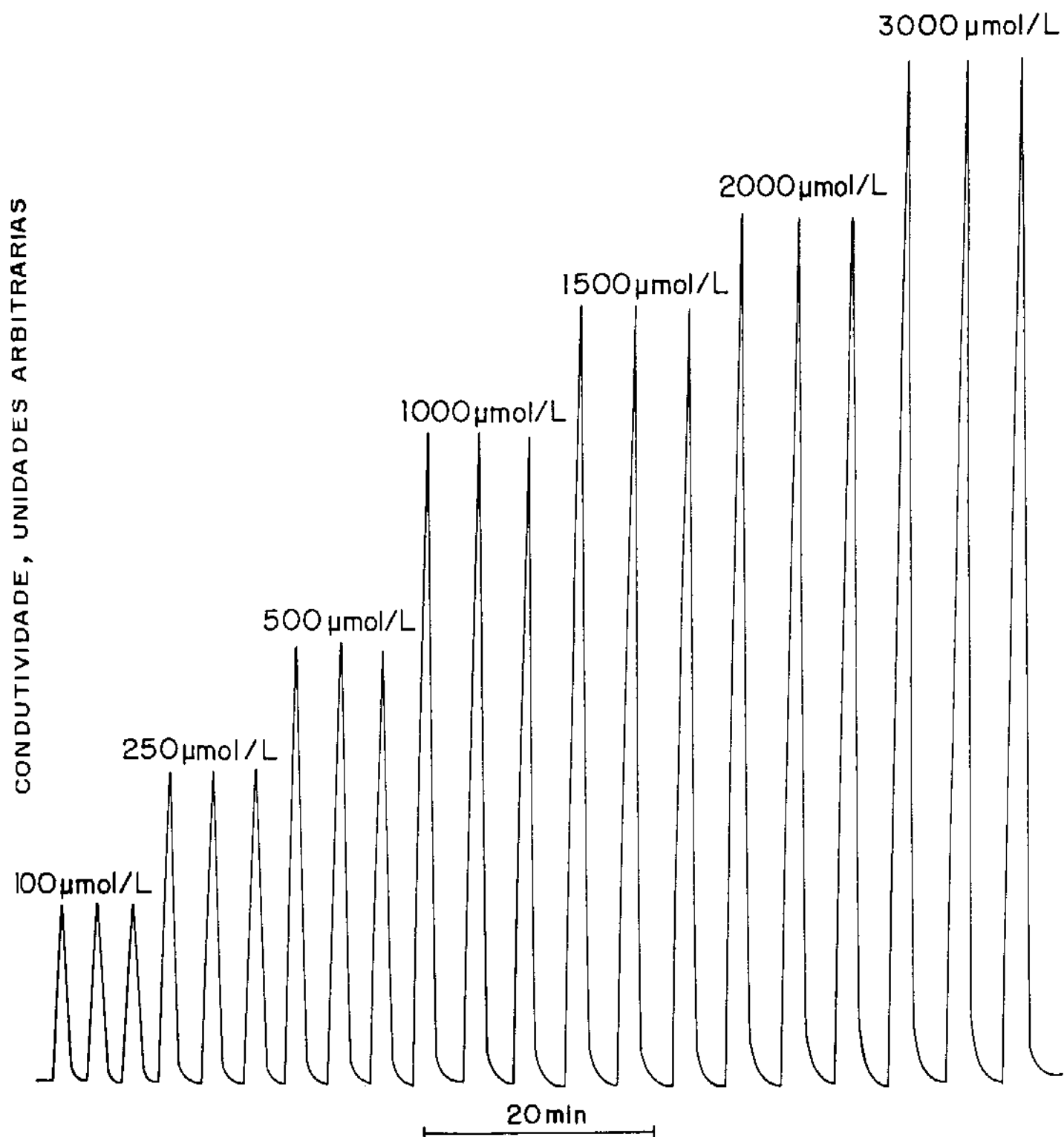


Figura III.13 Sinais típicos de calibração para determinação do CO₂-total.

Como aplicação dessa nova variação do método foram realizadas algumas determinações da concentração da espécie H_2CO_3^* e $\text{CO}_2\text{-total}$ em amostras aquosas. Para a espécie H_2CO_3^* a amostra era injetada no seu pH original, enquanto que para $\text{CO}_2\text{-total}$ o pH era ajustado para 3,50. Os resultados são apresentados na **tabela III.1**. A força iônica das amostras, dos padrões e do fluxo carregador foram ajustadas para 0,1 mol/L com nitrato de sódio (NaNO_3).

Tabela III.1 Dados experimentais usando o sistema FIA/conduutométrico.

Amostra	pH	$[\text{H}_2\text{CO}_3^*]$ (10^{-5} mol/L)	$[\text{CO}_2\text{-total}]$ (10^{-5} mol/L)
Água de lago (G)	7,71	2,08	38,30
Água de lago (H)	7,78	1,65	53,10
Água desionizada	6,16	1,60	3,68
Água de torneira	7,56	2,09	32,00
Água destilada	6,36	1,58	4,81
Água de mar	8,16	1,89	126,00
Tampão ftalato	4,01	3,20	3,78
Tampão fosfato	6,86	2,52	6,70

Nesse ensaio, as amostras foram previamente colocadas em contacto com uma atmosfera de ar (concentração de 425 ppmv em dióxido de carbono), por um período de 48 horas, para que se atingisse um equilíbrio entre as espécies carbônicas presentes nas fases aquosa e gasosa.

Como mostra a **tabela III.1** os dados experimentais foram superiores àqueles calculados teoricamente. Como colocado por Goyet e colaboradores (1992), o equilíbrio do sistema ácido carbônico é raramente alcançado, principalmente porque a concentração e a troca de CO_2 na interface ar/líquido são dependentes de fatores físicos, biológicos e químicos.

A **figura III.14** mostra uma comparação entre os valores obtidos usando o método proposto e aqueles calculados utilizando-se a **equação I.11**. Nesse caso, a concentração do dióxido de carbono atmosférico que era de 425 ppmv a concentração da espécie H_2CO_3^* calculada foi de $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

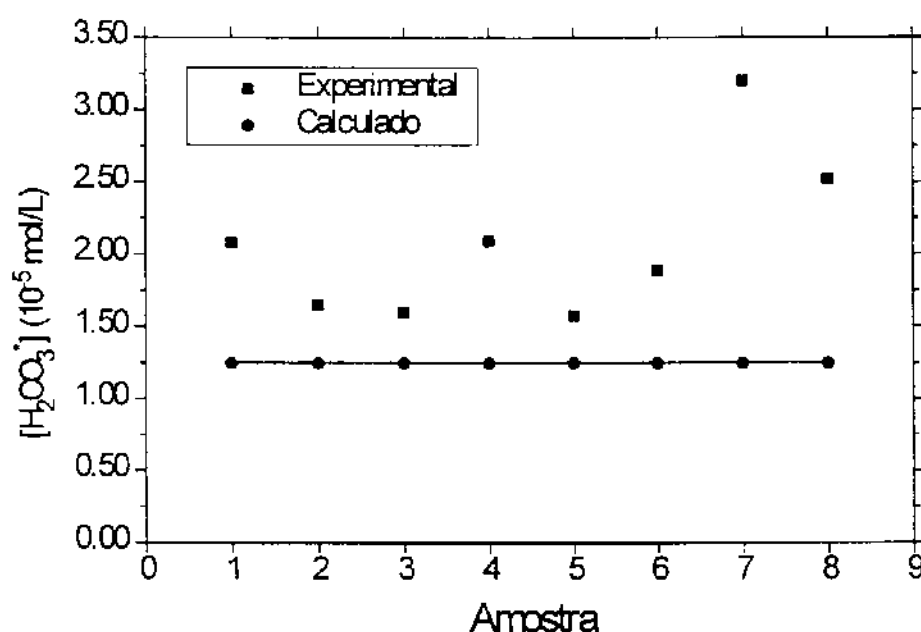


Figura III.14 Comparação entre os valores obtidos experimentalmente e através de cálculos teóricos para a espécie H_2CO_3^* , nas seguintes condições: $T = 25^\circ\text{C}$, $I = 0,1 \text{ mol/L}$ (NaNO_3) e $K_H = 10^{-1,48}$.

III.5 - Monitoramento da concentração da espécie H_2CO_3^* resultante da absorção do CO_2 gasoso.

Foi realizado um ensaio na tentativa de se estimar a taxa de absorção do dióxido de carbono gasoso por uma amostra aquosa. Para isso foi construído um sistema, como mostrado na **figura III.15**, o qual é composto de um corpo confeccionado em acrílico e uma tampa de Nylon, com uma entrada e uma saída para ar sintético e uma saída para retirada da amostra aquosa visando a determinação da concentração da espécie H_2CO_3^* .

O procedimento experimental foi o seguinte: no reator eram adicionados 350 mL de uma solução de NaNO_3 na concentração de 0,1 mol/L e colocado a tampa. O CO_2 presente nessa solução era eliminado através do bobulhamento com nitrogênio gasoso (WHITE MARTINS) livre de CO_2 . Quando a concentração da espécie de interesse (H_2CO_3^*) na fase aquosa era considerada desprezível, cerca de 1,5 horas após o início da operação, iniciava-se a passagem de ar sintético, com concentração de 622 ppmv em CO_2 (WHITE MARTINS) e numa vazão de 30 mL/min, sobre a amostra. A área superficial da fase aquosa era de aproximadamente 55 cm² e o volume da fase gasosa cerca de 50 mL. Em seguida a $[\text{H}_2\text{CO}_3^*]$ era determinada num intervalo de tempo pré-estabelecido utilizando o mesmo sistema mostrado na **figura III.10**. Padrões e carregador foram utilizados com mesma força iônica, ou seja, 0,1 mol/L em NaNO_3

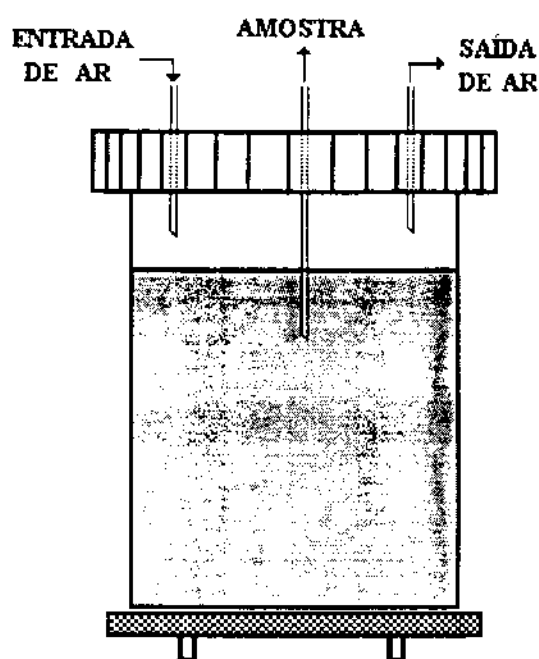


Figura III.15 Reator utilizado no monitoramento da taxa de absorção do CO_2 na amostra aquosa.

A **figura III.16** mostra os resultados obtidos durante 431 minutos (aproximadamente 7 horas) de ensaio, ou seja, desde o momento em que a amostra aquosa foi submetida à atmosfera de ar sintético, na qual a concentração em dióxido de carbono era de 622 ppmv. Como pode ser observado houve um comportamento linear entre o tempo do experimento e $[\text{H}_2\text{CO}_3^*]$, pelo menos durante esse período. Observando a tendência da curva obtida pode-se concluir que o equilíbrio entre as duas fases não foi atingido, levando-se em consideração uma solução ideal e sabendo-se que a concentração da espécie H_2CO_3^* calculada, utilizando-se a **equação I.11**, foi de $1,86 \times 10^{-5}$ mol/L. Os cálculos levaram em consideração as seguintes condições: $T = 25^\circ\text{C}$ (298 K), $P_T = 709$ mmHg, $\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 23,756$ mmHg e $K_H = 1,0 \times 10^{-1,48}$.

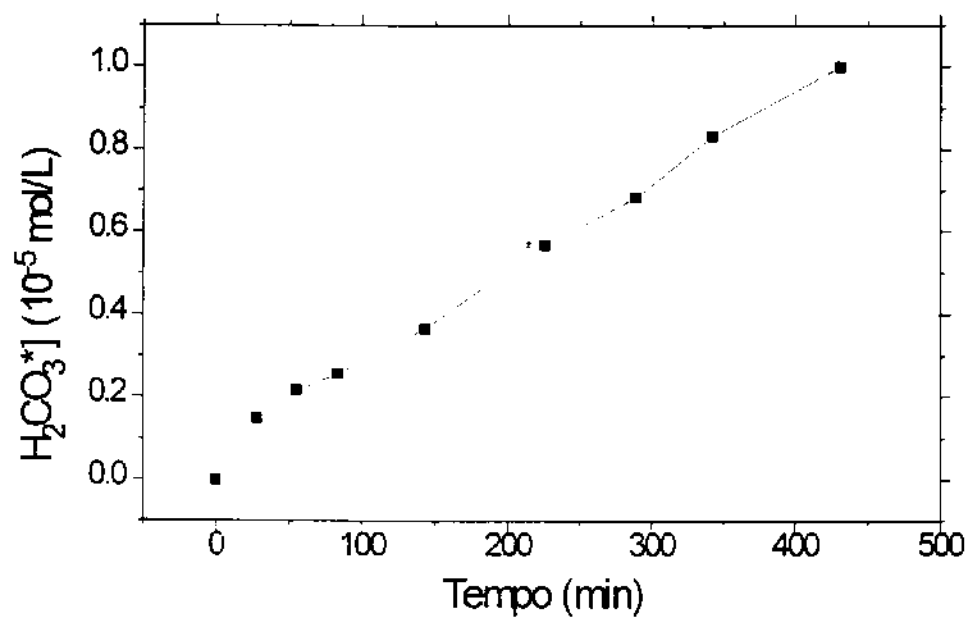


Figura III.16 Variação da concentração da espécie H_2CO_3^* em função do tempo de contato entre a fase gasosa e aquosa.

CAPÍTULO IV

DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO GASOSO PELO SISTEMA FIA/CONDUTOMÉTRICO

IV - DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO GASOSO PELO SISTEMA FIA/CONDUTOMÉTRICO:

IV.1 - Introdução.

Dentre os vários componentes gasosos presentes na atmosfera o dióxido de carbono (CO_2) ocupa um lugar de destaque, principalmente pelas evidências de que o acúmulo desse gás na atmosfera provoca sérias variações climáticas no planeta. Uma alteração no fenômeno conhecido como "efeito estufa", o qual evita grandes flutuações médias de temperatura no globo, é derivado do aumento da concentração do dióxido de carbono (CO_2) e de outros gases tais como o metano (CH_4), o óxido nitroso (N_2O), os clorofluorcarbonos (CFC), o ozônio (O_3), entre outros na atmosfera (Schwartz e outros, 1994).

O excesso do dióxido de carbono na atmosfera é fruto, principalmente, da oxidação de combustíveis fósseis (derivados de petróleo, gás natural e carvão), do desflorestamento e da agricultura intensiva, além de outras atividades antrópicas e naturais. Grande atenção tem sido dada ao monitoramento de sua concentração nos vários reservatórios da biosfera.

Como o CO_2 é de fundamental importância para a fotossíntese, o aumento desse composto na atmosfera pode provocar uma fertilização, ou seja, pode ocorrer uma alteração nos padrões de crescimento e desenvolvimento de vegetais. Alguns tipos de plantas destinadas à produção de flores tem seu tempo de colheita reduzido em até 20 % quando a concentração de CO_2 na atmosfera da estufa é mantida próxima de 600 ppmv. Evidentemente, além do dióxido de carbono outros fatores devem ser levados em consideração, como a presença de micro e macronutrientes no solo (Guimarães, 1990).

Em sistemas abertos para a atmosfera, a concentração do dióxido de carbono na fase aquosa está diretamente relacionada com a pressão parcial do gás na fase gasosa, segundo a lei de Henry. É conhecido que águas continentais com baixa força iônica podem sofrer uma grande variação no valor de pH quando a concentração de CO_2 é alterada. O excesso de dióxido de carbono livre (H_2CO_3^*) em corpos aquáticos pode propiciar a dissolução de carbonatos, além de promover corrosão em tubulações metálicas e dificultar o trabalho em estações de tratamento de águas. Por outro lado a baixa concentração dessa espécie pode favorecer a precipitação de carbonatos.

Os métodos mais utilizados no monitoramento direto do dióxido de carbono atmosférico empregam a cromatografia gasosa (CG), onde o composto é previamente separado e reduzido ao gás metano (CH_4) com posterior detecção por ionização em chama (FID) (Weiss, 1981; Weiss e colaboradores, 1982; Lixin e Huannan, 1992), e a análise do CO_2 por espectrometria, na região de infravermelho (Takahashi e outros, 1976; Frankignoulle, 1988; ver Herczeg e colaboradores, 1985).

Mais recentemente, Smith e Pacey (1993) desenvolveram um procedimento para a determinação da concentração do dióxido de carbono em fase gasosa usando a Análise por Injeção em Fluxo. A técnica é baseada na difusão do gás por uma membrana semi-permeável para um fluxo receptor, estacionado por um tempo pré-determinado, contendo um composto colorido e sensível à mudança de pH, onde o CO_2 é quantificado espectrofotometricamente.

Evidentemente, baseado nas colocações aqui apresentadas, métodos alternativos devem ser desenvolvidos para monitoramento do CO_2 atmosférico. Preferência deve ser dada a sistemas de baixo custo, fácil operação e manutenção, e que apresentem limites de detecção dentro da faixa de trabalho normalmente utilizada, ou seja, pelo menos próximo a faixa de 100 - 1000 ppmv.

IV.2 - Sistema FIA/conduutométrico utilizando injeção de volumes discretos de amostra/padrão.

Nesta terceira etapa do trabalho foi proposto um método para a determinação da concentração do dióxido de carbono gasoso, no qual foi utilizado basicamente o mesmo sistema para a determinação da concentração da espécie H_2CO_3^* e CO_2 -total (capítulo III, item III.2), porém com algumas modificações.

Uma amostra/padrão na fase gasosa é injetada diretamente num fluxo carregador, H_2O desionizada, formando uma seção gasosa, a qual atinge uma cela de difusão (CD), onde parte do CO_2 difunde-se através de uma membrana de Teflon, com posterior dissociação num fluxo receptor, H_2O desionizada, gerando principalmente as espécies $\text{H}^+(\text{aq})$ e $\text{HCO}_3^-(\text{aq})$. A condutividade desse fluxo é constantemente monitorada numa cela de condutividade (CC). A alteração da magnitude desse parâmetro é proporcional a concentração da espécie a ser estudada presente na amostra ou no padrão. O sistema FIA para a determinação do dióxido de carbono gasoso é mostrado na figura IV.1.

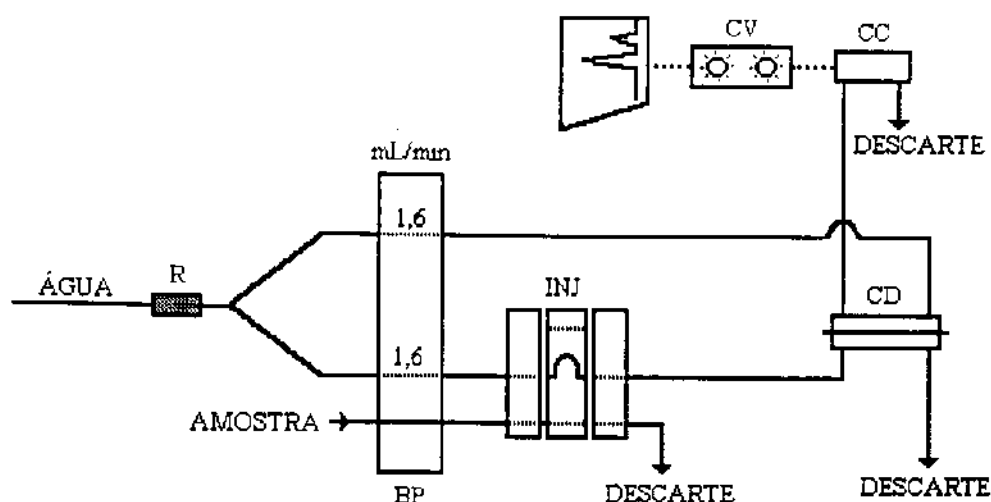


Figura IV.1 Sistema FIA para a determinação de CO_2 gasoso.

Este sistema é constituído dos seguintes elementos básicos: BP é a bomba peristáltica, INJ é o injetor-comutador, CD é a cela de difusão, CC a cela de condutividade, CV o condutivímetro, e R é uma coluna de resina mista de troca iônica.

IV.2.1 - Otimização dos principais parâmetros.

Nos testes preliminares de funcionamento do sistema para a fase gasosa foi observado que os dois fluxos (carregador e receptor) na cela de difusão (CD) tinham que ter direções opostas para uma melhor estabilização do sistema. Uma outra observação de fundamental importância é que o fluxo onde a amostra é injetada deve passar pelo lado da cela de difusão de menor profundidade para que parte da amostra (gás) não permeie pela membrana na forma de bolhas com consequente desestabilização do sinal. Provavelmente esse fato deve-se à diferença de pressão entre os dois lados da membrana. Isso é resultado do fato de que os dois sulcos na cela de difusão normalmente não possuem exatamente a mesma profundidade e largura, gerando uma diferença na velocidade linear dos fluidos. Com a observação de bolhas no fluido receptor, ou mesmo a desestabilização do sinal, promove-se a mudança dos fluxos na cela de difusão, ou seja, o fluxo dito doador deve passar pelo lado da cela de difusão de maior velocidade linear.

Para viabilização do método foram estudados vários parâmetros, tais como a vazão dos reagentes, o volume da amostra, a distância entre injetor e cela de difusão, a distância entre cela de difusão e cela de condutividade, os quais são mostrados na **figura IV.1**. Além disso, foram avaliados o efeito da temperatura, o limite de detecção e a frequência analítica.

Primeiramente foi realizado um estudo da vazão dos reagentes (H₂O desionizada) onde foram analisados a altura do pico (condutividade), bem como o

tempo de residência da amostra no sistema em função da vazão (mL/min). A velocidade de registro foi aumentada para se observar melhor a forma do fiograma obtido. A **figura IV.2** mostra esses resultados. É importante realçar que abaixo de 0,90 mL/min o sinal analítico apresentava-se levemente deformado, ou seja um pequeno ombro. Acima de 1,6 mL/min esse comportamento era mais acentuado, provocando perda na reprodutibilidade dos sinais analíticos.

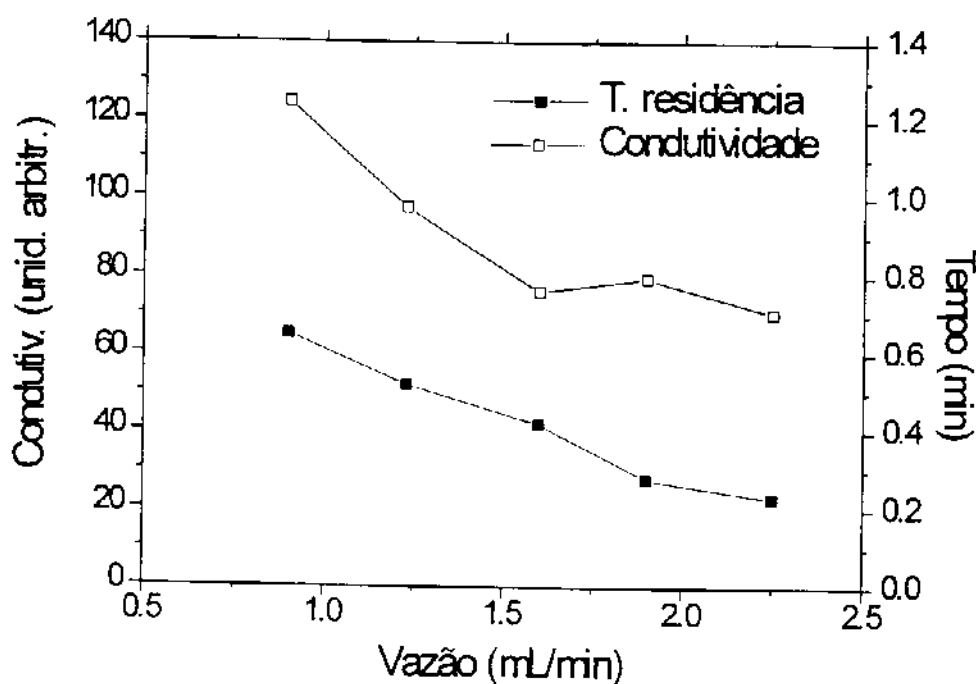


Figura IV.2 Resposta do sinal analítico em função da vazão de reagentes.

Foram realizados ensaios variando-se o volume de amostra injetado, para um estudo do sinal analítico e do tempo de residência da amostra (T), o qual é definido como sendo o intervalo de tempo entre a injeção da amostra até o valor máximo de pico. Esse comportamento é mostrado na **figura IV.3**.

Variações no volume injetado eram obtidos alterando-se o comprimento da alça de amostragem, a qual era feita utilizando-se um tubo de

Teflon com 1 mm de diâmetro interno. Não foi possível a utilização de tubos de polietileno devido à presença de gotas de água aderidas em sua superfície interna, oriundas do fluxo carregador, quando a mesma era preenchida com a amostra gasosa. Esse fenômeno com certeza alterava o volume ensaiado, o que não acontecia quando se utilizava o Teflon, que é um polímero hidrofóbico.

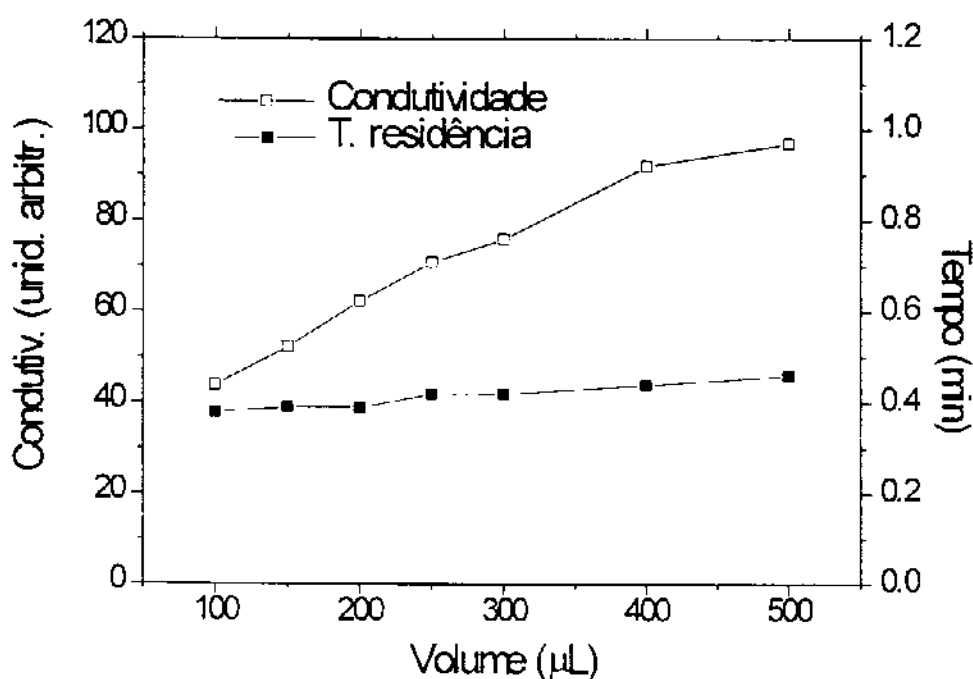


Figura IV.3 Resposta do sinal analítico em função da variação no volume de amostra injetado.

Apesar do tempo de residência não variar significativamente com o aumento do volume da amostra, observou-se um aumento na altura de pico (sinal analítico). Porém, para volumes superiores a 350 μL , ocorreu uma distorção no sinal, apresentando uma formação de picos duplos e não reproduzíveis. Volumes de amostras superiores a 350 μL foram descartados em trabalhos posteriores.

Como a velocidade e o grau de permeação de um gás por uma membrana, bem como a condutividade são dependentes da temperatura, foi feito um estudo no qual era injetado um padrão em diferentes temperaturas. O que se observou foi um crescente aumento na condutividade (e consequentemente no sinal analítico) com o aumento da temperatura. Essa variação é mostrada na **figura IV.4**.

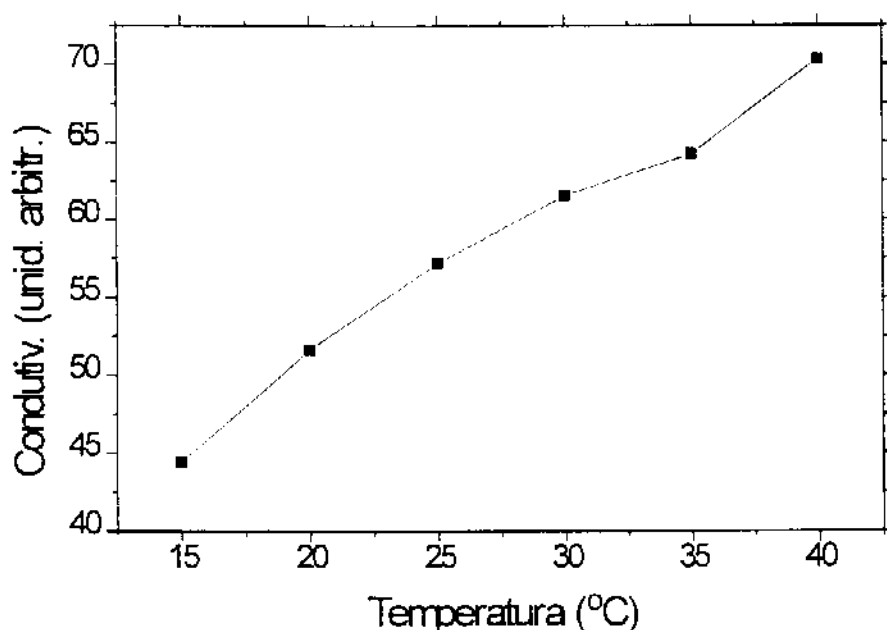


Figura IV.4 Resposta do sinal analítico em função da variação de temperatura.

Apesar de se ter encontrado uma ampla faixa de trabalho, a temperatura escolhida nos ensaios foi próxima à ambiente, onde os sinais analíticos eram de boa qualidade. Além disso, fora do intervalo normal de temperatura ambiente pode-se encontrar problemas operacionais, como por exemplo a utilização de banhos termostatizados para preparação dos padrões e amostras, como para as correntes de água desionizada, carregador e receptor.

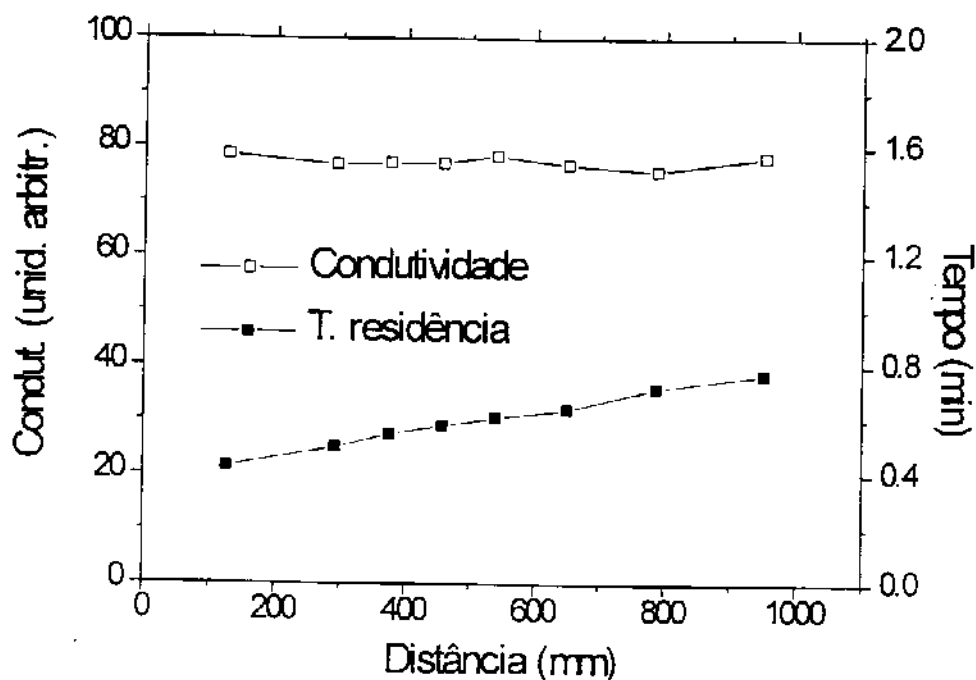


Figura IV.5 Resposta do sinal analítico em função da variação da distância entre o injetor-comutador e a cela de difusão (INJ-CD).

Quando uma amostra ou padrão gasoso é inserido no fluxo carregador pode ocorrer a difusão de uma parte do dióxido de carbono da fase gasosa para a fase líquida tanto na "cabeça" como na "cauda" da seção gasosa durante o percurso compreendido entre a injeção e a cela de difusão, com consequente queda na magnitude do sinal analítico. Com o objetivo de um estudo da perda do analito (dióxido de carbono) presente na amostra gasosa para o fluxo carregador (H_2O desionizada), foi realizada uma série de ensaios variando-se a distância entre o injetor-comutador (INJ) e a cela de difusão (CD). A **figura IV.5** mostra que o sinal analítico não sofreu variação significativa, ou seja, a altura do sinal praticamente não foi alterada. Entretanto, houve um crescente aumento no tempo de residência da amostra, basicamente pelo incremento na distância percorrida pelo analito no

sistema. Isso significa que a distância INJ-CD deve ser a mínima possível para uma maior frequência analítica.

A **figura IV.6** mostra o comportamento do sinal analítico quando variou-se a distância entre a cela de difusão (CD) e a cela de condutividade (CC). O estudo desse parâmetro foi feito para uma avaliação de cinética de hidratação do dióxido de carbono permeado, bem como da ionização do composto formado no fluxo receptor.

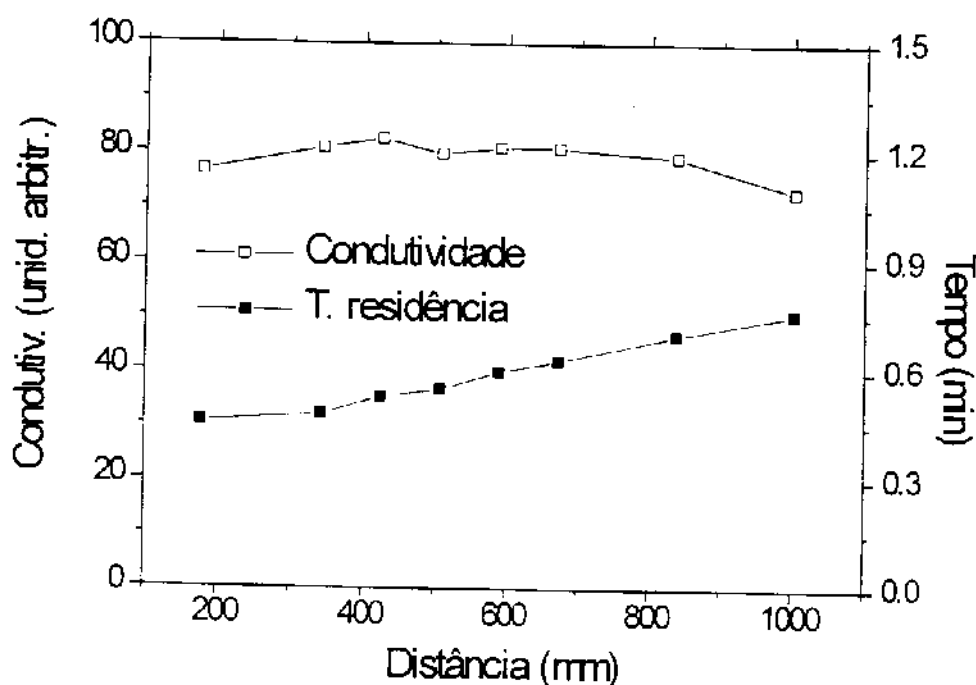


Figura IV.6 Resposta do sinal analítico em função da variação da distância entre a cela de difusão e a cela de condutividade (CD-CC).

A combinação dessas duas etapas, aliada ao grau de dispersão, no fluxo receptor, principalmente das espécies $H^+(aq)$ e $HCO_3^-(aq)$, são as responsáveis pelas características do sinal analítico. Apesar da altura do pico não variar significativamente com o aumento da distância CD-CC foi observado uma pequena distorção no máximo do pico em distâncias inferiores a 590 mm. Cabe

salientar que ocorreu um aumento no tempo de residência com o aumento da distância CD-CC, diminuindo dessa forma a frequência analítica.

Na **figura IV.7** são mostrados os sinais típicos para uma curva de calibração entre 98 e 590 ppmv. Os padrões gasosos foram feitos a partir do gás puro, através de diluições em nitrogênio gasoso previamente descontaminado de dióxido de carbono. As três últimas séries de sinais são referentes à amostras de concentração desconhecida. Para esses sinais foram utilizados os parâmetros já otimizados. O volume de amostra de 300 μL , a distância entre o injetor-comutador e a cela de difusão (INJ-CD) foi de 127 mm (77 μL), a distância entre a cela de difusão e cela de condutividade (CD-CC) foi de 590 mm (350 μL), a temperatura foi próximo à ambiente (25°C), o limite de detecção foi de 50 ppmv, a frequência analítica foi de 40 amostras/hora e o desvio padrão relativo foi de 0,97 % ($n = 20$).

Também nesse caso a equação que melhor descreve a curva de calibração é do tipo: $Y = A \cdot X^B$, onde Y é a altura do sinal analítico (pico), X é a concentração do CO_2 gasoso, A e B são parâmetros ajustáveis. Os coeficientes de correlação das várias curvas foram 0,999 ou melhores.

IV.2.2 - Estudo de interferentes.

Foi realizado um teste de interferência para o sistema FIA/conduutométrico na fase gasosa.

Um Erlenmeyer de 250 mL, com ar atmosférico contendo CO_2 na concentração de aproximadamente 400 ppmv e o vapor da substância a ser estudada foi selado com um septo de borracha. O procedimento experimental era o seguinte: primeiramente 1 mL do ar contido no frasco era retirado e em seguida o mesmo

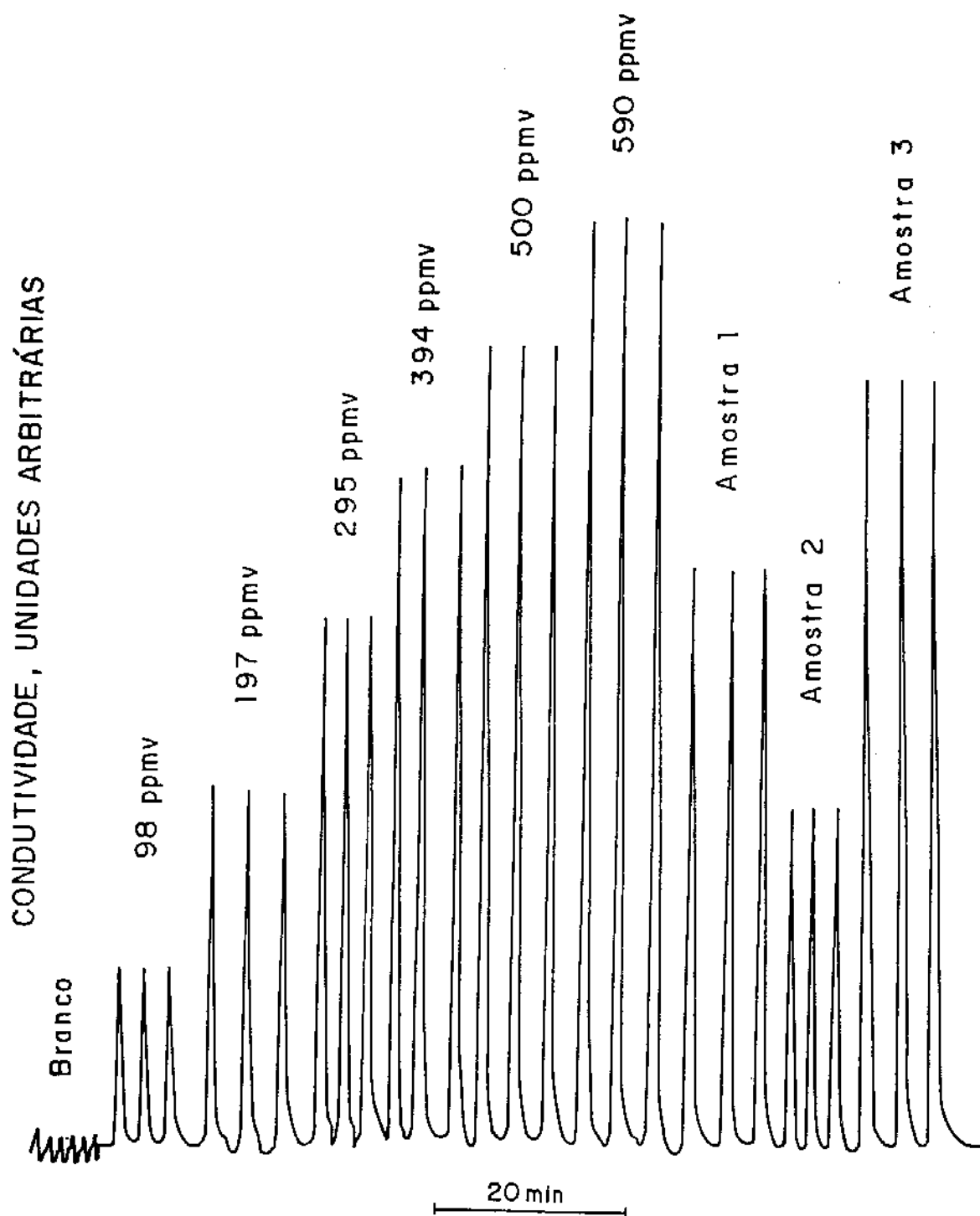


Figura IV.7 Sinais de calibração para triplicata de soluções gasosas de dióxido de carbono, para um intervalo de concentração entre 98 e 590 ppmv e amostras com concentrações desconhecidas.

volume da substância a ser ensaiada era adicionado. A solução gasosa era homogeneizada através de movimentos de inversão do frasco, o qual continha em seu interior uma lâmina fina de papel. Uma amostra de 1 mL era retirada e injetada no sistema FIA e o valor da concentração encontrado era comparado com aquele inicialmente obtido na ausência do composto potencialmente interferente. Essa sequência de operação era repetida várias vezes.

Nessa etapa do trabalho foram estudados três substâncias, no estado de vapor: o ácido fórmico (Quimis, 99 %, 1,220 g/mL), o ácido acético (BDH Chemical Ltda, $99,9 \pm 0,1$ %, 1,048 - 1,049 g/mL) e o ácido nítrico (VETEC, 65 % PA, 1,40 g/mL). Nas figuras IV.8, IV.9 e IV.10 são mostrados tais comportamentos obtidos nestes ensaios.

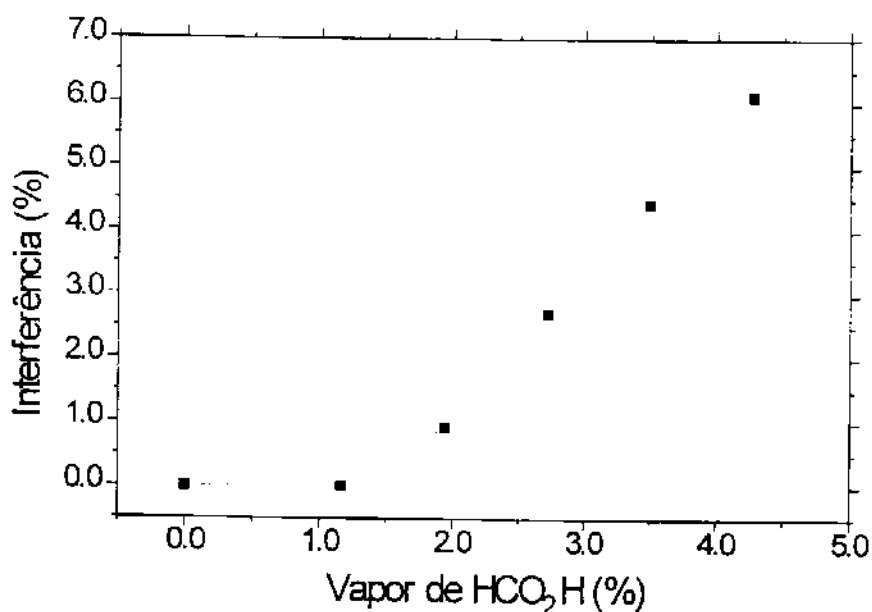


Figura IV.8 Interferência do ácido fórmico (HCO₂H) no sinal analítico obtido para uma amostra contendo 400 ppmv de dióxido de carbono gasoso.

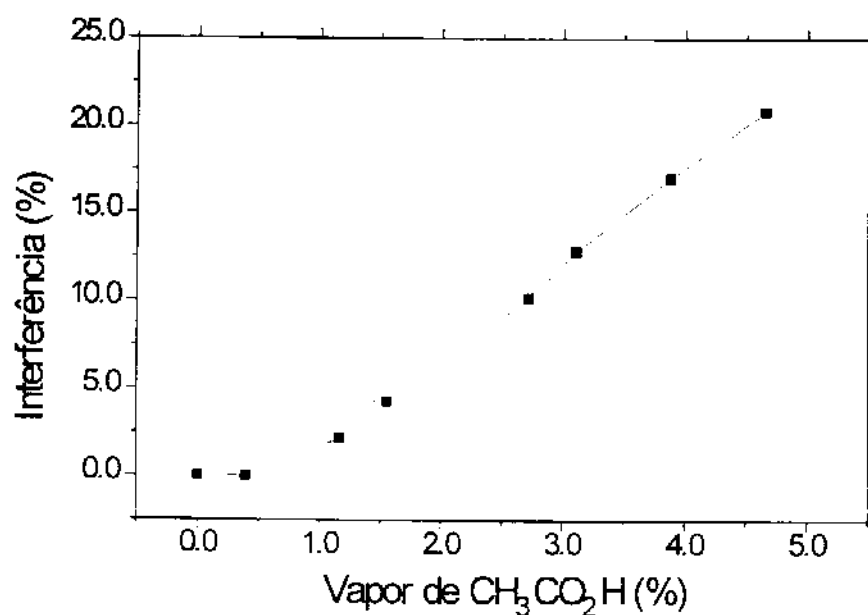


Figura IV.9 Interferência do ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) no sinal analítico obtido para uma amostra contendo 400 ppmv de dióxido de carbono gasoso.

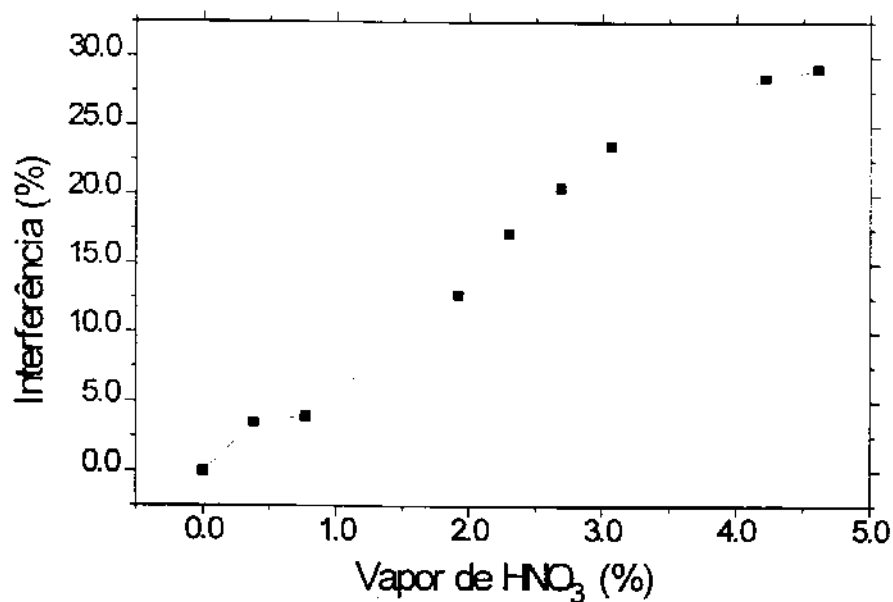


Figura IV.10 Interferência do ácido nítrico (HNO_3) no sinal analítico obtido para uma amostra contendo 400 ppmv de dióxido de carbono gasoso.

É importante salientar que esses testes de interferência foram realizados com o vapor coletado diretamente no frasco que continha os ácidos. Os valores colocados nos gráficos correspondem à concentração dos compostos já considerando as devidas diluições. Todos os testes foram realizados a 23 °C.

Por problemas operacionais inerentes aos próprios métodos não foi possível a quantificação dos compostos diretamente na fase gasosa, ou seja, a concentração real de cada um dos possíveis interferentes. Recentemente, Andrade e colaboradores (1995) descreveram um procedimento para a determinação de vapor de ácido nítrico na atmosfera, mostrando claramente que não é um trabalho trivial. Esses pesquisadores encontraram valores menores que 0,10 até 2,32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, dependendo do sítio monitorado. Também comentam que normalmente a concentração de vapores de ácido nítrico na atmosfera se situa na faixa de 0,1-10 ppbv. A faixa de concentração ensaiada no presente trabalho com certeza está situada num nível bem superior, indicando, então que a interferência é pouco significativa frente à concentração de dióxido de carbono encontrada na atmosfera.

IV.3 - Aplicação do método: Teste de toxicidade aguda frente à bactéria *Escherichia coli*.

IV.3.1 - Ensaio com íons Hg(II).

Como aplicação do método foi realizado um teste de toxicidade aguda utilizando-se *Escherichia coli* como organismo teste e os íons Hg(II) (HgCl_2 MERCK) como agente estressante. A taxa de respiração bacteriana foi determinada por monitoramento da fase gasosa à partir da fração de dióxido de carbono proveniente da fase líquida (meio de cultura). Esse ensaio é semelhante àquele realizado para combustíveis automotivos, apresentado no **capítulo II**, inclusive o

mesmo meio de cultura (Doward e Barisas, 1984). A diferença básica é que naquele caso a determinação do dióxido de carbono era feita na fase aquosa.

O procedimento experimental utilizado nesse ensaio foi o seguinte: em Erlenmeyers de 250 mL foram adicionados 100 mL de suspensão bacteriana (meio de cultura contaminado com *Escherichia coli*) e o agente estressante em diferentes concentrações e selados com septos de borracha. Em seguida, amostras eram retiradas em tempos pré-estabelecidos e o teor de dióxido de carbono era determinado. O frasco que não recebeu nenhum Hg(II) funcionou como controle. O ensaio foi realizado a 36 °C (Banho Maria FANEM Ltda, Modelo 100) e sem agitação. Na **figura IV.11** são mostradas as curvas características do crescimento bacteriano.

Note que as curvas de crescimento apresentadas na **figura IV.11** mostram claramente que ocorre uma inibição na respiração bacteriana em todas as concentrações ensaiadas. Basicamente essa diferenciação entre o controle e os meios de cultura contaminados com o agente estressante foi detectada após 20 minutos de ensaio.

Ocorreu um aumento no tempo de duplicação (t_D) da cultura bacteriana de aproximadamente 1,9; 2,6 e 3,1 vezes para as suspensões microbianas contaminadas com 12,5; 25 e 50 µg/L, respectivamente, quando comparadas com o controle. Portanto, fica claro que o procedimento descrito mostra-se como uma alternativa viável para testes de toxicidade aguda.

Além disso, é importante salientar que os teores dos íons metálicos correspondem à concentração total e não apenas à fração de íons livres em solução, a qual está diretamente relacionada com a toxicidade. Essa especiação não pode ser realizada por problemas inerentes à própria determinação do metal.

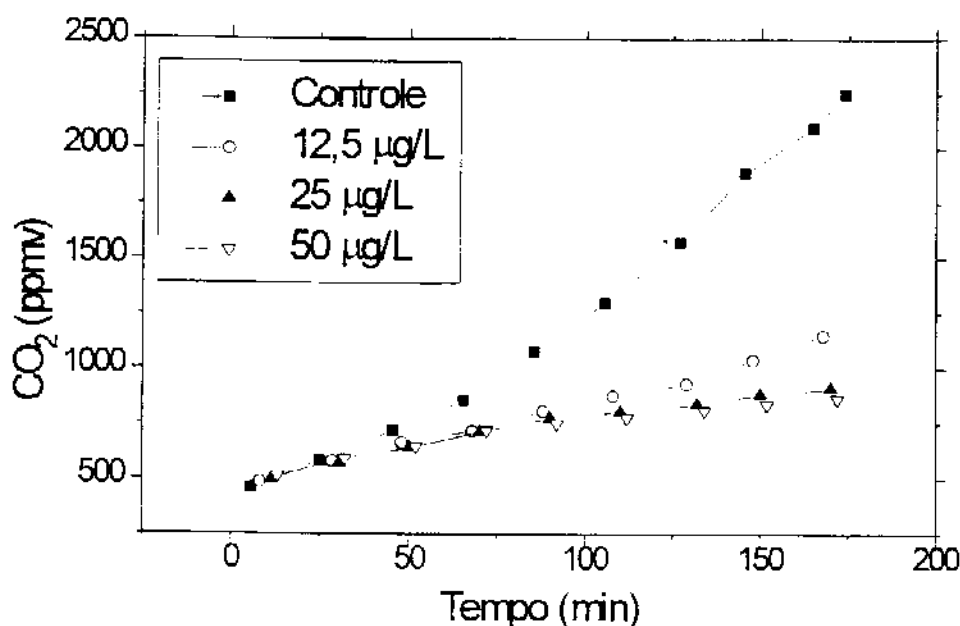


Figura IV.11 Atividade microbiana frente aos íons Hg(II).

IV.3.2 - Variação no tempo de duplicação (t_D) microbiano sob forte agitação.

Uma outra variação no procedimento foi realizada com o objetivo de se obter curvas de crescimento bacteriano mais regulares. O bioensaio foi conduzido utilizando-se apenas a suspensão bacteriana em duplicata e sem a presença de agentes potencialmente tóxicos, ou seja, apenas o frasco controle. No entanto, antes da amostragem para a determinação da concentração do dióxido de carbono a suspensão bacteriana era agitada magneticamente por um período de 90 segundos, diferentemente do caso anterior onde a cultura bacteriana era mantida em repouso e o tempo de duplicação calculado foi próximo à 74 minutos. Essa agitação era feita até a formação de um vórtice na solução com o intuito de se alcançar um melhor equilíbrio entre a fase líquida e gasosa. O tempo de duplicação calculado foi

de aproximadamente 33 minutos em ambas as soluções, com uma diferença próximo a 1,5 %. Essa curvas são mostradas na **figura IV.12**.

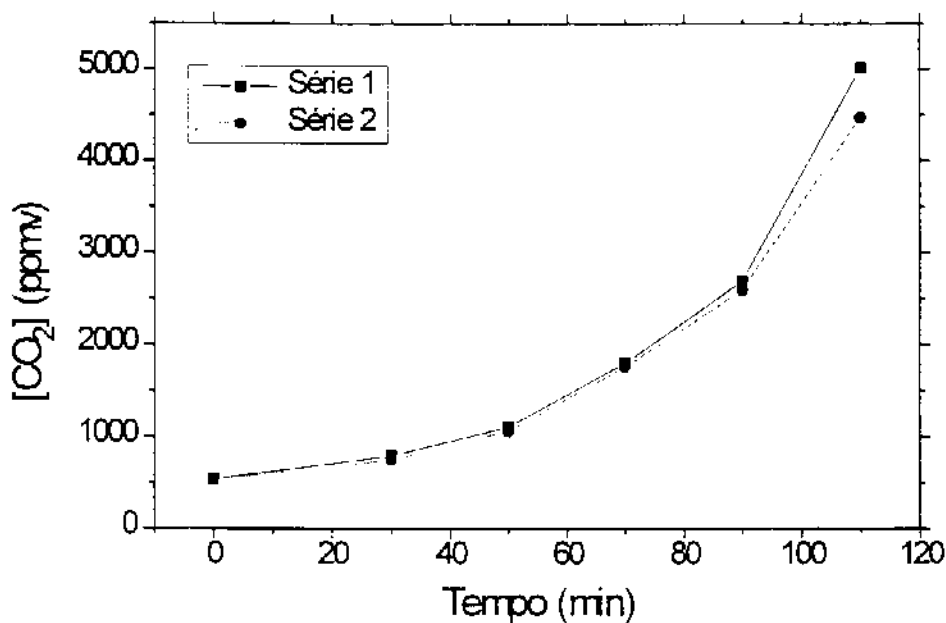


figura IV.12 Curvas características da atividade microbiana.

Para efeito de comparação pode-se observar que o tempo de duplicação da população microbiana, na suspensão de controle, foi de 26 minutos quando o monitoramento foi realizado na aquosa, utilizando-se a mesma cepa padrão de bactéria (ATCC 25922) e o mesmo meio de cultura. Esses dados estão apresentados no **capítulo II**.

IV.3.3 - Ensaio com desinfetante.

Um ensaio foi realizado com um desinfetante de uso doméstico, conhecido comercialmente como Pinho Sol (orto-benzil para-cloro fenol 0,45 %,

Colgate-Palmolive Ltda), utilizando-se o mesmo princípio descrito para os íons Hg(II). Neste caso, em Erlenmeyers de 250 mL (previamente calibrados) foram adicionados 200 mL do meio de cultura (mínimo) e o agente potencialmente inibidor do crescimento microbiano, em concentrações desejadas, e selado com septos de borracha. Os frascos foram colocados num agitador e mantidos à 37 °C através de um banho de água (Banho Maria FANEM Ltda, Dobnoff, Modelo 145, com agitador metabólico). As amostras gasosas eram retiradas com seringas descartáveis de 1 mL ("IBRAS-CBO" Indústrias cirúrgicas e ópticas S.A.) de 15 em 15 min para análise quanto à concentração do CO₂ gasoso. O Erlenmeyer que não recebeu nenhum contaminante funcionou como controle.

O meio de cultura (**meio mínimo líquido**) foi preparado de acordo com Gimenes (1994). Este meio é recomendado para crescimento de *E. coli* (Stainer, 1969). A sua composição é a seguinte: 7,0 g de K₂HPO₄; 3,0 g de KH₂PO₄; 1,0 g de (NH₄)₂SO₄; 0,1 g de MgSO₄.7H₂O e 0,5 g de citrato de sódio. Estes reagentes eram adicionados à aproximadamente 900 mL de água destilada. O pH era ajustado para 7,20 com solução de KOH (MERCK). A solução era então fervida em um forno de microondas e após o resfriamento até aproximadamente 70°C, eram adicionados cerca de 200 mL de uma solução previamente fervida contendo 20 g de glucose.

Na **figura IV.13** são mostradas as curvas características de crescimento microbiano para diferentes concentrações da solução em estudos. Note que o efeito inibidor já é observado em 20 minutos de ensaio. Os tempos de duplicação da população microbiana foi calculado em 50,5; 79,1 e 244,5 minutos para o controle; 0,4 e 1,0 %, respectivamente. Para a concentração de 2 % houve uma inibição total de crescimento, pelo menos no decorrer do bioensaio, ou seja, 105 minutos.

É importante evidenciar que a substância ativa presente no desinfetante para as concentrações totais de 0,4; 1,0 e 2,0 % correspondem a 1,8; 4,5 e 9,0 ‰ respectivamente.

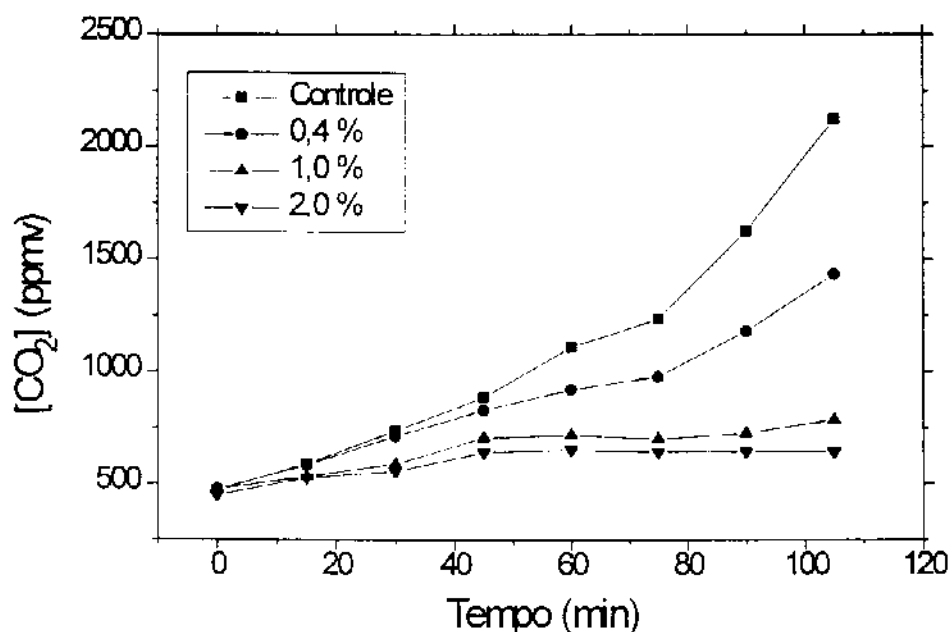


Figura IV.13 Comportamento microbiano (*E. coli*) frente à várias concentrações do desinfetante Pinho Sol. Monitoramento na fase gasosa.

IV.4 - Sistema FIA/conducométrico para monitoramento contínuo do CO₂ atmosférico.

IV.4.1 - Estudo da fração gasosa permeada pela membrana.

Uma nova variação do sistema FIA/conducométrico para a determinação do dióxido de carbono gasoso foi proposto. Neste caso a análise era baseada na detecção da espécie num sistema trabalhando em **estado estacionário**, em contraste com o procedimento anterior (item IV.1) onde a análise era feita com

base na injeção de volumes discretos da amostra/padrão e análise de sinais transientes.

No presente caso, a montagem do sistema FIA é praticamente a mesma utilizada no caso anterior (**figura IV.1**). Entretanto aqui a amostra é passada continuamente pela cela de difusão. Deste modo, a curva de calibração apresenta-se na forma de escada, onde cada patamar corresponde a um valor de concentração de dióxido de carbono.

O procedimento proposto foi o seguinte: num Erlenmeyer, previamente calibrado, eram adicionados aproximadamente 100 mL da amostra aquosa e selado com um septo de borracha, sendo que esta continha uma entrada e uma saída da amostra gasosa para o sistema FIA. Primeiramente, a fase gasosa era saturada com ar sintético até uma concentração desejada em CO₂. O volume da fase gasosa era de aproximadamente 158 mL e a área superficial da lâmina de água próximo a 38,5 cm². Este reator é apresentado na **figura IV.14**.

Uma fração do dióxido de carbono que passa pela cela de difusão e permeia pela membrana, chegando ao fluxo receptor, a qual é quantificada, evidentemente não retorna ao frasco. Nesse sentido foi realizado um experimento para avaliar se a concentração do gás era significativamente alterada (certamente diminuída) por esse fenômeno.

Para esse estudo, no sistema de absorção de gás proposto, foi adicionada uma solução de ácido sulfúrico diluído, pH próximo a 2. A fase gasosa foi saturada com CO₂ até uma concentração próxima 500 ppmv em CO₂ e submetida a uma forte agitação para alcançar o equilíbrio entre as duas fases. É importante salientar que nesta condição de baixo pH a absorção do dióxido de carbono pela fase aquosa é desprezível frente a concentração inicial do gás.

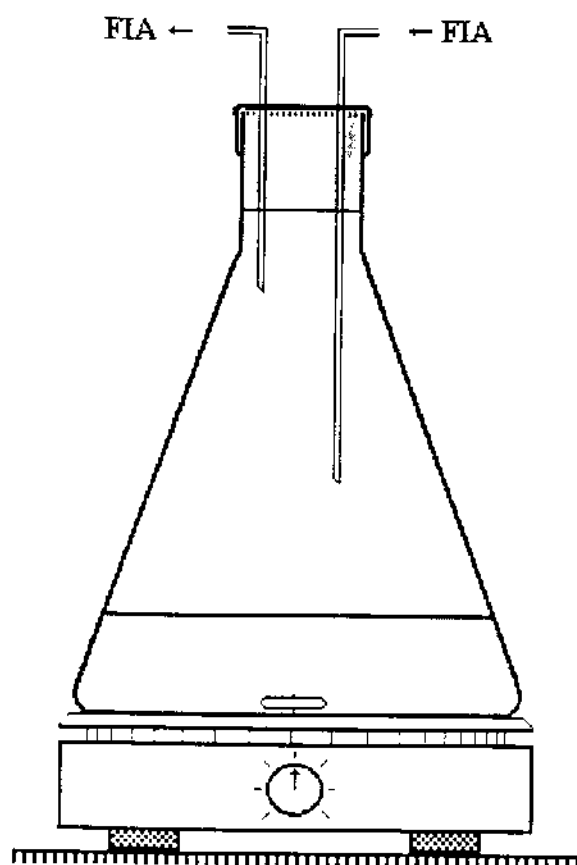


Figura IV.14 Reator utilizado para monitoramento contínuo do dióxido de carbono gasoso.

A **figura IV.15** mostra que a perda de CO_2 pela difusão na membrana após 250 minutos de experimento ficou próxima à 7 %, comparando-se as concentrações inicial e final do gás no reator. Este erro pode ser diminuído se for utilizado um frasco de maior volume. Além disso, se o ensaio for realizado em sistema aberto, onde o volume da amostra é muito grande, a sua perda por difusão será desprezível e o erro devido a esse fenômeno praticamente não existirá.

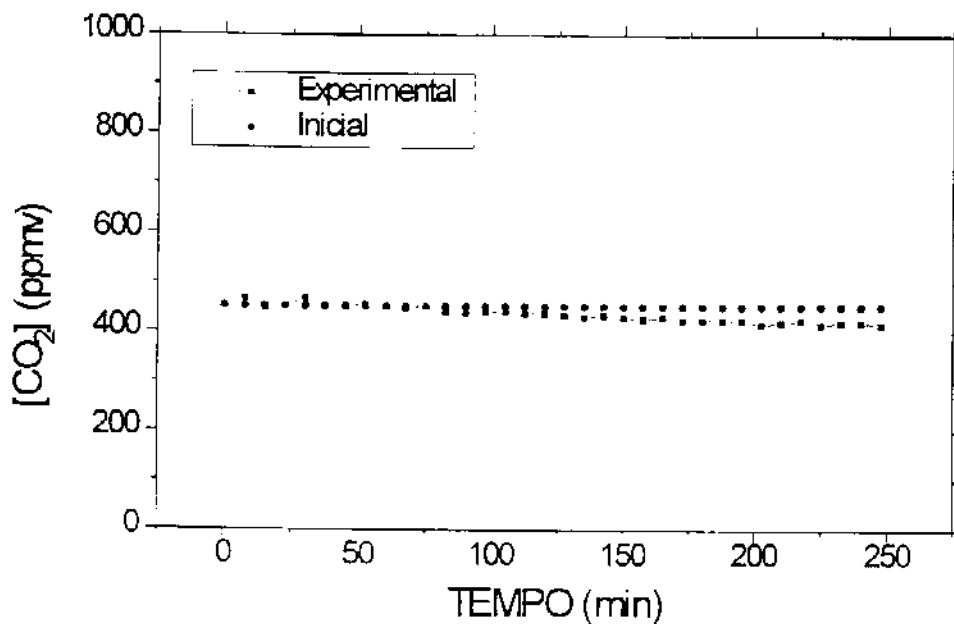


Figura IV.15 Perda do analito por difusão na membrana.

IV.4.2 - Estudo da troca de dióxido de carbono na interface gás-líquido para uma amostra de água natural.

Como aplicação do método foram feitos ensaios de absorção de CO_2 gasoso por uma amostra de água proveniente de lago altamente eutrofizado (Lago do Relógio-UNICAMP). As amostras foram retiradas da camada superficial da coluna d'água.

Neste ensaio foi avaliada a velocidade de absorção do CO_2 gasoso pela fase aquosa. O procedimento proposto foi semelhante àquele realizado no caso anterior (item IV.4.1). Entretanto, foi utilizada uma amostra de água natural cuja fase gasosa também era saturada com ar sintético até aproximadamente 500 ppmv em CO_2 .

A amostra gasosa era passada continuamente pela cela de difusão do sistema FIA e retornada para o frasco de absorção (**figura IV.14**). A concentração do dióxido de carbono na fase gasosa foi então monitorada durante pelo menos quatro horas após o início do ensaio. A **figura IV.16** mostra a forma de registro do monitoramento de absorção de CO₂ gasoso seguido de sinais típicos de uma curva de calibração.

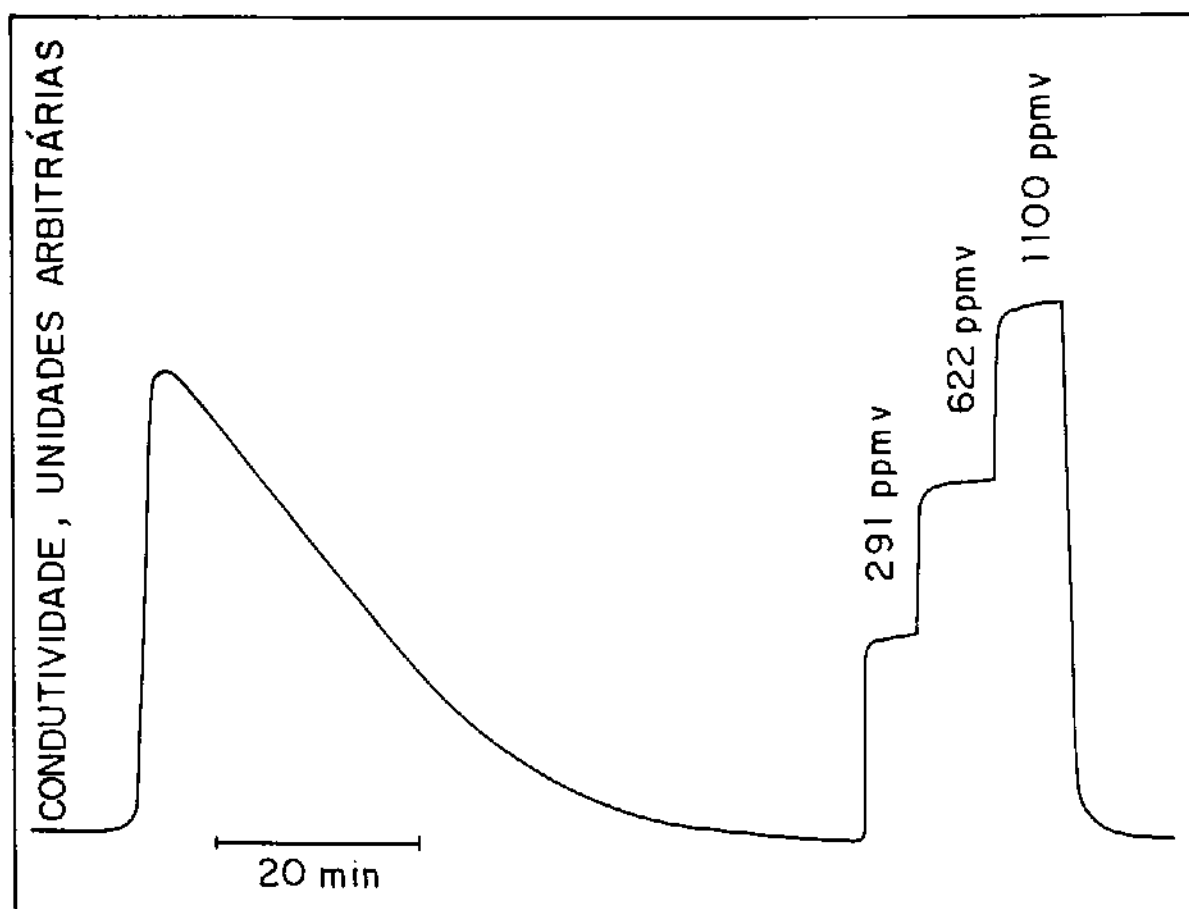


Figura IV.16 Sinais de calibração típicos do sistema FIA para monitoramento do CO₂ atmosférico.

O experimento foi repetido em diferentes condições: a solução aquosa em repouso, sob leve agitação e forte agitação (formação de vórtice). Os resultados

obtidos encontram-se na **figura IV.17**, onde é mostrada a variação da concentração do dióxido de carbono gasoso em função do tempo de ensaio. O pH inicial da solução aquosa era de 10,28, enquanto que o pH final foi de 10,00. Normalmente são esperados valores altos de pH para águas provenientes de corpos altamente eutrofizados. Isso é fruto da atividade fotossintética de algas, que absorvem o dióxido de carbono dissolvido, o qual confere um caráter ácido às águas.

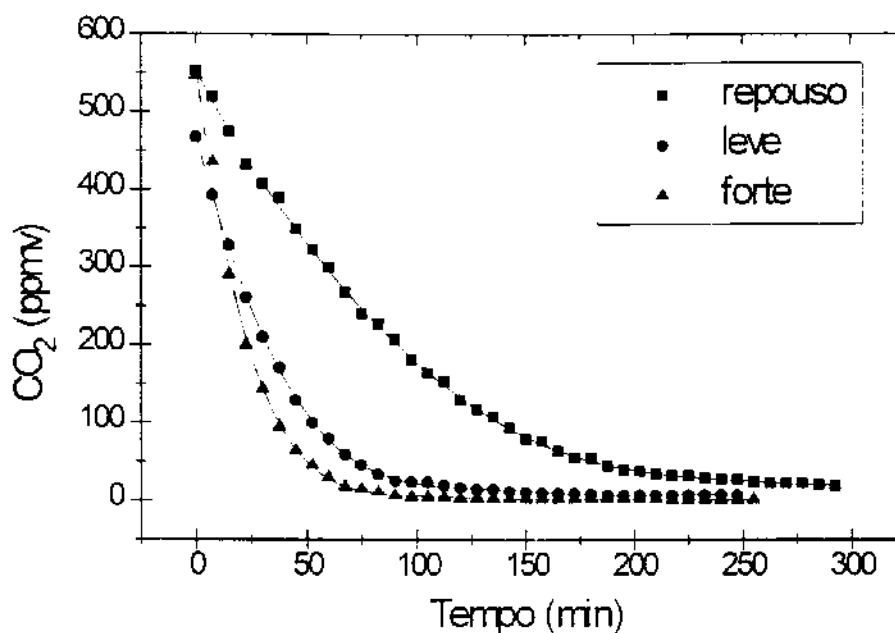


Figura IV.17 Curvas de absorção do CO₂ em diferentes condições de agitação da amostra aquosa.

Note que, à medida em que o grau de agitação da fase líquida era aumentado também era observado um aumento na taxa de absorção do dióxido de carbono, pelo menos nas primeiras horas de trabalho.

Foi observado que a absorção do CO₂ atmosférico pela amostra de água segue uma reação de primeira ordem, também nas primeiras horas de ensaio. A equação que melhor descreve esse fenômeno é a seguinte:

$$[\text{CO}_2]_t = [\text{CO}_2]_{t_0} e^{-kt} \quad (\text{IV.1})$$

onde k representa a constante de velocidade, incluindo alguns parâmetros tais como grau de agitação, temperatura, área da lâmina d'água, etc. Esse termo é obtido através do gráfico $\ln[\text{CO}_2]_t \times t$, na forma de coeficiente angular da reta.

O tempo de meia-vida da espécie CO_2 gasoso foi determinado segundo a seguinte expressão:

$$t_{1/2} = (\ln 0,5)/-k = 0,6931/k \quad (\text{IV.2})$$

Nesses ensaios, os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) para as diferentes condições foram 62, 22 e 14 minutos para a solução em repouso, sob leve e forte agitação, respectivamente. Esses resultados sugerem o que efetivamente ocorre em condições naturais, ou seja, podem fornecer dados sobre o comportamento cinético da troca do dióxido de carbono na interface líquido-gás em corpos d'água, sob várias condições de perturbação dessa interface, principalmente devido à velocidade de ventos.

Um dos pontos mais importantes para a quantificação da capacidade oceânica (e de águas continentais) em assimilar o dióxido de carbono atmosférico está centrado no conhecimento detalhado da troca gasosa na interface água/atmosfera, bem como na química aquática do CO_2 , principalmente no que diz respeito à especiação. Sabe-se que a cinética da grande maioria desses processos ainda é desconhecida e assim sendo, é dificultada a utilização de modelos matemáticos que permitam avaliar os efeitos do aporte antrópico do CO_2 .

Modelos matemáticos que descrevem a absorção ou liberação de gases em águas são normalmente baseados na **lei de Fick** para difusão molecular (**equação IV.3**).

$$F_x = -D(dC/dx) \quad [M.L^{-2}.T^{-1}] \quad (IV.3)$$

onde F é o fluxo de massa por unidade de tempo ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), D é o coeficiente de difusão molecular, um número positivo com dimensão de comprimento ao quadrado por unidade de tempo ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$), C expressa concentração (mol.m^{-3}) e o termo dC/dx corresponde a variação da concentração de um composto qualquer numa secção transversal ao longo de uma direção, por exemplo de um tubo cilíndrico (Schwarzenbach e outros, 1993).

De um modo mais simplificado a direção e magnitude do fluxo de CO_2 (F) entre as fases aquosa e gasosa é descrita pela relação já bem conhecida mostrada pela equação IV.4.

$$F = k \cdot \Delta C \quad (IV.4)$$

onde, a constante de proporcionalidade k é conhecida como o coeficiente de troca gasosa (m.s^{-1}) e ΔC é a diferença de concentração do gás entre as duas fases (mol.m^{-3}).

Esse fenômeno está diretamente relacionado com alguns parâmetros, tais como velocidade de ventos (grau de turbulência), temperatura, força iônica, solubilidade do gás, potencial hidrogeniônico, diferença entre a pressão parcial do gás na fase gasosa e fase aquosa e atividade biológica. Diferentemente da maioria dos gases o dióxido de carbono reage com a água, resultando em íons H^+ , HCO_3^- e CO_3^{2-} (Montgomery, 1985). Evidentemente esse último íon só vai ter concentração significativa em corpos aquáticos alcalinos.

No presente trabalho foi realizada uma estimativa do fluxo de dióxido de carbono da fase gasosa para a amostra de água proveniente do Lago do Relógio-UNICAMP. Para isso o CO_2 foi considerado um gás ideal, com cinética de

transferência igual a uma reação de primeira ordem. A velocidade instantânea foi obtida a partir da derivada primeira da equação da concentração (ppmv) em função do tempo, para a concentração de 350 ppmv. O fluxo calculado foi de aproximadamente 280, 785 e 1188 $\mu\text{g CO}_2/\text{m}^2.\text{min}$, para a situação de repouso, leve e forte agitação, respectivamente.

A **tabela IV.1** apresenta alguns valores da taxa de absorção/dessorção do dióxido de carbono por águas oceânicas e continentais. Note que esses valores vão desde -2,49 até 20 $\text{mol CO}_2/\text{m}^2.\text{ano}$ para águas oceânicas. Valores negativos indicam que ocorre um fluxo de CO_2 da fase aquosa para a fase gasosa e valores positivos da fase gasosa para a fase aquosa. Para águas de sistemas lacustres os valores registrados vão de 5,28 até 18,66 $\text{mol CO}_2/\text{m}^2.\text{ano}$.

Note que os valores encontrados no presente trabalho (3,3; 9,3 e 14,0 $\text{mol CO}_2/\text{m}^2.\text{ano}$) estão bem próximos daqueles encontrados para sistemas lacustres. Evidentemente que esses resultados devem ser comparados, tanto para águas continentais como oceânicas, sob o ponto de vista da ordem de magnitude. Esses valores são extremamente dependentes de fatores sazonais e espaciais. Por exemplo, em alguns meses onde a temperatura média é alta corpos aquáticos tendem a absorver CO_2 atmosférico, principalmente pela grande atividade fotossintética com consequente aumento de valores de pH, o que foi constatado no presente trabalho.

Para águas oceânicas normalmente há um aumento na absorção de CO_2 com aumento de latitude e um máximo de liberação próximo aos trópicos. As águas equatoriais são supersaturadas em relação ao CO_2 basicamente por dois fatores: o ressurgimento de águas profundas enriquecidas em nutrientes e espécies carbonáceas e o próprio aquecimento dessas águas frias, o que provoca um deslocamento do equilíbrio químico do sistema ácido carbônico favorecendo a formação do CO_2 gasoso (Takahashi, 1989).

Tabela IV.1 Dados de fluxo de dióxido de carbono ($\text{mol CO}_2/\text{m}^2\cdot\text{ano}$) entre os reservatórios água-atmosfera.

Referência	Fluxo	Local	Observações
Gosink (1992)	0,39 a 0,42	Pacífico Norte	
Liss (1983)	0,38	Pacífico Norte	
Freyer	0,65	Global	estimativa
Gosink (1992)	5,28	Lago	grande área
Gosink (1992)	18,66	Lago	pequena área
Conye e Kelley (1974)	4,57	Lago	grande área
Conye e Kelley (1974)	15,96	Lago	pequena área
Garçon e outros (1992)	0,88	Golfo do Alaska	em 1971
Garçon e outros (1992)	0,70	Golfo do Alaska	em 1972
Wong e Chang (1991)	0,7	Golfo do Alaska	entre 1973 e 1978
Frankignoulle (1988)	-2,49 a 5,85	Baía de Calvi	entre 1981 e 1985
Frankignoulle (1988)	2,43 a 2,83	Mar da Ligúria	entre 1984 e 1985
Frankignoulle (1988)	-4,63	Mar do Norte	em 1985
Broecker e outros (1985)	20	Global	oceano
Presente trabalho	3,3 a 14,0	Lago	pequena área

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO GERAL

V - CONCLUSÃO GERAL:

A comparação do sistema FIA/conducométrico, para a determinação do carbono inorgânico dissolvido (DIC) (**Capítulo II**), com outras técnicas utilizadas rotineiramente em amostras de águas naturais (Roberts e Smith, 1988; Motonizu e outros, 1987; Fukushi e Hiroy, 1987; Salonen, 1981; Horner e Smith, 1982; Johnson e outros, 1987; Abdullah e Eek, 1995) mostrou algumas vantagens. Primeiro, na determinação de DIC usou-se um equipamento de baixa sofisticação e baixo custo, o qual pode ser perfeitamente adaptado para trabalhos de campo e determinações *in situ*. Segundo, o método proposto não requer muitas informações a respeito da composição química das amostras, como no caso da titulação potenciométrica. Os compostos potencialmente interferentes para sistema FIA são principalmente os ácidos voláteis fracos (por exemplo, o ácido fórmico, acético, sulfídrico e cianídrico) que podem permear através da membrana na cela de difusão (Jardim e outros, 1990; Barros, 1990). Entretanto, a probabilidade da presença desses ácidos, em concentração similar àsquelas encontradas para espécies de carbono inorgânico é muito pequena em águas oxidadas. Finalmente a frequência analítica apresentada pelo sistema FIA/conducométrico foi de 60 amostras/ hora.

Também é importante salientar que o limite de detecção de 3 $\mu\text{mol/L}$ é adequado para trabalhos tanto em águas marinhas como continentais. Os reagentes utilizados são de baixo custo e altamente estáveis (água desionizada e ácido sulfúrico).

O mesmo sistema usado para determinações rotineiras de DIC também podem ser utilizado em determinações de CO_2 -total sem nenhuma modificação. Além disto, permite a determinação de amônia (Pasquini e Faria, 1987) simplesmente pela substituição da solução ácida por uma solução alcalina.

A quantificação e especiação do dióxido de carbono é de fundamental importância sob vários aspectos. Quanto ao dióxido de carbono livre (H_2CO_3^*), o excesso dessa espécie em sistemas aquosos pode promover a dissolução de minerais à base de carbonato, bem como a corrosão de tubulações metálicas. Enquanto que o oposto, pode propiciar a precipitação de carbonatos levando a efeitos tão indesejáveis quanto no primeiro caso.

A determinação da concentração da espécie H_2CO_3^* , a qual está diretamente relacionada com $p\text{CO}_2$, é muito importante pois é justamente essa fração do sistema carbonato que apresenta um grande dinamismo nas camadas superiores de corpos aquáticos, podendo ser um indicador do grau de saturação do dióxido de carbono na interface líquido-gás (Goyet e outros, 1992).

Muitas técnicas analíticas são disponíveis para a determinação do dióxido de carbono dissolvido (DIC) e total (CO_2 -total). Porém, apesar desta variedade, a especiação do CO_2 ainda é um processo complexo, uma vez que qualquer alteração na amostra em estudo pode modificar o equilíbrio entre as várias espécies químicas, e a quantificação individual de cada uma das espécies é prejudicada.

A grande vantagem do método aqui proposto para a determinação da espécie H_2CO_3^* (**capítulo III**) é justamente a não perturbação da amostra a ser analisada. O limite de detecção obtido foi de $3 \mu\text{mol/L}$, também adequado para trabalhos em águas oceânicas e continentais. A frequência analítica foi de 30 amostras/hora quando se faz a injeção de volumes discretos da amostra e aproximadamente 10 amostras/hora quando a amostra é passada continuamente pela cela de difusão (**estado estacionário**). Os agentes interferentes basicamente são os mesmos descritos na determinação de DIC.

Os sistemas FIA, tradicionalmente, têm sido utilizados em trabalhos onde a espécie a ser estudada encontra-se dissolvida em meios líquidos. Em alguns

casos onde o analito encontra-se na fase gasosa, é feita uma prévia absorção/reacção para a fase líquida para a posterior quantificação, ou seja, usualmente faz-se um pré-tratamento da amostra gasosa.

O método aqui descrito para a quantificação do dióxido de carbono gasoso (**capítulo IV**) é totalmente inovador nesse aspecto, uma vez que a análise é realizada diretamente na amostra gasosa, procedimento esse ainda não publicado em revistas especializadas em sistemas FIA.

Vale a pena ressaltar que o sistema pode ser utilizado em monitoramento contínuo, como por exemplo, trabalhos de respirometria, incluindo testes de tratabilidade e toxicidade, tanto de resíduos líquidos como sólidos e em estudos sobre troca gasosa em interfaces líquido-gás. Em trabalhos preliminares foi observado uma baixa interferência de amônia, ácido acético, ácido fórmico e ácido nítrico. Além disso o limite de detecção foi de 50 ppmv, suficiente para trabalhos em ambientes naturais onde a concentração do CO₂ gasoso situa-se próximo à 350 ppmv. A frequência analítica foi de aproximadamente 60 amostras/hora para amostragem discreta e cerca de 10 amostras/ hora em sistema com amostragem contínua (**estado estacionário**).

Recentemente, Fadini (1995) determinou a concentração de carbono orgânico dissolvido em águas naturais e esgoto doméstico, utilizando praticamente a mesma montagem do sistema FIA aqui apresentado. Nesse caso a amostra era oxidada, em linha, sob a ação de luz ultravioleta e em meio persulfato/ácido. O dióxido de carbono gerado era quantificado condutometricamente. Também foi determinado o teor de carbono inorgânico dissolvido, através da exclusão da exposição à luz ultravioleta. Fica claro que o sistema FIA/condutométrico pode dar uma contribuição importante para uma completa especiação das formas de carbono em meio aquoso e dióxido de carbono na fase gasosa.

Em relação ao sistema de detecção, num trabalho recente, Kubán e Dasgupta (1993) fizeram uma comparação entre sistemas de detecção espectrofotométrica e condutométrica na determinação de carbono inorgânico usando a análise por injeção em fluxo. Os autores concluíram que o detector condutométrico resulta numa melhor reprodutibilidade e sensibilidade (limite de detecção) em análises de rotina.

Finalmente, preve-se uma grande demanda, a curto prazo, para equipamentos de dimensões reduzidas, automatizados e compactos (uma única montagem para todas as determinações) para trabalho em campo. Por exemplo, equipamentos embarcados para mapeamento de todas as formas do sistema ácido carbônico numa determinada região, ou mesmo o monitoramento em áreas remotas. E quanto à parte biológica, a realização de testes de toxicidade aguda, similares àqueles realizados com *Escherichia coli*, pode ser viável utilizando-se outros microorganismos, tais como as bactérias *Staphilococcus aureus*, *Salmonella choreasuis* e *Enterococcus faecalis* e mesmo a possibilidade do emprego do caramujo *Biomphalaria sp*, o qual é um vetor das várias espécies responsáveis pela transmissão da esquistossomose.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

VI-REFERÊNCIAS:

- ABDULLAH, M.I., EEK, E. (1995). Automatic method for the determination of total CO₂ in natural waters. *Wat. Res.*, **29**(5), 1231-1234.
- AIKEN, R.M., JAWSON, M.D., GRAHAMMER, K., POLYMENOPOULOS, A.D. (1991). Positional, spatially correlated and random components of variability in carbon dioxide efflux. *J. Environ. Qual.*, **20**, 301-308.
- ALEIXO, L.M., GODINHO, O.E.S. (1984). Discussão sobre o uso de métodos lineares na determinação de volume de equivalência de titulações potenciométricas. Aplicações em experimentos didáticos. *Química Nova*, **Jan.**, 32-36.
- ALLEN, R., (1980). The impact of CO₂ on world climate. *Environment*, **22**(10), 6-13, 37-38.
- ANDRADE, J.B., ARAÚJO, F.R.J., ARAGÃO, N.M. (1995). Determinação de vapor de ácido nítrico na atmosfera. *Química Nova*, **18**(1), 5-10.
- AZEVEDO, F.A., BORGES, E.L. (1990) "Breves referências aos aspectos toxicológicos do metanol (séries monografias FJS)", Fundação José Silveira, Salvador-Bahia.
- BACCAN, N., ANDRADE, J.C., GODINHO, O.E.S., BARONE, J.S. "Química analítica quantitativa elementar", Editora Edgard Blücher Ltda/Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil (1979).

- BARROS, F.G. (1990). "Determinação condutométrica e colorimétrica de acidez volátil de vinagres e vinhos por injeção em fluxo". Tese de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas. Brasil.
- BECKMAN INSTRUMENTAS, INC., "Advantages of Using Several Test Time", Microtox Application Notes, N.M102, Carls-bad, CA. (1981)
- BITTON, G., DUTKA, B.J. "Toxicity testing using microorganisms", (Editado por Bitton, G. e Dutka, B.J.), Vol. 1, CRC Press Inc., Boca Raton-Flórida (1986).
- BRADSHAW, A.L., BREWER, P.G. (1988). High precision measurements of alkalinity and total carbon dioxide in seawater by potentiometric titration-1. Presence of unknown protolyte(s)? *Mar. Chem.*, **23**, 69-86.
- BRANCO, G.M., SZWARC, A., FARAH, E.L., CONTI, E.W., COSTA, W. "Pesquisa de combustíveis com metanol", CETESB (1990).
- BROECKER, W.S., PENG, T.-H., OSTLUND, G., STUIVER, M. (1985). The distribution of bomb radio-carbon in the ocean. *J. Geophys. Res.*, **90**(C4), 6953-6970.
- BUTLER, J.N. "Carbon dioxide equilibria and their applications", p. 15. Addison-Wesley Publishing Company, Massachusetts (1982).

- BUTLER, E.C.V.(1992). Continuous shipboard measurement of the pH of surface seawaters, and derivation of the corresponding record of $p\text{CO}_2^*$. *Sc. Total Environ.*, **112**, 165-175.
- CHRISTIAN, G.D. "Analytical Chemistry". John Wiley & Sons, Inc. (5ª edição). USA (1994).
- CLARK, G.D., WHITMAN, D.A., CHRISTIAN, G.D., RUZICKA, J. (1990). Sample handling and pretreatment using flow injection analysis. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **21**, 357-375.
- COYNE, P.I., KELLEY, J.J. (1974). Carbon dioxide pressures in Arctic surface waters. *Limnol. Oceanogr.*, **6**, 928-938.
- DICKSON, A.G., MILLERO, F.J. (1987). A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res.*, **34**, 1733-1743.
- DOWARD, E.J., BARISAS, B.G. (1984). Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environ. Sci. Technol.*, **18**, 967-972.
- DYRSSEN, D. (1965). A Gran titration of seawater on board Sagitta. *Acta Chem. Scand.*, **19**, 1265-1267.
- DYRSSEN, D., SILLEN, L.G. (1967). Alkalinity and total carbonate in seawater: a plea for P-T independent data. *Tellus*, **19**, 113-121.

- ECKLUND, E.E, MILLS, G.A. (1989). Alternative fuels: progress and prospects (Part 1). *Chemtech*, **19**, 549-556.
- FADINI, P.S. "Determinação de carbono orgânico dissolvido em amostras naturais através de análise por injeção em fluxo", Tese de mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, UNICAMP (1995).
- FRANKIGNOULLE, M. (1988). Field measurements of air-sea exchange. *Limnol. Oceanogr.*, **33**(3), 313-322.
- FUKUSHI, K., HIIRO, K. (1987). Determination of total carbon dioxide in seawater by capillary type isotachophoresis. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **328**, 247-250.
- FUNDACENTRO (1990). "Metanol: solução ou problema? Atualidades em prevenção de acidentes", *Fundacentro*, São Paulo, **21** (242).
- GABELE, P.A. (1990). Characterization of emissions from a variable gasoline/methanol fueled car. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, **40**, 296-304.
- GARÇON, V.C., THOMAS, F., WONG, C.S., MINSTER, J.-F. (1992). Gaining insight into the seasonal variability of CO₂ at Ocean Station P using an upper ocean model. *Deep-Sea Res.*, **39**(6), 921-938.
- GLAB, S., HULANICKI, A. (1989). Potentiometric study of end-point detection in the coulometric determination of carbon dioxide. *Talanta*, **36**(4), 519-524.

- GONZALO, E.R., PAVÓN, J.L.P., RUZICKA, J., CHRISTIAN, G.D. (1992). Flow-injection analysis determination of phenols in kerosene and naphtha by membrane extraction-preconcentration. *Anal. Chim. Acta*, **259**, 37-44.
- GOSINK, T.A. (1992). Air-water gas exchange. An empirical approach. *Sc. Total Environ.*, **112**, 221-231.
- GOYET, C., WALT, D.R., BREWER, P.G. (1992). Development of fiber optic sensor for measurement of pCO₂ in sea water: design criteria and sea trials. *Deep-sea Res.*, **39**, 1015-1026.
- GOYET, C., POISSON, A. (1989). New determination of carbonic acid dissociation constants in seawaters as a function of temperature and salinity. *Deep-sea Res.*, **36**, 1635-1654.
- GRAY, C.L.JR., ALSON, J.A. (1989). The case for methanol. *Sci. Am.*, **261**, 86-92.
- GUTMARÃES, J.R. "Determinação do dióxido de carbono por FIA: Aplicação em testes de toxicidade", Tese de mestrado, Instituto de Química, UNICAMP (1990).
- HERCZEG, A.L., BROECKER, W.S., ANDERSON, R.F., SCHIFF, S.L., SCHINDLER, D.W. (1985). A new method for monitoring temporal trends in the acidity of fresh waters. *Nature*, **315**(9), 139-141.
- HILEMAN, B. (1989). Global Warming. *Chem. & Eng. News*, **13**, 25-44.

HMSO Books "Acute toxicity with aquatic organisms, (1981)", Her Majesty's Stationery Office (Ed), Londres (1983).

HMSO Books "The determination of carbon dioxide in natural, treated and beverage waters with a supplement on sampling bottled and canned waters, (1986)", Her Majesty's Stationery Office (Ed), Londres (1987).

HORNER, S.M.J., SMITH, D.F. (1982). Measurement of total inorganic carbon in seawater by a substoichiometric assay using $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 978-983.

HORVAI, G., PUNGOR, E. (1987). Theoretical backgrounds of flow analysis. *Crit. R. Anal. Chem.*, **17**, 231-264.

INGMAN, F., STILL, E. (1966). Graphic method for the determination of titration end-points. *Talanta*, **13**, 1431-1442.

JARDIM, W.F., PASQUINI, C., GUIMARÃES, J.R., FARIA, L.C. (1990). Short-term toxicity test using *Escherichia coli*: monitoring CO_2 production by flow injection analysis. *Wat. Res.*, **24**, 351-354.

KUBALA, S.W., TILOTTA, D.C., BUSCH, M.A., BUSCH, K.W. (1989). Determination of total inorganic carbon in aqueous samples with a flame infrared emission detector. *Anal. Chem.*, **24**, 1841-1846.

- KUBÁN, V. (1992). Gas permeation and preconcentration in the flow-injection determination of acid-available cyanide in waste water. *Anal. Chem. Acta*, **259**, 45-52.
- KUBÁN, V., DASGUPTA, P.K. (1993). Comparison of photometry and conductometry for the determination of total carbonate by gas permeation flow injection analysis. *Talanta*, **40**, 831-840.
- LEFÈVRE, N., CIABRINI, G.M., BRIENT, B., DUCHAFFAUT, M., MERLIVAT, L. (1993). A new optical sensor for P_{CO_2} measurements in seawater. *Mar. Chem.*, **42**, 189-198.
- LERMAN, A., STUMM, W. (1989). CO_2 storage and alkalinity trends in lakes. *Wat. Res.*, **23**, 139-146.
- LIXIN, W., HUANNAN, H. (1992). Determination of absorption efficiencies of carbon dioxide absorbents by gas chromatography. *Talanta*, **39**(9), 1081-1087.
- MANAHAN, S.E. "Environmental Chemistry", Brooks/Cole Publishing Company (4ª. edição), Monterey-Califórnia (1984).
- METZL, N., BEAUVERGER, C., BRUNET, C., GOYET, C., POISSON, A. (1991). Surface water carbon dioxide in the southwest Indian sector of the Southern Ocean: a highly variable CO_2 source/sink region in summer. *Mar. Chem.*, **35**, 85-95.

- MILLERO, F.J., BYRNE, R.H., WANNINKHOF, R., FEELY, R., CLAYTON, T., MURPHY, P., LAMB, M.F. (1993). The internal consistency of CO₂ measurements in the equatorial Pacific. *Mar. Chem.*, **44**, 269-280.
- MILLS, G.A., ECKLUND, E.E. (1989). Alternative fuels: progress and prospects (Part 2). *Chemtech*, **19**, 626-631.
- MONTGOMERY, J.M.. "Water treatment principles and design", A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, New York, USA (1985)
- MOREIRA J.R., SALDIVA, P.H.N., SZWARC, A. "Estudo de impacto no meio ambiente. O uso do metano como combustível", Versão final, CETESB, São Paulo (1990).
- MOTOMIZU, S., TOEI, K., KUWAKI, T., OSHIMA, M. (1987). Gas diffusion with tubular microporous poly(tetrafluorethylene) membrane for flow-injection determination of carbon dioxide. *Anal. Chem.*, **59**, 2930-2932.
- MURPHY, P.P., FEELY, R.A., GAMMON, R.H., KELLY, K.C., WATERMAN, L.S. (1991). Autumn air-sea disequilibrium of CO₂ in the South Pacific Ocean. *Mar. Chem.*, **35**, 77-84.
- PASQUINI, C., FARIA, L.C. (1987). Flow-injection determination of ammonia in Kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry. *Anal. Chem. Acta*, **193**, 19-27.

- PAVÓN, J.L.P., GONZALO, E.R., CHRISTIAN, G.D., RUZICKA, J. (1992). Universal sandwich cell and detector for optical flow injection analysis. *Anal. Chim.*, **64**, 923-929.
- PEREZ, F.F., FRAGA, F. (1987). A precise and rapid analytical procedure for alkalinity determination. *Mar. Chem.*, **21**, 169-182.
- POISSON, A., CULKIN, F., RIDOUT, P. (1990). Intercomparison of CO₂ measurements. *Deep-Sea Res.*, **37**(10), 1647-1650.
- REIS, B.F., GINÉ, M.F., KRONKA, E.A.M. (1989). A análise química por injeção em fluxo contínuo. *Química Nova*, **12**, 82-91.
- ROBERTS, D.G., SMITH, D.M. (1988). Infrared gas analysis of both gaseous and dissolved CO₂ in small-volume marine samples. *Limnol. Oceanogr.*, **33**, 135-140.
- ROBERTSON, J.E., WATSON, A.J., LANGDON, C., LING, R.D., WOOD, J.W. (1993). Diurnal variation in surface pCO₂ and O₂ at 60 °N, 20 °W in the North Atlantic. *Deep-Sea Res. II*, **40**(1/2), 409-422.
- RUZICKA, J., HANSEN, E.H. "Flow Injection Analysis", 2ª Edição, John Wiley and Sons, Inc, New York, 1988.
- SALOMEN, K. (1981). Rapid and precise determination of total inorganic carbon and some gases in aqueous solutions. *Wat. Res.*, **15**, 403-406.

- SCHWARTZ, A.T., BUNCE, D.M., SILBERMAN, R.G., STANITSKI, C.L., STRATTON, W.J., ZIPP, A.P. "Chemistry in Content: Applying Chemistry to Society", American Chemical Society, Wm. C. Brown Communications, Inc., Dubuque, USA, 1984.
- SCHWARZENBACH, R.P., GSCHWEND, P.M., IMBODEN, D.M. "Environmental Organic Chemistry", A Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1993.
- SEMILETOV, I.P., PIPKO, I.I. (1991). Mesoscale spatial and temporal variations of carbon dioxide in the subarctic frontal zone of the Pacific Ocean. *Oceanology*, **31**(1), 60-65.
- SKOOG, D.A., LEARY, J.J. "Principles of Instrumental Analysis". Saunders College Publishing (4ª edição), USA (1992).
- SMITH, K.J., PACEY, G.E. (1993). Reverse dual phase gas diffusion flow injection analysis. *Talanta*, **40**(12), 1961-1966.
- SNOW, R., BAKER, L., CREWS, W., DAVIS, C.O., DUNCAN, J., PERRY, N., SIUDAK, P., STUMP, F., RAY, W. BRADDOCK, J. (1989). Characterization of emissions from a methanol fueled motor vehicle. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, **39**, 48-54.
- SODHI, D., ABRAHAM, M.A., SUMMERS, J.C. (1990). The kinetics of formaldehyde oxidation and emissions reduction in methanol fueled vehicles. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, **40**, 352-356.

- SPILLMAN, R.W, SHERWIN, M.B. (1990). Gas separation membranes: The first decade. *Chemtech*, (June) 378-384.
- STUMM, W., MORGAN, J.J. (1981). Aquatic chemistry; An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. John Wiley and Sons, Inc (Ed.), 2ª. Ed., New York, Chichester, Bribane, Toronto (1981).
- SWINNERTON, J.W., LINNENBOM, V.J., CHEEK, C.H. (1962). Determination of dissolved gases in aqueous solutions by gas chromatography. *Anal. Chem.*, **34**, 483-485.
- TAKAHASHI, T. (1989). The CO₂ puzzle. *Oceanus*, **29**, 22-29.
- TAKAHASHI, T., KAITERIS, P., BROECKER, W.S. (1976). A method for shipboard measurement of CO₂ partial pressure in seawater. *Earth Planet. Sci. Lett*, **32**, 451-457.
- VALCÁRCEL, M., LUQUE DE CASTRO, M.D. "Análisis por Inyección en Flujo", 2ª Edição, Imprensa San Pablo, Cordoba, 1984.
- VAN DEN BERG, C.M.G., ROGERS, H. (1987). Determination of alkalinities of estuarine waters by a two-point potentiometric titration. *Mar. Chem.*, **20**, 219-226.
- VAN DER LINDEN, W.E. (1983). Membrane separation in flow injection analysis - gas diffusion. *Anal. Chem. Acta*, **151**, 359-369.

- VAN DER LINDEN, W.E. (1994). Classification and definition of analytical methods based on flowing media. *Pure & Appl. Chem.*, **66**(12), 2493-2500.
- VITOUSEK, P.M. (1991). Can planet forests counteract increasing atmospheric carbon dioxide? *J. Environ. Qual.*, **20**, 348-354.
- WALT, D.R., GABOR, G., GOYET, C. (1993). Multiple-indicator fiber-optic sensor for high-resolution pCO₂ sea water measurements. *Anal. Chim. Acta*, **274**, 47-52.
- WEDBORG, M. (1988). Alkalinity in seawater and estuarine water - some limitations in the two-point method. *Mar. Chem.*, **24**, 337-343.
- WEISS, R.F. (1981). Determination of carbon dioxide and methane by dual catalyst flame ionization chromatography and nitrous oxide by electron capture chromatography. *J. Chromatog. Sci.*, **19**, 611-616.
- WEISS, R.F., JAHNKE, R.A., KEELING, C.D. (1982). Seasonal effects of temperature and salinity on the partial pressure of CO₂ in seawater. *Nature*, **300**(9), 511-513.
- WILLIAMS, R.L., LIPARI, F., POTTER, R.A. (1990). Formaldehyde, methanol and hydrocarbon emissions from methanol-fueled cars. *J. Air Waste Manage. Assoc.*, **40**, 747-756.

- WONG, C.S., CHAN, Y.-H. (1991). Temporal variations in the partial pressure and flux of CO₂ at Ocean Station P in the subarctic Pacific ocean. *Tellus*, **43B**, 206-223.