



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

"Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES e aprovado pela comissão julgadora."

09/04/1990



DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO POR FIA:
APLICAÇÃO EM TESTES DE TOXICIDADE.

TESE DE MESTRADO

José Roberto Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim

MARÇO/1990

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Biblioteca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À

Cecília e Martha,

dedico.

Aos meus pais

Victor e Petrina

Aos meus irmãos

Wilson e Silvana

AGRADECIMENTOS:

Ao grande amigo Tuti pela orientação, apoio e amizade.

Aos amigos Jarbas e Marco pela força durante todos esses anos.

Ao Ivo, Bil, Cabo, Lori, Célio, Paulão, Paulinho, Marcia, Renato, Luca, Volnei, grandes companheiros.

Ao Stephan e Neuza pela amizade e lealdade

Aos professores Godinho e Aleixo pelo apoio demonstrado.

Ao professor João Carlos pelo empréstimo de equipamentos.

À FEA e IB da UNICAMP pelo fornecimento das bactérias e especialmente à Jaqueline, da FEA, pela manutenção das mesmas.

Ao Laurindo pela reprodução e encadernação da tese.

Ao CNPq (405930/88-7), FAPESP (87/3012-3) e Instituto de Química pelo suporte financeiro.

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

ÍNDICE

	página
I- INTRODUÇÃO	01
I.A- A QUÍMICA AQUÁTICA DO DIÓXIDO DE CARBONO	01
I.A.1- O ciclo do carbono	01
I.A.2- O sistema fechado	05
I.A.3- O sistema aberto	10
I.B- MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE CO ₂	13
I.B.1- Via alcalinidade	13
I.B.2- Por arraste antes e após a acidificação	15
I.B.3- Manometricamente	16
I.B.4- Eletrodo ion-seletivo	17
I.B.5- Outros	17
I.C- A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO CO ₂	19
I.C.1- Respirometria	19
I.C.2- Testes de toxicidade	22
I.C.3- Sedimentos	25
I.D- METAS DO TRABALHO	29
II- PARTE EXPERIMENTAL	30
II.A- REAGENTES E SOLUÇÕES	30
II.A.1- Tampões de pH	30
II.A.2- Soluções estoque utilizadas	30
II.A.3- Outros reagentes	31
II.A.4- Amostras	32
II.B- EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS:	34
II.B.1- Sistema de injeção em fluxo	34
II.B.2- Potenciometria	35
II.B.3- Banho termostático	35
II.B.4- Pipetas e buretas	35
II.C- ORGANISMO TESTE	36

II.D-	DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO TOTAL PELO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO	36
II.D.1-	Padrões de carbonato	38
II.E-	TESTE DE TOXICIDADE	41
II.E.1-	Meio de cultura para crescimento de bactérias	41
II.E.2-	Procedimento do teste de toxicidade	41
II.F-	ESPECIAÇÃO DE CÁDMIO NO MEIO DE CULTURA	42
III-	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
III.A-	DETERMINAÇÃO DO CO ₂ POR FIA	44
III.A.1-	Comparação dos resultados obtidos pelo sistema FIA com aqueles obtidos por titulação potenciométrica	46
III.A.2-	Precisão	48
III.B-	APLICAÇÃO DO MÉTODO EM TESTES DE TOXICIDADE AGUDA	49
III.B.1-	A resposta microbiana frente aos metais cádmio, cobre e mercúrio	50
III.B.2-	Especiação de Cd(II) no meio de cultura	54
III.B.3-	Teste de toxicidade com sedimentos e anti-biótico	57
III.B.4-	Cálculo de EC ₅₀	59
III.B.5-	Teste de tratabilidade	69
IV-	CONCLUSÃO	71
V-	REFERÊNCIAS	73

RESUMO

DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO POR FIA: APLICAÇÃO EM TESTES DE TOXICIDADE.

Autor: José Roberto Guimarães.

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim.

Desenvolveu-se inicialmente um método para determinação da concentração total do dióxido de carbono (C_T) em meio aquoso. A técnica utilizada foi a da Análise por Injeção em Fluxo (FIA) com detector condutométrico.

Foi feita a determinação da concentração total do dióxido de carbono em amostras de águas naturais. Os resultados obtidos utilizando-se esse procedimento foram comparados com aqueles obtidos por titulação potenciométrica na qual este parâmetro é calculado usando os valores de pH e alcalinidade.

A segunda parte do trabalho compreendeu a aplicação do método FIA na caracterização da toxicidade dos metais Cd(II), Hg(II), Cu(II) e Ni(II), do cloreto de cetiltrimetilamônio, de um antibiótico (Bactrin), além de amostras de sedimentos e águas residuárias usando a bactéria *Escherichia coli* como organismo teste. A avaliação da toxicidade das espécies acima mencionadas foi feita monitorando-se a inibição/estimulação do processo de respiração desta bactéria em meio de cultura aquoso. Neste processo de respiração microbiana, a assimilação da glucose é acompanhada pela produção de CO_2 .

Finalmente, os resultados obtidos nos testes de toxicidade foram expressos na forma de EC_{50} . Para os metais Ni(II), Cd(II) e o sal cloreto de cetiltrimetilamônio os valores de EC_{50} obtidos para uma exposição de 60 minutos foram de 76,67, de 14,62 e de 7,88 mg/l, respectivamente.

ABSTRACT

DETERMINATION OF TOTAL CARBON DIOXIDE USING FIA: APPLICATION TO SHORT-TERM TOXICITY TESTS.

Author: José Roberto Guimarães.

Supervisor: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim.

The major aim of this project was the development of a method to determine the total concentration of carbon dioxide in aqueous samples using Flow Injection Analysis (FIA) with a conductometric detector.

The method was applied to natural water samples and the results obtained were compared to others obtained by using potentiometric titration, where the CO_2 concentration is inferred with the help of the pH and alkalinity.

The application of the proposed method to short-term toxicity tests using the bacteria *Escherichia coli* as a test organism was also investigated. The inhibition/stimulation of the microbial respiration for different agents such as metal ions [Cd(II), Cu(II), Hg(II) and Ni(II)], one type of antibiotic (Bactrin), cetyltrimethylammonium chloride, sediments and industrial effluents was investigated.

The toxicity tests results were presented as EC_{50} . For the metals Ni(II), Cd(II) and the cetyltrimethylammonium chloride, the EC_{50} (60 minutes) were 76.67, 14.62 and 7.88 mg/l, respectively.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.A - A QUÍMICA AQUÁTICA DO DIÓXIDO DE CARBONO:

I.A.1 - O CICLO DO CARBONO:

O dióxido de carbono (CO₂) é um gás que hoje compreende cerca de 0,035% do volume total da atmosfera terrestre, muito embora a atmosfera primitiva da Terra contivesse mais CO₂ do que esta cifra atual. Oriundo principalmente da atividade vulcânica, esse excesso de CO₂ foi gradualmente sendo absorvido pelos oceanos e "fixado" não apenas na forma de carbonato, mas também nos organismos fotossintetizantes. Dessa maneira, após centenas de milhões de anos, muito do CO₂ atmosférico acabou convertido em depósitos sedimentares. Carvão, óleo e gás natural são restos de organismos que foram vivos e que fixaram CO₂ durante a fotossíntese (Allen, 1980).

O ciclo do carbono é composto por vários subciclos interligados entre si, pelos quais o carbono move da atmosfera para a hidrosfera e geosfera e, eventualmente, pode retornar para a atmosfera. Esses subciclos acontecem em diferentes escalas de tempo (Hileman, 1989). A figura I.1 mostra, de forma esquemática, a circulação global do carbono sob a forma de CO₂, bicarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃²⁻) e matéria orgânica (Takahashi, 1989).

Num primeiro ciclo, as plantas terrestres e aquáticas, por meio da fotossíntese, usam a energia luminosa para produzir carboidratos e oxigênio a partir de CO₂ e água (H₂O). Os carboidratos são estocados nas plantas (biomassa) e o oxigênio é liberado para a atmosfera. As plantas são ingeridas por animais e muito

desse carbono retorna à atmosfera na forma de dióxido de carbono, como produto de digestão. Esse subciclo é considerado como sendo um processo de curta duração (Stoker e Seager 1972; Hileman, 1989).

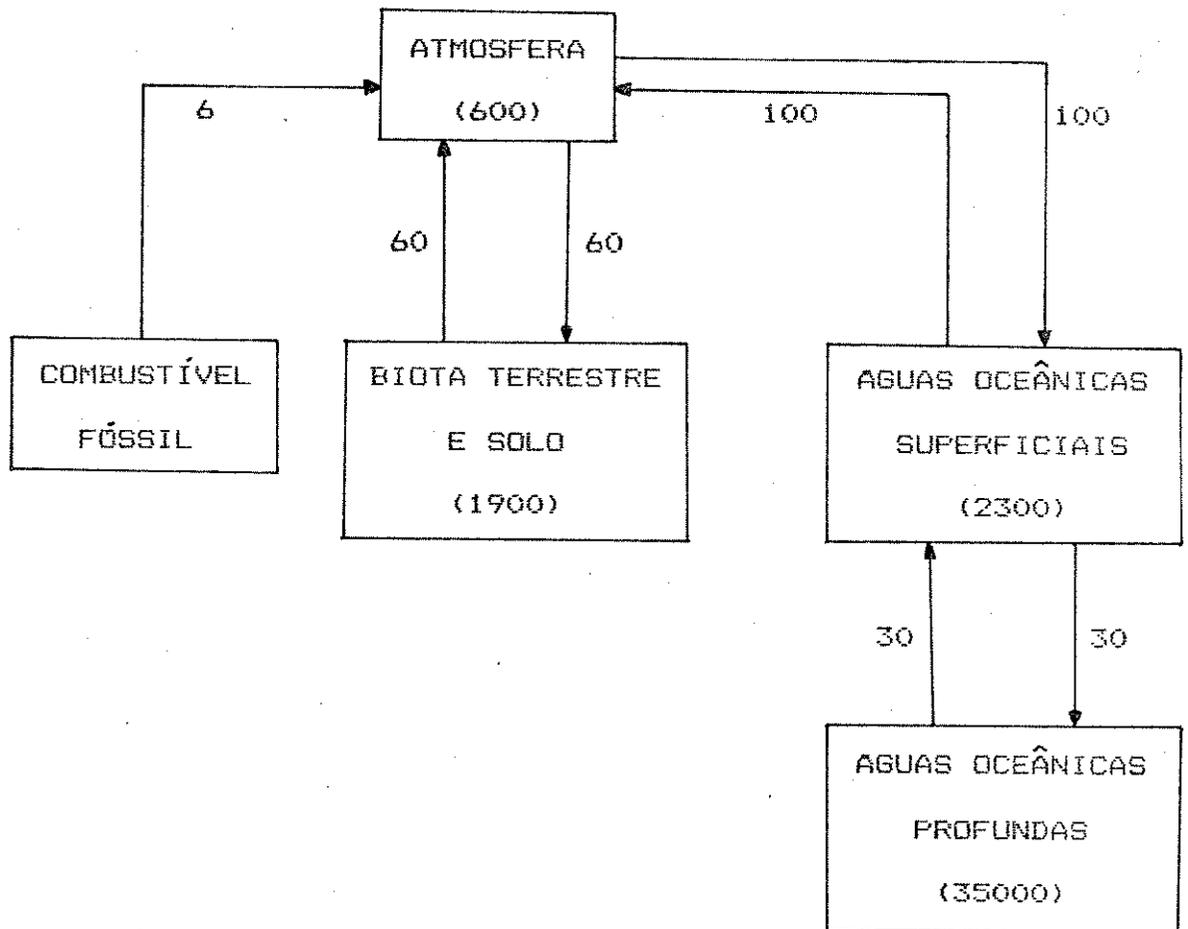


Figura I.1 - Ciclo global do carbono (a unidade é bilhões de toneladas para os reservatórios e bilhões de toneladas/ano para os fluxos entre os reservatórios), segundo Takahashi, 1989.

Um segundo subciclo, considerado de longa duração, é aquele no qual plantas e animais marinhos morrem e vão para o fundo do oceano onde são incorporados no sedimento. Seus tecidos celulares são transformados numa matriz mineral na forma de matéria orgânica fóssil como o carvão, o gás natural e o petróleo (Hileman, 1989).

Um terceiro subciclo, de maior duração, é aquele onde o CO_2 proveniente da atmosfera ou da decomposição de plantas é incorporado nas nuvens e nas águas de chuvas. Posteriormente, essas águas dissolvem carbonatos minerais produzindo ions bicarbonato, os quais são carregados pelas águas para córregos, rios e oceanos. Nos oceanos, organismos marinhos podem assimilar esse CO_2 formando seus tecidos esqueléticos e carapaças. Com a morte desses animais, a maioria desses esqueletos são depositados no fundo do oceano formando novamente rochas de carbonato.

Pela movimentação natural das placas continentais, os depósitos de carbono na crosta oceânica são empurrados para baixo destas placas. Esses minerais são aquecidos e finalmente são liberados na forma de dióxido de carbono para a atmosfera através de vulcões e fontes minerais ricas em bicarbonato. Este processo leva dezenas de milhões de anos e tem mantido o nível de dióxido de carbono atmosférico relativamente constante. De acordo com McElroy (ver Hileman, 1989), essa movimentação só ocorreu por volta de 20 vezes durante toda a história da Terra.

Pouco se conhece da influência do homem no ciclo natural do carbono. Atualmente o CO_2 tem despertado um grande interesse na comunidade por ser o maior responsável pelo chamado "efeito estu-

fa". É sabido que cerca de 6 bilhões de toneladas de carbono são queimados a cada ano como combustível fóssil, e que apenas a metade desse carbono permanece como dióxido de carbono na atmosfera. A concentração de CO_2 na atmosfera tem sido medida com grande precisão desde 1958 em mais de 45 locais em todo o mundo. Desde a era preindustrial, na qual a concentração de CO_2 na atmosfera era de aproximadamente 280 ppmv, a concentração desse gás vem aumentando anualmente cerca de 0,35%. A cifra atual é de 350 ppmv, ou 0,035%. Isso é atribuído principalmente à queima de combustíveis fósseis e à produção de cimento (Rebello, 1987).

No entanto, o destino final da outra metade do CO_2 produzido antropogenicamente não está muito claro. Acredita-se de que esse carbono pode estar sendo dissolvido nas águas dos oceanos ou sendo incorporado na biosfera. Há evidências de que os vegetais estocam mais carbono quando os níveis atmosféricos de dióxido de carbono são maiores. Infelizmente não se dispõe de um bom sistema de monitoramento para quantificar o conteúdo de carbono assimilado tanto nos oceanos como pela vegetação.

É sabido que os oceanos são um imenso reservatório de CO_2 , contendo 50 vezes mais que a atmosfera e 20 vezes mais do que a biosfera (Takahashi, 1989). A solubilidade do CO_2 em águas oceânicas é maior que os outros gases da atmosfera; além disso, o CO_2 tem a propriedade de reagir quimicamente sob as condições encontradas na água de mar para formar principalmente HCO_3^- e CO_3^{2-} .

A quantidade de CO_2 dissolvido na água de mar aumenta rapidamente até cerca de 1000 metros. Abaixo desse nível, o aumento é mais lento. Este aumento decrescente na concentração do CO_2 é o

resultado de vários processos oceânicos, os quais são coletivamente chamados de bomba biológica do carbono. Essa bomba transporta carbono das camadas superficiais para o fundo dos oceanos via sedimentação gravitacional dos fragmentos biológicos produzidos na zona fótica dos oceanos.

Sendo os oceanos uma possível fonte de remoção do CO_2 atmosférico, uma parte da química ambiental tem sido dirigida para o estudo dos processos que ocorrem na interface água/ar, visando esclarecer aspectos ainda obscuros da química aquática do CO_2 . É sabido que a cinética de uma grande maioria destes processos ainda é desconhecida e assim sendo, dificulta a utilização de modelos matemáticos utilizados para prever os efeitos do aporte antropogênico do CO_2 .

Sob o ponto de vista químico, pode-se dividir a química aquática do CO_2 em dois sistemas. O sistema fechado e o sistema aberto, os quais serão agora abordados mais detalhadamente.

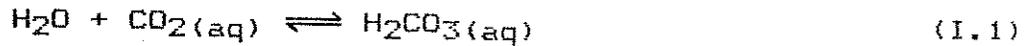
I.A.2 - O SISTEMA FECHADO:

O sistema carbônico fechado é aquele onde não ocorre nenhuma troca na interface líquido/gás, ou seja, não é considerado o equilíbrio com a atmosfera na qual exista CO_2 (Stumm e Morgan, 1981).

Cálculos envolvendo o sistema carbônico em solução aquosa, no equilíbrio, requerem o conhecimento das concentrações das seis espécies presentes, ou seja, CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- , CO_3^{2-} , H^+ , e OH^- . No entanto, o número de equações necessárias para descrever a

distribuição das espécies pode ser reduzida para cinco se considerarmos que uma grande fração da espécie não ionizada está presente na forma de $\text{CO}_2(\text{aq})$.

Isso é mostrado no equilíbrio de hidratação.



$$K = [\text{CO}_2(\text{aq})] / [\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})] \quad (\text{I.2})$$

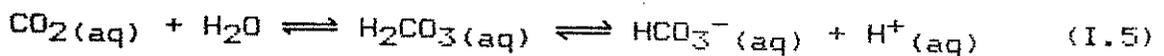
onde K é a constante que descreve o equilíbrio de hidratação e a 25°C seu valor é da ordem de 650. Isso indica que o equilíbrio não é favorecido para a formação da espécie $\text{H}_2\text{CO}_3(\text{aq})$, e assim pode-se definir uma espécie operacional, H_2CO_3^* , de acordo com a equação:

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

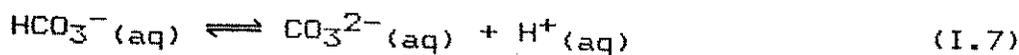
ou seja,

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] \cong [\text{CO}_2(\text{aq})] \quad (\text{I.4})$$

Das cinco equações necessárias para descrever o sistema, duas são referentes as constantes de dissociação do ácido carbônico, K_1 e K_2 :



$$K_1 = ([\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]) / [\text{H}_2\text{CO}_3^*] \quad (\text{I.6})$$



$$K_2 = ([\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}]) / [\text{HCO}_3^-] \quad (\text{I.8})$$

A terceira equação é dada pelo produto iônico da água, K_w

$$K_w = [\text{H}^+][\text{OH}^-] \quad (\text{I.9})$$

Sendo $[\text{H}^+]$ um parâmetro facilmente mensurável, a última equação necessária para a solução do sistema deve ser desenvolvida a partir de vários valores mensuráveis, definidos em termos das espécies químicas de interesse. Os valores mais frequentemente usados nesse desenvolvimento são os da alcalinidade.

A alcalinidade total é definida como o número de moles de íons hidrogênio requerido para converter um litro de uma solução para um equivalente de solução de ácido carbônico. Geralmente assume-se que a alcalinidade é devida apenas às espécies carbônicas e a alcalinidade de carbonatos é definida como:

$$[\text{Alc}] = 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+] \quad (\text{I.10})$$

Pode-se também obter uma outra equação a partir da concentração total das espécies carbônicas em solução, C_T , definida em termos da expressão do balanço de massa como:

$$C_T = [\text{H}_2\text{CO}_3^*] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] \quad (\text{I.11})$$

Com a formulação dessas equações é possível agora a determinação das espécies H_2CO_3^* , HCO_3^- e CO_3^{2-} em função de dois parâmetros facilmente mensuráveis: o pH e a alcalinidade.

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = (2[\text{Alc}] - [\text{OH}^-] + [\text{H}^+]) / \{ (2K_1K_2/[\text{H}^+]^2) + K_1/[\text{H}^+] \} \quad (\text{I.12})$$

$$[\text{HCO}_3^-] = (2[\text{Alc}] - [\text{OH}^-] + [\text{H}^+]) \{ (2K_2/[\text{H}^+]) + 1 \} \quad (\text{I.13})$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = (2[\text{Alc}] - [\text{OH}^-] + [\text{H}^+]) / (2 + ([\text{H}^+]/K_2)) \quad (\text{I.14})$$

A Figura I.2 ilustra a distribuição de equilíbrio das espécies carbônicas em função do pH num sistema fechado. Os valores de pH das soluções puras de H_2CO_3^* , NaHCO_3 e Na_2CO_3 , correspondem aos pontos de equivalência x, y e z em titulações de alcalinidade e acidez de águas naturais (doce e de mar).

Como esperado, os diagramas para água doce e água de mar são muito similares. Devido ao efeito da força iônica, as constantes do ácido (operacionais) são maiores para água de mar que para água doce; ou seja, os valores de pK e do pH no ponto de equivalência, especialmente no ponto y, são menores para água de mar do que na água doce. A água de mar contém, além do CO_2 dissolvido, o ácido bórico (H_3BO_3) numa concentração total de $4,1 \times 10^{-4}$ M.

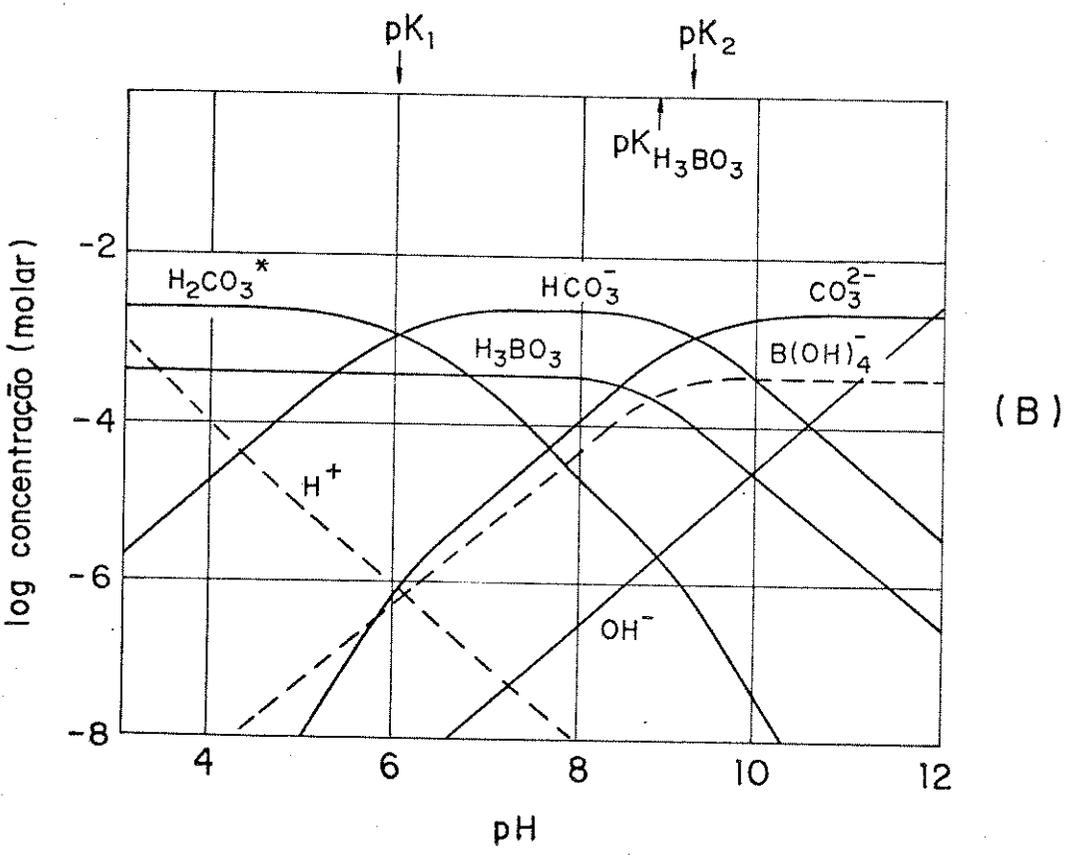
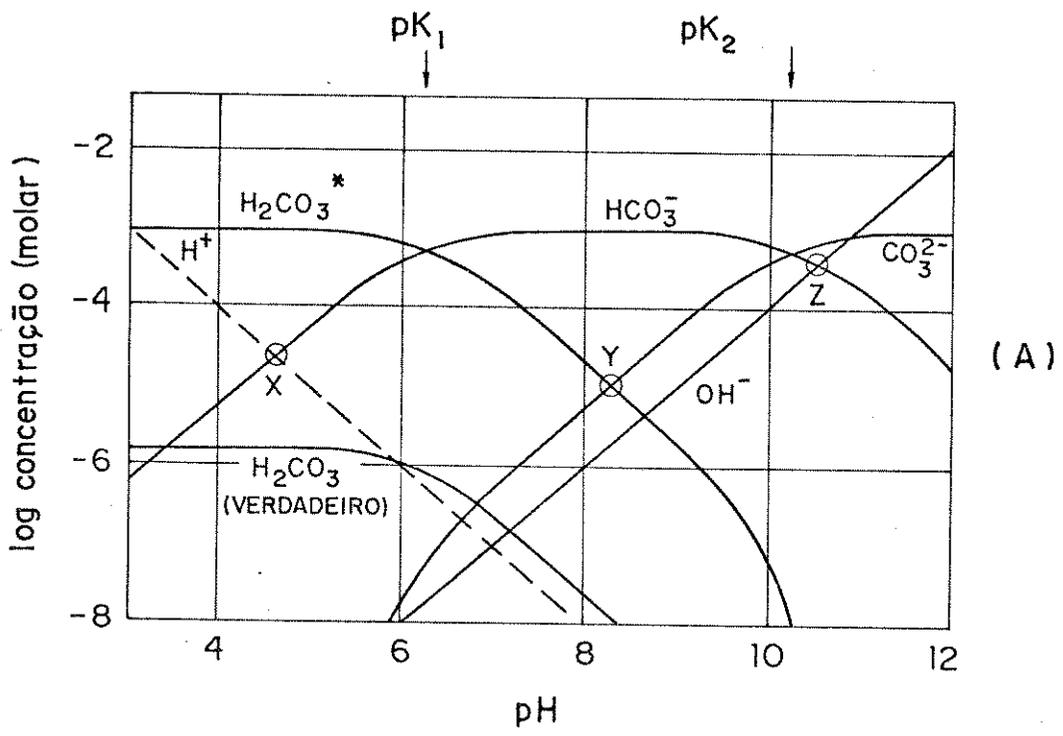


Figura 1.2 - Distribuição das espécies carbônicas em função do pH nos sistemas fechados (a) água doce; (b) água de mar.

Águas naturais não são, porém, sistemas fechados. O modelo idealizado discutido acima é entretanto ainda útil uma vez que, durante uma titulação ácido-base dessas amostras (como na determinação da alcalinidade), pode-se, numa primeira aproximação, considerá-las como um sistema fechado.

I.A.3 - O SISTEMA ABERTO:

Quando se considera um sistema carbônico aberto para a atmosfera, deve-se considerar o equilíbrio do CO_2 entre as duas fases, a líquida e a gasosa. Ou seja, a solubilidade do CO_2 é agora função da pressão parcial do mesmo na atmosfera e do pH da amostra, uma vez que o CO_2 pode reagir com íons OH^- (Stumm e Morgan, 1981).

A concentração (atividade) do CO_2 (ou algum outro gás ou substância volátil) em solução pode ser expressa tanto em termos de unidades de concentração ou em termos da pressão parcial do gás em solução, ou seja, a pressão de CO_2 na fase gasosa com a qual a amostra estaria em equilíbrio. A espécie H_2CO_3^* e a pressão parcial do dióxido de carbono, P_{CO_2} , estão interrelacionados pela lei de Henry (I.15). 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.

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = K_H P_{\text{CO}_2} \quad (\text{I.15})$$

onde K_H é a constante de Henry e

$$P_{\text{CO}_2} = x_{\text{CO}_2} (P_T - P_{\text{H}_2\text{O}}) \quad (\text{I.16})$$

onde x_{CO_2} é a fração molar ou fração de volume em gás seco, P_T é a pressão total e $P_{\text{H}_2\text{O}}$ é a pressão de vapor da água.

Idealmente essas expressões poderiam ser escritas em termos de atividade e fugacidade, e o equilíbrio gás/solução independe da salinidade da solução. Por exemplo, a atividade do $\text{CO}_2(\text{aq})$ é idêntica para a água doce e água de mar, se em equilíbrio com a atmosfera contendo a mesma P_{CO_2} .

Um modelo bem simples mostrando algumas das características do sistema carbônico em águas naturais é dado pelo equilíbrio de água pura com uma fase gasosa (por exemplo, a atmosfera) contendo uma pressão parcial constante de CO_2 . Pode-se então variar o pH por adição de base ou ácido forte, no entanto, mantendo a solução em equilíbrio com P_{CO_2} . Esse modelo simples tem sua reprodução na natureza quando o CO_2 reage com silicatos, argilas, e outros.

A figura I.3 mostra a distribuição das espécies em tal modelo. No equilíbrio, as concentrações das espécies carbônicas individuais podem agora ser expressas em função de P_{CO_2} e do pH.

$$[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = K_H P_{\text{CO}_2} \quad (\text{I.15})$$

$$[\text{HCO}_3^-] = (K_1 / [\text{H}^+]) K_H P_{\text{CO}_2} \quad (\text{I.17})$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = (K_1 K_2 / [\text{H}^+]^2) K_H P_{\text{CO}_2} \quad (\text{I.18})$$

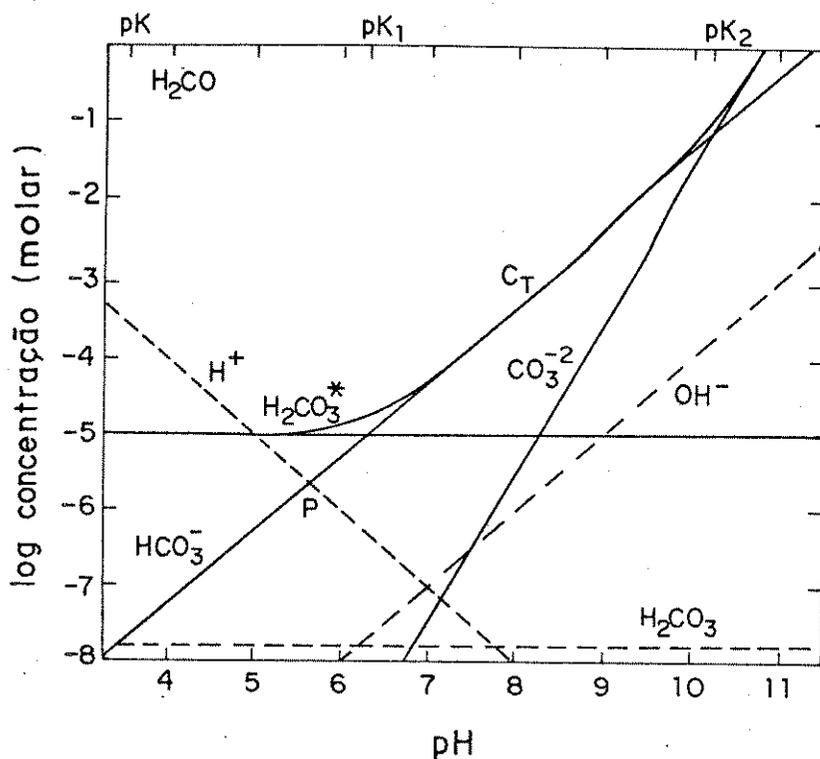


Figura 1.3 - A distribuição das espécies carbônicas em função do pH num sistema aberto ($P_{\text{CO}_2} = 10^{-3,5}$ atm e $T = 25^\circ\text{C}$).

Embora seja um composto vital para a biosfera, a determinação do CO_2 e suas espécies aquosas não é um procedimento analítico trivial. Cabe ressaltar que, analiticamente, as medidas da concentração da espécie H_2CO_3^* quase sempre são inviáveis devido aos níveis nos quais esta ocorre naturalmente. Além do mais, é sabido que grande parte das águas naturais não se encontram em equilíbrio com a atmosfera devido aos processos biológicos já citados. Um resumo dos principais métodos utilizados é apresentado a seguir.

I.B - MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINAÇÃO DE CO_2 :

I.B.1 - VIA ALCALINIDADE:

Via de regra, a alcalinidade total é quase sempre confundida com alcalinidade carbônica devido ao fato desta ser um parâmetro definido operacionalmente. A alcalinidade total é obtida titulando-se um volume conhecido da amostra com um ácido forte (geralmente HCl) até que o pH atinja um valor, como já dito, de uma solução contendo apenas CO_2 e água.

Assumindo-se que não haja nenhum outro protólito presente na amostra, os valores de alcalinidade e pH podem ser usados para se determinar C_T e H_2CO_3^* . Para tal, utiliza-se a equação de Larson e Buswell (1942), a qual é baseada nos trabalhos pioneiros de Tillmans e Heublein (1921) (ver HMSO, 1987):

$$\log[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = \log\text{Alc} + \log f - \text{pH}_t \quad (\text{I.19})$$

onde

Alc = alcalinidade total da amostra (mg/l de CaCO_3).

pH_t = pH da amostra numa temperatura qualquer t ($^\circ\text{C}$).

$[\text{H}_2\text{CO}_3^*]$ = Concentração do dióxido de carbono livre da amostra (mg/l de CO_2).

f = fator que depende da constante de dissociação do H_2CO_3 e, conseqüentemente, da temperatura.

A equação (I.19) pode ser resolvida substituindo o valor tabelado de $f = 0,88/kt$

onde

$$-\log kt = 3404,71/(273 + t) - 14,835 + 0,032786(273 + t) \quad (\text{I.20})$$

Assim, temos que a equação final resulta em:

$$\log[\text{H}_2\text{CO}_3^*] = \log\text{Alc} + [3404,71/(273 + t)] + 0,032786(273 + t) - \text{pH}_t - 15,490 \quad (\text{I.21})$$

Ben-Yaakov e Guterman (1984) determinaram a concentração das espécies do dióxido de carbono livre (H_2CO_3^*) e do total (C_T) usando os valores de alcalinidade e pH nas seguintes equações:

$$P_{CO_2} = A[\alpha \{H^+\}^2 / K_1' s_{CO_2} \{H^+\} + 2K_2'] \quad (I.22)$$

$$C_T = A[\alpha \{ \{H^+\} K_1' + K_1' K_2' + \{H^+\}^2 \} / \{ \{H^+\} K_1' + 2K_1' K_2' \}] \quad (I.23)$$

onde K_1' e K_2' são a primeira e segunda constantes de dissociação aparente do ácido carbônico, s_{CO_2} é a solubilidade do CO_2 e $\{H^+\}$ a atividade do íon hidrogênio.

I.B.2 - POR ARRASTE ANTES E APÓS A ACIDIFICAÇÃO:

Neste caso, um gás inerte de arraste (geralmente nitrogênio) é borbulhado na amostra antes e após a acidificação da mesma para se determinar $[H_2CO_3^*]$ e C_T , respectivamente. O dióxido de carbono evoluido, em ambos procedimentos, é absorvido numa solução de hidróxido de sódio e o excesso de base é titulado com solução ácida padronizada. A faixa de concentração de aplicação do método situa-se entre 0,5 a 50 mg/l de dióxido de carbono como CO_2 (HMSO, 1987).

Um sistema simples e de baixo custo utilizado na determinação do dióxido de carbono total presente em amostras de água de mar, usando pequenos volumes, foi desenvolvido por Roberts e Smith (1988). O método consiste na injeção de 10 a 250 μl de amostra numa coluna acidificada de arraste de gás. O CO_2 liberado é transportado por um gás carregador (N_2) até um analisador infravermelho.

Num trabalho pioneiro neste campo, Swinnerton et alii (1962) determinaram diversos gases dissolvidos em águas naturais utili-

zando a cromatografia gasosa após o arraste das espécies a serem quantificadas. Park et alii (1964) estenderam o método para determinar o dióxido de carbono total em água de mar e compararam seus resultado com o método potenciométrico. Os resultados obtidos pelos dois métodos diferiram em torno de 3%.

Johnson et alii (1987) desenvolveram um instrumento automático para a determinação coulométrica da concentração total do dióxido de carbono (C_T) na qual a amostra era acidificada e o CO_2 evoluído arrastado com gás inerte para um detector coulométrico. A faixa de trabalho do método situou-se entre 19,5 até 1276,1 μM .

I.B.3 - MANOMETRICAMENTE:

Um método para determinação do dióxido de carbono total (C_T) foi desenvolvido para amostras nas quais o recipiente original (selado) é resfriado e em seguida é aberto e tratada com hidróxido de sódio para absorver algum dióxido de carbono livre. Esta solução é acidificada e a pressão é determinada manometricamente. A concentração final do dióxido de carbono da amostra é determinada usando uma curva de calibração. O intervalo de aplicação está entre 0,5 a 6,0 g/l de CO_2 (HMSO, 1987).

Um outro método descrito para a determinação do $H_2CO_3^*$ é aquele no qual o frasco original da amostra é perfurado por uma sonda contendo um manômetro. Atingido o equilíbrio, e tendo-se a temperatura conhecida, a pressão lida é relacionada com a concentração do dióxido de carbono usando-se tabelas prontas ou construindo-se uma curva de calibração. O intervalo de aplicação do

método está entre 2 a 12 g/l de dióxido de carbono (HMSO, 1987).

I.B.4 - ELETRODO ÍON-SELETIVO:

Neste caso, utiliza-se um eletrodo de pH cujo sensor está recoberto por uma membrana sintética. O dióxido de carbono é capaz de permear por essa membrana de um polímero hidrofóbico, resultando na mudança de pH. O sinal obtido no eletrodo de vidro é relacionado diretamente com a concentração de $H_2CO_3^*$ na amostra. Quando a amostra é acidificada a pH abaixo de 5, o valor obtido corresponde à concentração do dióxido de carbono total (C_T). Este método, no entanto, tem seu limite de detecção em torno de 4 mg.l^{-1} de CO_2 , ou seja, $90 \text{ } \mu\text{moles.l}^{-1}$ de CO_2 (HMSO, 1987). Um eletrodo semelhante foi desenvolvido por Ruzicka e Hansen (1974) o qual foi empregado na determinação de CO_2 e NH_3 em sangue e soro.

I.B.5 - OUTROS:

Fukushi e Hiroy (1987) desenvolveram um novo procedimento analítico para a determinação do dióxido de carbono total em água de mar. Um enriquecimento preliminar é feito num capilar tipo isotacoforese com auxílio de uma membrana tubular microporosa de Teflon. O dióxido de carbono é então gerado por adição de ácido sulfúrico através da membrana e dissolvido numa solução de hidróxido de sódio. Este pretratamento visa eliminar a interferência causada por ânions coexistentes tais como cloretos e sulfatos. O

método proposto foi aplicado na determinação de dióxido de carbono total em amostras marinhas coletadas na superfície e em maiores profundidades. As concentrações do dióxido de carbono dissolvido, do bicarbonato e do carbonato nessas amostras foram calculadas a partir da C_T , da temperatura, do pH e das medidas de salinidade da amostra.

A quantificação do dióxido de carbono é muito importante tanto sob o ponto de vista biológico como geoquímico. Com respeito a parte geoquímica, a concentração de CO_2 dissolvido pode controlar, por exemplo, a solubilidade de carbonatos. O dióxido de carbono livre presente em excesso daquele requerido para manter o equilíbrio dos íons bicarbonato e carbonato pode promover a dissolução de carbonatos (gesso e calcário), além de promover a corrosão de tubulações metálicas. A troca de CO_2 na interface líquida/gasosa é um processo crucial no controle da concentração de CO_2 na hidrosfera e na atmosfera. A perda de CO_2 para a atmosfera pode resultar numa insuficiente concentração para sustentar os íons bicarbonato e carbonato solúveis, promovendo assim a precipitação de carbonatos.

Quanto a parte biológica, cabe ressaltar que o CO_2 é o composto fundamental, na natureza, para um mecanismo muito importante que é o da fotossíntese. Nele, organismos autotróficos utilizam o CO_2 , em presença de um doador de elétrons (geralmente a água) e energia luminosa na formação de carboidratos e oxigênio. Por outro lado, compensando este consumo de CO_2 , a respiração microbiana também contribui neste ciclo pela produção de CO_2 via

assimiliação de matéria orgânica.

Como visto, o CO_2 participa ativamente do metabolismo, principalmente como produto da respiração. Assim sendo, ele pode ser utilizado como um parâmetro no monitoramento da atividade metabólica de microorganismos. A seguir, serão apresentados alguns aspectos da utilização do CO_2 no monitoramento de certas atividades biológicas, incluindo testes de toxicidade.

I.C - A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA DO CO_2 :

I.C.1 - RESPIROMETRIA:

Desde o início desse século, biólogos (incluindo aqueles que trabalhavam com tratamento de esgoto) mostraram-se interessados no desenvolvimento de um meio para se avaliar a taxa metabólica de vários microorganismos. A respiração, na qual um alimento é utilizado para produzir energia e conseqüentemente novas células, parecia ser o processo bioquímico celular mais bem controlado. Nesse processo, o oxigênio é consumido com a concomitante produção de dióxido de carbono conforme esquema apresentado na figura I.4.

Os biólogos procuravam observar as mudanças que aconteciam no sistema sob várias condições, e necessitavam de um meio simples e confiável para medir continuamente este sistema. Certamente a mudança física mais fácil de se medir, dada as ferramentas analíticas disponíveis naquela época, era a mudança de pressão causada pela mudança no volume dos gases. Desde que dois gases

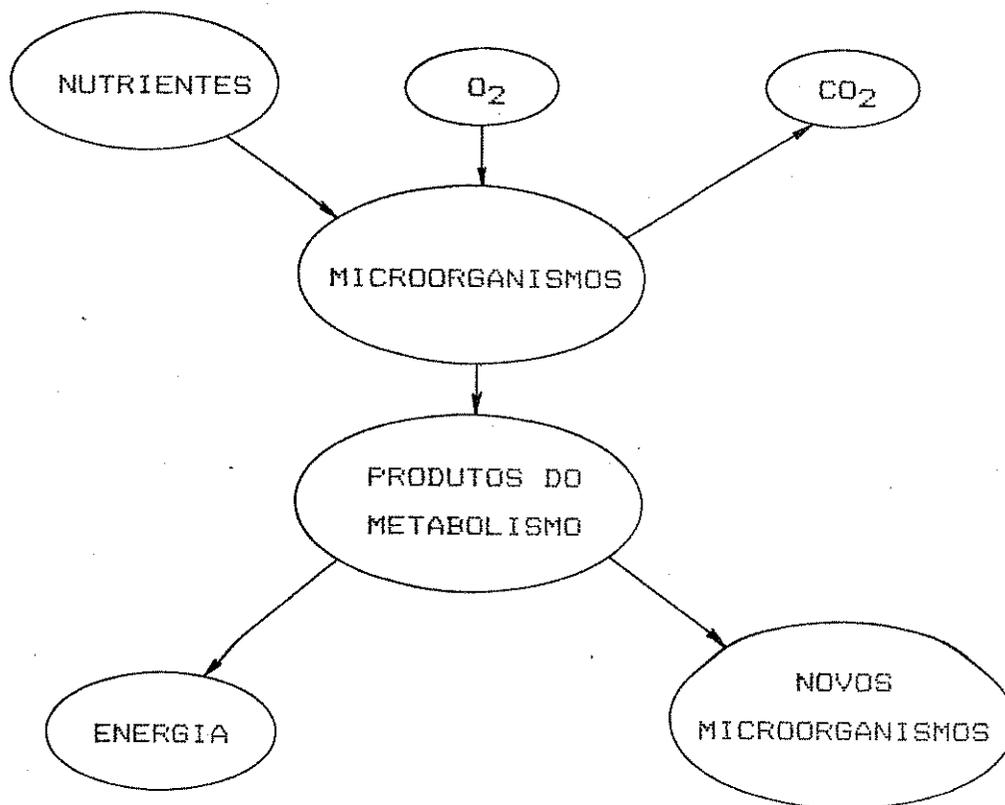


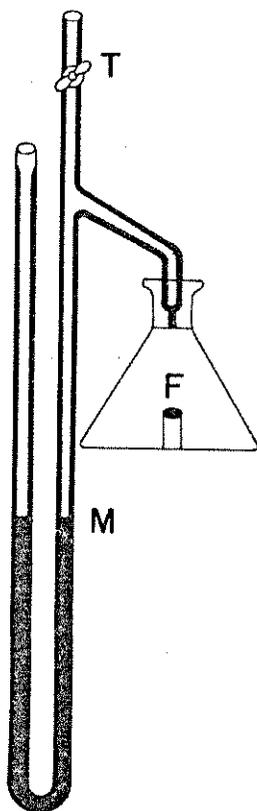
Figura I.4 - O sistema metabólico de certos microorganismos.

estavam envolvidos no metabolismo, era necessário remover um deles para se observar a mudança em volume que poderia ser atribuída ao outro gás.

O respirômetro de Warburg, desenvolvido por Otto Warburg no início do século XX, foi o meio mais utilizado nas medidas da taxa de respiração de microorganismos. Consiste num sistema fechado contendo uma cultura líquida de microorganismos e uma solução de KOH para absorver o dióxido de carbono produzido. O espaço de ar acima do meio de cultura contendo o microorganismo é conectado a um manômetro. Como oxigênio é consumido durante o metabolismo (respiração) e o dióxido de carbono produzido é absorvido, cria-

se vácuo, e as mudanças no nível do óleo nas pernas do manômetro são observadas. A quantidade de oxigênio consumida é proporcional a mudança do nível (figura I.5) (Tech-Line Instruments, 1988).

Embora o respirômetro de Warburg tenha sido muito útil em pesquisas sobre cinética bacteriana, ele não era totalmente adequado para os estudos de amostras de esgoto devido ao seu pequeno volume e sua fragilidade, além disso não acomodava grandes volumes de amostra. A transferência de oxigênio era limitada pois era acompanhada por agitação mecânica do frasco. Além disso, o uso do respirômetro de Warburg foi causando desinteresse pelos usuários pois consumia muito tempo, além do que todos os dados eram obtidos manualmente.



T = válvula de 3 vias.

F = frasco com KOH.

M = manômetro.

Figura I.5 - Respirômetro de Warburg.

Essas limitações levaram ao desenvolvimento de um respirômetro de grande volume, com manômetro automático, no início da década de 1960. O local destinado para a amostra tinha agora uma capacidade que variava de um até quatro litros ou mais; a agitação era feita por uma pequena bomba de ar, a absorção de CO_2 era feita num coletor de gases contendo KOH , e a obtenção dos dados era feita eletronicamente.

O uso de microorganismos em benefício do homem é uma prática muito antiga. Além de serem os principais responsáveis pelo tratamento de esgotos, os microorganismos têm sido usado na fabricação de vinho e em compostagem de solos mais ricos. Recentemente, no novo campo da biotecnologia, eles são utilizados na produção de fármacos, na degradação de óleos e mesmo em minas de cobre, na remoção do metal.

I.C.2 - TESTES DE TOXICIDADE:

Testes de toxicidade são baseados no uso de material vivo para definir a natureza e o grau de efeitos nocivos produzido por um simples agente tóxico ou por uma mistura de agentes tóxicos. Nesse tipo de ensaio, certos organismos selecionados são usualmente expostos a um potencial contaminante por um certo período de tempo. Procura-se assim determinar o LC_{50} (concentração letal), a qual é a concentração da substância tóxica que causa a morte de 50% dos organismos expostos num determinado tempo. Os testes de toxicidade também podem ser feitos para se determinar EC_{50} (concentração efetiva) a qual difere de LC_{50} por permitir

que se avalie inumeros parâmetros tais como a imobilidade, a taxa de respiração, a alimentação, a contagem de células do sangue, as taxas de reprodução e de crescimento, dentre outros.

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos têm sido usado já há muitos anos no gerenciamento de águas naturais e no controle de águas poluídas. Atualmente, existe uma pressão da comunidade científica para seu uso no registro de novos produtos químicos, independentemente da sua finalidade. O resultado tem sido a proliferação de um grande número de testes de toxicidade, e com isso, a necessidade de padronização dos testes para objetivos específicos.

Os organismos comumente utilizados em testes de toxicidade são algumas espécies de peixes, camarões (HMSO, 1983; McKee, 1980), moluscos, insetos (McKee, 1980), anfípodos (Swartz et alii, 1984; Swartz et alii, 1985a; Swartz et alii 1985b; Mearns et alii, 1986), poliquetas (Pamatmat, 1982), plânctons (Munawar e Munawar, 1987; Walsh e Merril, 1984; Turbak et alii, 1986) e bactérias (Simpson e Kobos, 1977; Karube et alii, 1979; Dutka et alii, 1983; Greene et alii, 1985; Bitton e Dutka, 1986; Dutka et alii, 1988; Dutka et alii, 1983).

Os testes de toxicidade são categorizados por subdivisões baseadas 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.

A toxicidade aguda de uma substância num ambiente aquático é normalmente expressa como a concentração da substância na água a

qual produz um efeito nocivo em 50% dos organismos num curto período de exposição.

Toxicidade crônica é aquela resultante da exposição por um período de tempo muito longo, pelo menos algumas semanas de duração, geralmente numa significativa proporção do tempo de vida do organismo.

As bactérias estão envolvidas primariamente na mineralização de substratos orgânicos e na reciclagem de nutrientes minerais. Suas atividades são essenciais no processo de autopurificação nos ambientes aquáticos. Elas tem um ciclo de vida relativamente curto e respondem rapidamente à mudanças no meio ambiente.

Dentre os testes de toxicidade nos quais são utilizadas bactérias como organismo teste, o Microtox tem sido o mais empregado. Este teste foi desenvolvido pela Beckman Instruments Inc. (1978) para avaliar a toxicidade aguda em amostras aquáticas. O teste é baseado na medida da atividade da bactéria marinha bioluminescente *Photobacterium phosphorum*, a qual emite luz sob condições metabólicas normais. Alguma estimulação ou inibição do metabolismo afetam a intensidade da luz. Medindo-se a diferença desta de intensidade de luz no controle e nas amostras tratadas com substâncias tóxicas, pode-se determinar o valor de EC_{50} , que é a concentração da substância tóxica que causa a redução da emissão de luz em 50% (Bitton e Dutka, 1986).

Finalmente, os teste de toxicidade fornecem informações sobre os diversos efeitos de agentes tóxicos sobre o ecossistema natural ou modificado pelo homem. Conseqüentemente, pode-se, através dos resultados desses ensaios, realizar um controle maior

de efluentes, de resíduos industriais e compatibilizar seus destinos finais com características desejáveis do corpo receptor de forma que não se coloque em risco a saúde humana (Goldstein, 1988).

I.C.3 - SEDIMENTOS:

Os sedimentos de corpos d'água próximos à áreas densamente povoadas vêm se tornando cada vez mais poluídos como resultado do aumento na atividade municipal e industrial, resultantes do crescimento populacional. Canais de navegação e portos recebem uma grande variedade de lixo municipal e industrial devido à sua localização próxima a grandes centros urbanos. Grande parte deste lixo tem seu destino final nos sedimentos, e frequentemente correm o risco de serem resuspendidos durante a dragagem de canais de navegação e ampliação de portos (Rochon, 1985).

Dentre os compostos orgânicos e inorgânicos, de origens naturais ou antropogênicas, que vêm sendo lançados em corpos d'água, os metais requerem uma atenção especial devido ao seu alto potencial tóxico e sua persistência no ambiente (Jardim, 1983). Existem várias formas de compostos nas quais os metais podem estar presentes no sedimento. Estas formas físicas e químicas são aquelas que irão determinar o equilíbrio de partição do metal na interface água/sedimento.

Os principais fatores para que compostos orgânicos, inorgânicos e principalmente metais sejam liberados do sedimento para a coluna d'água são o pH, o potencial de oxidação-redução (poten-

cial redox ou Eh) e a salinidade.

Estudos de substâncias tóxicas presentes em sedimentos têm mostrado que um contaminante raramente existe isoladamente. Combinações de contaminantes, com efeitos sinérgicos ou antagônicos, provocam reações únicas no comportamento dos organismos nesse meio, dependendo da susceptibilidade ou tolerância do organismo aquático. Infelizmente, os procedimentos utilizados usualmente são para quantificar contaminantes separadamente. Usando testes de toxicidade, pode ser possível determinar o impacto mais geral dos sedimentos sobre os organismos aquáticos, computando-se assim efeitos sinérgicos bem como antagônicos.

As características físicas do sedimento são definidas de acordo com o tamanho e tipo das partículas que os compõem. Partículas pequenas podem adsorver mais metais do que as partículas grandes devido a sua maior área superficial. Também essas partículas possuem uma maior probabilidade de serem ingeridas por organismos bênticos.

A água intersticial do sedimento é a porção da solução que está em contato direto com o sedimento. Nessa interface ocorre um equilíbrio entre os compostos orgânicos e inorgânicos e o sedimento. O estudo dessa solução é fundamental para uma melhor compreensão da química dos sedimentos, além de elucidar qual, ou quais das frações das substâncias (orgânica e/ou inorgânica) que migram do sedimento para a coluna d'água são tóxicas.

O desenvolvimento de testes com a água intersticial dos sedimentos, também chamadas de eluriato, foi um dos mais significantes avanços na determinação do efeito do potencial tóxico de

sedimentos. Os testes dão informação sobre contaminantes que podem, num curto período de tempo, ser lixiviados do sedimento durante uma dragagem, ou seja, quando ressuspensos. O método foi desenvolvido pelo Corpo de Engenharia do Exército e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (EPA, 1977) após demonstrarem que a análise química direta do sedimento não mostrava claramente o potencial de impacto do sedimento ressuspensado (Forstner e Solomons, 1980; International Joint Commission, 1982; Prater e Hoke, 1980).

Recentemente, Munawar e Munawar (1987) utilizaram esse método, com modificações, em testes de toxicidade utilizando plânctons como organismos teste. O ensaio consiste em se agitar uma parte de sedimento com 4 partes de água do local de dragagem por trinta minutos. Após a decantação por uma hora, filtra-se o sobrenadante numa membrana de 0,45 μm . A figura I.6 mostra o esquema completo de procedimento.

Os testes com a água intersticial (eluriato) são importantes para se avaliar opções sobre a disposição final do sedimento sem aumentar substancialmente os efeitos tóxicos na coluna d'água. Se a sobrevivência dos organismos testes no eluriato é a mesma, ou melhor do que aquela do corpo aquático receptor, então considera-se que a disposição do sedimento não tem nenhum efeito tóxico para a biota.

Finalmente, a utilidade e a necessidade de testes tanto de toxicidade como de tratabilidade em sedimentos é muito importante para uma avaliação do potencial tóxico desses. Os sedimentos são os maiores depósitos de contaminantes aquáticos, os quais podem

ser tóxico para organismos vivos que ali residem, tal como os bênticos. Podem também ser liberados de volta para a coluna d'água afetando organismos tais como os peixes. Testes de toxicidade com sedimentos fornecem também informações adicionais sobre a toxicidade de sedimentos contaminados que não podem ser obtidas apenas por análises químicas nem por um estudo limnológico de diversidade de espécies.

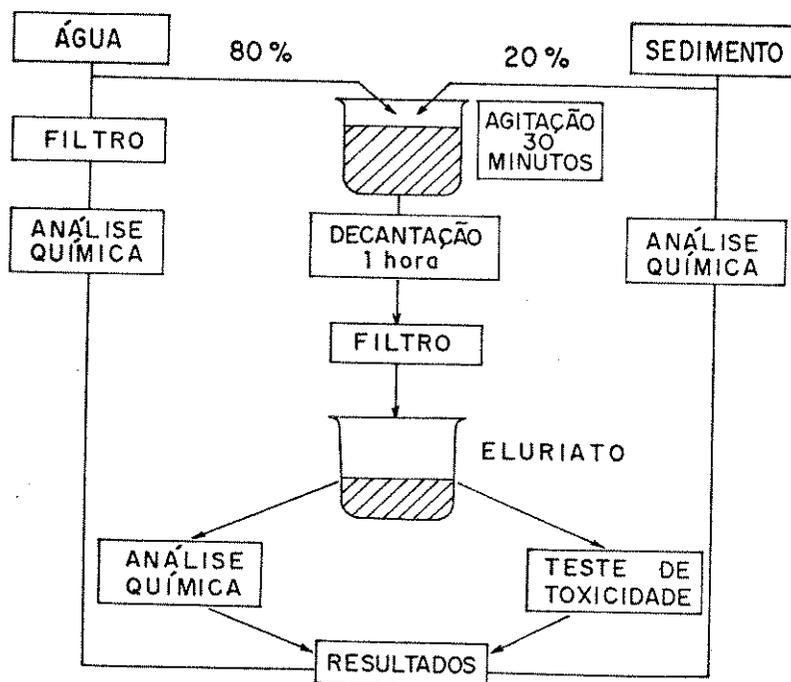


Figura 1.6 - Procedimento para obtenção do eluriato, proposto por Munawar e Munawar (1987).

I.D - METAS DO TRABALHO:

A principal meta deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema FIA (do inglês Flow Injection Analysis) para a determinação da concentração do dióxido de carbono (CO_2) em amostras de águas naturais. O princípio do método baseia-se na difusão do CO_2 por uma membrana semi-permeável e posterior detecção condutométrica.

Uma vez desenvolvido este sistema rápido e sensível para determinação do CO_2 , foi então investigada a sua possível aplicação em teste de toxicidade aguda. Estes ensaios foram realizados monitorando-se a inibição do processo de respiração da bactéria *Escherichia coli*, em meio de cultura aquoso, quando na presença de substâncias potencialmente tóxicas. Dentre estas, foram testados alguns tipos de sedimentos, os metais cobre, cádmio, níquel e mercúrio, além de efluentes industriais, e o lodo da estação de tratamento eletrolítico de esgoto hospitalar.

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade foram expressos na forma de EC_{50} (concentração da substância testada a qual inibe 50% da taxa de respiração referente ao controle, num tempo qualquer pré-determinado) e comparados com outros tipos de testes de toxicidade aguda descritos na literatura.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

II.A - REAGENTES E SOLUÇÕES:

II.A.1 - TAMPÕES DE pH:

- Ftalato:

concentração: 0,05 M $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$ (Merck).

pH: 4,008 (25°C).

- Fosfato:

concentração: 0,025 M KH_2PO_4 (Merck) e

0,025 M Na_2HPO_4 (Queel).

pH: 6,865 (25°C).

Os tampões foram preparados de acordo com o procedimento do US National Bureau of Standarts (NBS).

II.A.2 - SOLUÇÕES ESTOQUE UTILIZADAS:

- Cloreto de Cádmio, $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), na concentração de $3,5 \times 10^{-2}$ M, não padronizada.

- Nitrato de Cádmio, $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec), na concentração de $9,5 \times 10^{-3}$ M, não padronizada.

- Cloreto de Níquel, $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), na concentração de $5,0 \times 10^{-2}$ M, não padronizada.

- Cloreto de Mercúrio, HgCl_2 (Químibras), na concentração de $1,0 \times 10^{-5}$ M, não padronizada.
- Sulfato Cúprico, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Química Moderna), na concentração de $1,6 \times 10^{-3}$ M, não padronizada.
- Cloreto de Cetiltrimetilamônio, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{Cl}$ (Vectec), na concentração de $3,0 \times 10^{-3}$ M.
- Carbonato de Sódio, Na_2CO_3 (Fisher), na concentração de $1,0 \times 10^{-1}$ M, padrão primário.
- Acido Sulfúrico, H_2SO_4 (Merck), concentração aproximada de $2,0 \times 10^{-1}$ M.
- Hidróxido de Sódio, NaOH (Merck), concentração aproximada de 4,0 M.

II.A.3 - OUTROS REAGENTES:

- Hidrogeno Fosfato de Potássio, K_2HPO_4 (Merck).
- Dihidrogeno Fosfato de Potássio, KH_2PO_4 (Carlo Erba).
- Cloreto de Sódio, NaCl (Synth).
- Sulfato de Amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Ecibra).

- Sulfato de Magnésio, $MgSO_4$ (Fisher).
- Acido Cítrico, $HO_2CCH_2C(OH)(CO_2H)CH_2CO_2H$, (Merck).
- D(+)-Glucose Anidra P.A. (Dextrose), $C_6H_{12}O_6$ (Vetec).
- Nitrato de Sódio, $NaNO_3$ (Ecibra).

II.A.4 - AMOSTRAS:

- Sedimentos:

Os sedimentos foram coletados de camadas superficiais dos lagos ou rios (5 cm) e homogenizados usando uma peneira de nylon de 0,5 mm e estocados em geladeria a 4°C em presença de sua água intersticial.

- Efluentes industriais:

Foram coletadas amostras do efluente líquido de uma indústria química de defensivos agrícola. Esse efluente continha o composto cloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-dipiridilo, conhecido comercialmente como PARAQUAT. O efluente sofreu um pretratamento para a remoção de cianeto. Essa remoção foi feita ajustando-se o pH da amostra em 3,0 pela adição de HCl 4 M e sob agitação magnética por 15 minutos. Em seguida, o pH foi ajustado novamente ao seu valor original (6,54) com NaOH 4 M.

Um outro tipo de efluente contendo óleos e graxas e oriundo do processo de usinagem foi coletado em uma indústria metalúrgica.

- Lodo de esgoto sanitário (doméstico):

A coleta do lodo foi realizada na estação de tratamento eletrolítico do esgoto do Hospital das Clínicas da UNICAMP, após 24 horas de decantação. Esse lodo foi previamente esterilizado numa autoclave (120°C por 30 minutos) antes do ensaio, uma vez que esse material possuía microorganismos patogênicos.

- Antibiótico:

O antibiótico Bactrin (Roche) foi adquirido comercialmente. Este antibiótico é uma mistura contendo 16,7% de 2,4-diamina-5-(3,4,5,-trimetoxibenzil)-pirimidina e 83,3% de 5-metil-sulfanilamida-isoxal.

- Águas:

As amostras de água doce foram coletadas no Rio Atibaia no distrito de Sousas (município de Campinas-S.P.). Essas amostras foram analisadas imediatamente após a sua coleta.

As águas de origem marinha foram coletadas na cidade de São Sebastião (S.P.). Elas foram armazenadas a -18°C e descongeladas imediatamente antes de serem submetidas a análise.

Também foram utilizadas amostras de água mineral para consumo humano. As amostras em seu recipiente original (garrafa ou copo) foram analisadas imediatamente após o rompimento do lacre.

Todas as amostras foram armazenadas em frascos de polietileno para minimizar a possível retenção de metais na parede do frasco. Estes frascos foram previamente mantidos em solução de HNO_3 10% durante 24 horas para evitar a contaminação por metais, e posteriormente lavados com água destilada. As amostras de sedimento, de efluente e de lodo foram mantidas resfriadas à 4°C, em geladeira.

II.B - EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS:

II.B.1 - SISTEMA DE INJEÇÃO EM FLUXO:

- Bomba Peristáltica ISMATEC, modelo IPS-12.
- Condutivímetro DIGIMED, modelo CD-20.
- Registrador ECB, modelo RB-201.
- Comutador.
- Cella de condutividade.
- Cella de difusão.

II.B.2 - POTENCIOMETRIA:

- Potenciômetro DIGIMED, modelo DMPH-3.
- Eletrodo combinado de pH ROSS ORION, modelo 81-04.
- Eletrodo de referência (dupla junção) ANALION, modelo R6B4 E762.
- Eletrodo seletivo de Cd(II) ORION, modelo 94-48.
- Eletrodo seletivo de Cu(II) ORION, modelo 94-29.

II.B.3 - BANHO TERMOSTÁTICO:

- Banho Maria FANEM, modelo 100.

II.B.4 - PIPETAS E BURETAS:

- Pipeta (200 - 1000 μ l) PIPETMAN GILSON, modelo P 1000.
- Pipeta (10 - 100 μ l) EPPENDORF, modelo M 4710.
- Micro bureta (2 ml) GILMONT, modelo S-1200 A.

II.C - ORGANISMO TESTE:

A bactérias *Escherichia coli* foram cedidas pelo Instituto de Biologia e Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP (originalmente obtido da coleção do Instituto Pasteur, França (54.8T)). Esta bactéria foi escolhida como organismo teste devido ao alto rendimento de síntese (pode duplicar a sua população em 30 minutos), além de ser bastante utilizada por outros laboratórios com o mesmo fim (Durand e Favard, 1972).

II.D - DETERMINAÇÃO DO DIÓXIDO DE CARBONO TOTAL PELO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO CONTÍNUO:

O procedimento experimental utilizado na determinação de CO_2 foi baseado no trabalho de Pasquini e Faria (1987), com algumas modificações. O esquema de funcionamento do sistema FIA condutométrico é mostrado na figura II.1.

Neste procedimento, um volume determinado da amostra (300 μl) contendo as espécies carbônicas (CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-}) é injetado num fluxo carregador (água deionizada) o qual conflui com outro fluxo de ácido sulfúrico diluído (0,2 M). O meio ácido favorece o equilíbrio no sentido da formação do CO_2 (equação II.1).

O gás formado (CO_2), no meio ácido, ao passar pela cela de difusão, permeia por uma membrana de Teflon e atinge um fluxo de água deionizada, deslocando o equilíbrio para a formação dos íons bicarbonato e carbonato. A condutividade deste fluido que vinha sendo monitorado constantemente, é então alterada devido ao CO_2

presente na amostra (Faria, 1987; Campos, 1988). A mudança na condutância é proporcional a concentração total de CO_2 presente na amostra.

II.D.1 - PADRÕES DE CARBONATO:

Os padrões para CO_2 foram obtidos a partir da diluição de uma solução estoque de Na_2CO_3 ($1,0 \times 10^{-1}$ M). O carbonato de sódio foi previamente aquecido a 270°C por 1 hora. Em seguida, colocado num dessecador para resfriar até a temperatura ambiente. Pesou-se uma quantidade suficiente do sal para a concentração desejada e diluiu-se com água destilada, deionizada e degaseificada em balão volumétrico previamente calibrado.

A solução foi transferida para um frasco de polietileno e fechado imediatamente, para evitar absorção do CO_2 do ar. A retirada de aliquotas para preparação de padrões foi feita sem o contato com o ar.

A figura II.2 mostra os sinais de calibração típicos obtidos pela metodologia proposta numa faixa de concentração de 5 até 1000 μM . As determinações das concentrações de CO_2 em amostras desconhecidas foram feitas por interpolação gráfica.

CONDUTÂNCIA, UNIDADES ARBITRÁRIAS

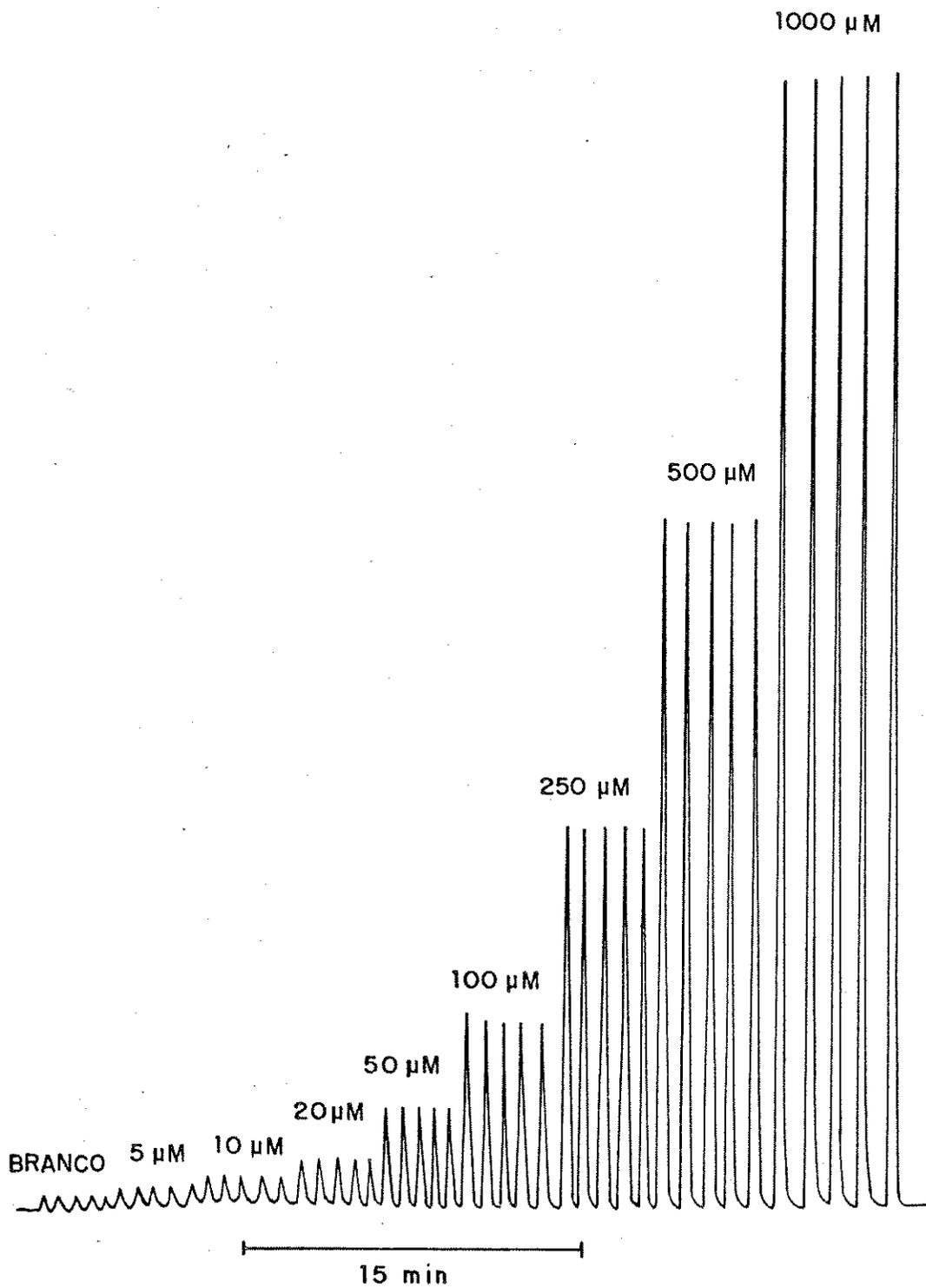


Figura II.2 - Sinais de calibração típicos do sistema FIA para CO_2 .

Uma curva de calibração típica encontra-se na figura II.3. Na faixa de concentração entre 100 e 2000 μM , a equação que melhor descreve a curva é $Y = AX^B$, onde Y é a altura do sinal, X é a concentração do CO_2 (μM), A e B são parâmetros ajustáveis. Os coeficientes de correlação das várias curvas de calibração foram 0,9990 ou melhores.

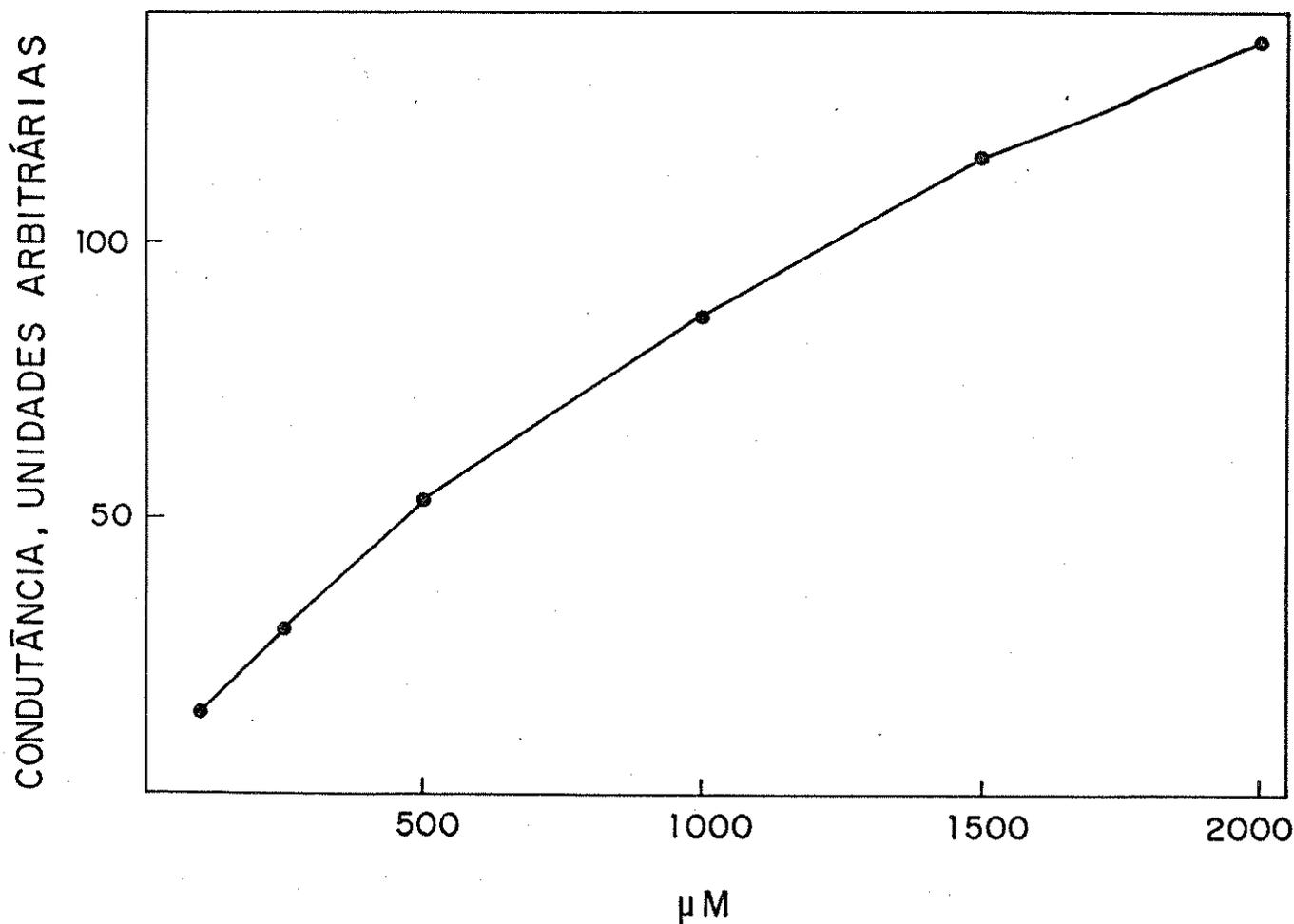


Figura II.3 - Curva de calibração típica do sistema FIA na faixa de concentração do CO_2 entre 100 e 2000 μM .

II.E - TESTE DE TOXICIDADE:

II.E.1 - MEIO DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE BACTERIAS:

O meio de cultura para a bactéria *E. coli* foi preparado pela adição de 1,6 g de K_2HPO_4 , 1,6 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de NaCl, 4,0 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,7 g de $MgSO_4$ e 0,3 g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada (Dorward e Barisas, 1984). O pH final foi ajustado em 7,00 usando uma solução de NaOH 4 M. O meio de cultura foi colocado num forno de microondas, levado até a fervura e fechado com tampão de algodão. Após o resfriamento até aproximadamente 90°C, 2,5 g de glucose foram adicionados na solução e deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente.

II.E.2 - PROCEDIMENTO DO TESTE DE TOXICIDADE:

O meio de cultura (1 litro) era contaminado com *E. Coli* (imobilizado em agar) e deixado à temperatura ambiente até que a suspensão bacteriana começasse a turvar. Em seguida, colocava-se num banho de água à 37°C e fazia-se um monitoramento do CO_2 até que sua concentração atingisse 0,5 mM de CO_2 . Cuidadosamente, alíquotas de 100 ml eram transferidas da solução estoque (suspensão de bactéria) para Erlenmeyers de 150 ml, também mantidos no banho a 37°C. A cultura era então contaminada com agente tóxico. O frasco que não recebia nenhuma adição atuava como controle. Um meio de cultura sem bactéria atuava como prova em branco. O monitoramento de CO_2 era feito a cada 15 ou 20 minutos da seguinte

maneira. Primeiramente injetava-se o controle. Em seguida as culturas contaminadas e finalmente o branco. Após a determinação do CO_2 nesta série de frascos, o controle era novamente injetado. A concentração de CO_2 nos diversos frascos era obtida por interpolação na curva de calibração. A estimativa do desvio padrão obtida para 5 replicas de um meio de cultura contendo bactérias foi de 4,17%, para uma concentração de CO_2 de $480 \mu\text{M}$ e 4,12% para uma solução $1940 \mu\text{M}$ de CO_2 .

II.F - ESPECIAÇÃO DE CÁDMIO NO MEIO DE CULTURA:

A especificação de cádmio no meio de cultura foi feita utilizando-se um eletrodo seletivo. Para obter a curva de calibração, adições sucessivas da solução estoque de Cd(II) foram feitas numa solução de NaNO_3 0,5 M em béqueres de polietileno de 100 ml.

Na figura II.4 é mostrada uma curva de calibração típica, onde é lançado potencial (mV) lido em função do $\log a_{\text{Cd}}$. A curva (a) é obtida diretamente pelos dados fornecido pelo aparelho sem nenhuma correção nos valores da concentração de cádmio. A segunda curva (b) é obtida após um ajuste da primeira. Esse ajuste é feito levando-se em consideração a concentração basal (ou seja, a contaminação) de cádmio na solução 0,5 M de NaNO_3 . Esse procedimento é similar ao procedimento da adição padrão e a reta corrigida ($y = Ax + B$) apresentou os seguintes parâmetros estatísticos: $R = 0,9999$, $A = 30,593$, $B = -179,671$).

Para o meio de cultura, o procedimento utilizado foi mesmo. Adicionou-se o eletrólito suporte (NaNO_3) em quantidade suficien-

te para que a força iônica final fosse 0,5 M. Em seguida, fez-se as adições de Cd(II) similares aquelas utilizadas nos bioensaios. Os potenciais obtidos (mV) foram interpolados na curva de calibração. Para o cobre seguiu-se o mesmo procedimento.

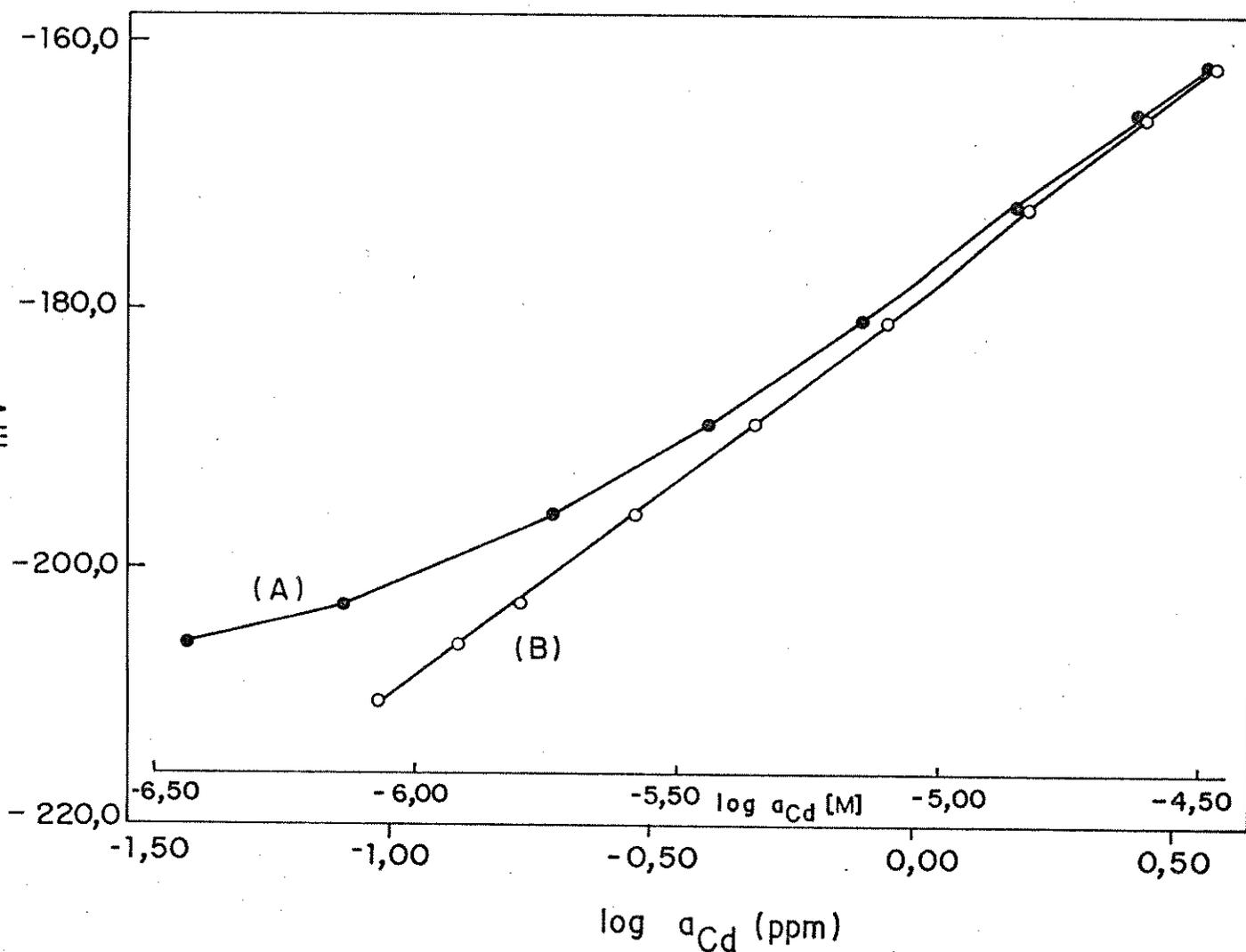


Figura II.4 - Curva de calibração para Cd(II), onde é mostrado a curva sem nenhuma correção nos valores da concentração de cádmio (A) e após uma correção (B).

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.A - DETERMINAÇÃO DO CO₂ POR FIA:

Não obstante a variedade de técnicas analíticas disponíveis, a quantificação de dióxido de carbono total em águas naturais ainda é um procedimento complexo. Técnicas sensíveis tais como a cromatografia gasosa encontram problemas sérios, uma vez que demandam a remoção do gás, alterando assim o equilíbrio natural. Na cromatografia de íons, dois fatores devem ser observados: o custo operacional e a possível presença de interferentes.

Na determinação da espécie H₂CO₃^{*}, as técnicas analíticas baseadas no arraste com gás inerte ou o ar livre de dióxido de carbono, fornecem resultados precisos quando aplicados em águas onde sais de ácido carbônico estão ausentes. No entanto, na presença desses sais, o equilíbrio é deslocado, resultando assim numa perda de dióxido de carbono livre, afetando o equilíbrio das outras espécies presentes e os resultados podem não ser confiáveis.

Rotineiramente, utiliza-se a titulação potenciométrica na determinação da alcalinidade da amostra. Com ajuda do valor do pH medido inicialmente, infere-se o valor das concentrações do dióxido de carbono livre e total. Entretanto, por esse procedimento, pode-se titular outros protólitos presentes na amostra que não as espécies carbônicas. A matéria orgânica dissolvida, bem como íons borato podem, por exemplo, contribuir para este parâmetro.

Motomizu et alii (1987) desenvolveram um sistema para determinação da concentração total do dióxido de carbono (C_T) utilizando o princípio da difusão do gás através de membrana juntamen-

te com o sistema FIA. Os resultados encontrados foram concordantes com aqueles encontrados por cromatografia de íons. A faixa de concentração encontrada para água de rio foi de $4,6 \times 10^{-4}$ M até $10,0 \times 10^{-4}$ M.

Recentemente, Bradshaw e Brewer (1988a) apontaram o esforço que vem sendo feito para elucidar a química do dióxido de carbono em águas marinhas. Os autores comentam que, mesmo em trabalhos recentes, existem diferenças entre os resultados obtidos na determinação da concentração do dióxido de carbono por titulação potenciométrica e manométricamente. Como estas diferenças se acentuam em função da profundidade, é provável que isto se deva a erros sistemáticos e não aleatórios.

Bradshaw e Brewer (1988b) desenvolveram um sistema automático para a determinação da alcalinidade e da concentração de dióxido de carbono total (C_T) em água de mar por titulação potenciométrica e compararam com os resultados obtidos por este método com aqueles obtidos pela determinação coulométrica. As concentrações encontradas situaram-se em torno de $2000 \mu\text{molCO}_2/\text{kg}$. Foi utilizado um método computacional para detectar o ponto final da titulação, o qual levava em consideração alguns protólitos além daqueles do sistema ácido carbônico. Os resultados obtidos via alcalinidade foram sempre maiores (aproximadamente $21 \mu\text{molCO}_2/\text{kg}$) do que aqueles obtidos pela determinação coulométrica. Segundo os autores, isso pode ser devido a presença de protólitos não conhecidos, tais como ácidos orgânicos. Esses compostos, embora não afetem a alcalinidade, contribuem para a quantificação do CO_2 total.

No presente trabalho foi utilizada a Análise por Injeção em Fluxo, FIA. O FIA é definido como um processo analítico automático ou semiautomático, tendo como fundamento a inserção sequencial de um volume conhecido da amostra em um fluido carregador não segmentado, o qual está sendo monitorado continuamente por um sensor, onde a espécie química de interesse é detectada. Este procedimento pode ser empregado utilizando-se diferentes detectores analíticos tais como o espectrofotômetro, o potenciômetro, o condutivímetro entre outros, de acordo com a natureza do composto ou elemento a ser determinado (Faria, 1987; Stewart, 1981).

Os sistemas FIA, em geral, são simples e de fácil construção. Esses sistemas ocupam um lugar de destaque dentro da química analítica por apresentarem alta velocidade analítica, grande versatilidade, baixo consumo de amostras e reagentes, baixo custo operacional, além de apresentarem precisão e exatidão comparáveis às dos métodos convencionais (Faria, 1987; Pasquini et alii, 1988).

III.A.1 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS PELO SISTEMA FIA COM AQUELES OBTIDOS POR TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

A alcalinidade é definida como o número de moles de íons hidrogênio requerido para converter um litro de uma solução em um equivalente de solução de ácido carbônico (Loewenthal e Marais, 1976). Como já mencionado, é um parâmetro importante no cálculo de C_T .

A fim de se comparar os resultados obtidos por FIA, foram feitas titulações de amostras de águas naturais, com HCl diluído, para determinação da alcalinidade e, conseqüentemente, a concentração de C_T . Os resultados estão na tabela III.1.

A determinação do ponto final da titulação foi obtido através do método de Gran (1952), e a C_T foi calculada utilizando-se a equação (I.23).

$$C_T = \text{Alc} \left\{ \frac{[H^+]K_1 + K_1K_2 + [H^+]^2}{[H^+]K_1 + 2K_1K_2} \right\} \quad (\text{I.23})$$

Tabela III.1 - Comparação entre os resultados obtidos pelos dois métodos utilizados na determinação de C_T . *

Amostra	pH	C_T (FIA) (μM)	C_T (Pot.) (μM)
água Prata	7,69	2460 \pm 30	2500 \pm 61
água de mar	7,67	1930 \pm 23	1870 \pm 50
Rio Atibaia	7,46	420 \pm 5	440 \pm 5

* média \pm estimativa do desvio padrão de triplicatas.

Conforme já mencionado, valores de C_T e de alcalinidade podem não ser idênticos dependendo da matriz em questão. Para águas ricas em matéria orgânica dissolvida, os valores de alcalinidade podem ser maiores do que aqueles obtidos pelo método FIA. Analiticamente falando, a alcalinidade é operacionalmente a Capacidade de Neutralização de Ácidos (CNA) e este resultado apenas será coincidente com C_T se a amostra apresentar apenas alcalinidade carbônica.

Assim, embora os resultados obtidos na tabela III.1 sejam bastantes coincidentes, eles não devem ser encarados como uma comparação estatística de dados pareados, mas sim sob o ângulo crítico de que as amostras analisadas apresentam poucos protólitos que não as espécies carbônicas.

III.A.2 - PRECISÃO:

A estimativa do desvio padrão relativo das medidas obtidas na determinação de C_T em uma solução 1000 μM de CO_2 foi de 1,20% ($n = 23$). A técnica analítica usada mostrou-se muito sensível uma vez que o limite de detecção foi de 3 μM de CO_2 , calculado de acordo com Long e Winefordner (1983) a uma frequência analítica de 60 amostras/hora, como pode ser visto na figura II.2 (sinais de calibração típicos do sistema FIA).

III.B - APLICAÇÃO DO MÉTODO EM TESTES DE TOXICIDADE AGUDA:

Os testes de toxicidade são uma ferramenta indispensável para a caracterização do potencial tóxico de várias substâncias, incluindo sedimentos e resíduos sólidos. Embora a toxidez possa ser avaliada pelo monitoramento de qualquer ciclo bioquímico tal como a variação da quantidade de ATP (adenosina-5'-trifosfato) ou ou mesmo do DNA (ácido desoxirribonucleico), a inibição de algumas funções microbianas vitais são geralmente parâmetros mais simples de serem medidos. A respiração, por exemplo, é um parâmetro confiável para se monitorar a toxidez aguda em microorganismos (Jardim, 1983).

A produção de CO_2 pela bactéria é resultado de uma série de reações bioquímicas. A inibição ou estimulação de qualquer um destes passos altera a concentração de CO_2 produzido.

Inibidores podem atuar em vários pontos no processo de respiração. Dentre eles pode-se citar o bloqueamento de absorção de substrato, a competição pelos sítios de ligação, interferindo na atividade de transporte através da membrana das células, e diretamente, pela inibição das enzimas envolvidas na oxidação, dehidrogenação e fosforilação oxidativa (Dutka e Bitton, 1986).

O método utilizado neste trabalho usa a bactéria *Escherichia Coli* como o organismo teste. Essa espécie é de fácil cultivo em laboratório, mostra uma alta produção de CO_2 e é largamente utilizada em bioensaios (Finch et alii, 1988; Bitton e Dutka, 1986). O CO_2 produzido pelas bactérias fica retido no meio de cultura podendo então ser determinado pelo sistema de Análise por Injeção

em Fluxo. Uma pequena inibição ou estimulação na respiração bacteriana pode ser detectada num período relativamente curto.

Assim, foram feitos testes de toxicidade agudo utilizando a bactéria *E. coli* como organismo teste frente a uma série de agentes possivelmente tóxico, tais como os metais cádmio, cobre e mercúrio, bem como para um tipo de antibiótico e um sedimento. Além disso, na tentativa de uma possível comparação com outros testes de toxicidade, os resultados foram quantificados na forma de EC_{50} (60 minutos) para alguns contaminantes.

III.B.1 - A RESPOSTA MICROBIANA FRENTE AOS METAIS CÁDMIO, COBRE E MERCÚRIO:

Como já conhecido, grande parcela dos metais pesados possuem um potencial tóxico para a maioria dos organismos vivos. A figura III.1 mostra o comportamento do crescimento das bactérias frente aos íons $Cu(II)$ e $Cd(II)$. Os resultados indicam que, quando usado a mesma concentração analítica, isto é, 5 ppm, a bactéria *E. coli* é aparentemente mais resistente ao cobre do que ao cádmio. Esta conclusão pode ser tendenciosa uma vez que ela está sustentada na hipótese de que existe uma relação direta entre a concentração total do metal no meio de cultura e seu efeito deletério. No entanto, quando analisado sob o ponto de vista da especiação química, a atividade do íon $Cu(II)$ no meio de cultura sem bactérias encontra-se abaixo de 1 ppb, enquanto que para os íons $Cd(II)$ o valor encontrado foi de 113 ppb. Esta diferença pode explicar a maior resistência aparente ao cobre da *E. coli* quando comparada

ao cádmio.

A figura III.2 mostra a especiação do cobre e do cádmio no meio de cultura isento de bactérias. Pode-se observar que para uma mesma concentração analítica (M_T), a atividade dos íons Cu(II) é bem menor do que a atividade dos íons Cd(II) . Talvez isso se deva ao fato de que o cobre apresente uma maior complexação e/ou hidrólise no meio de cultura.

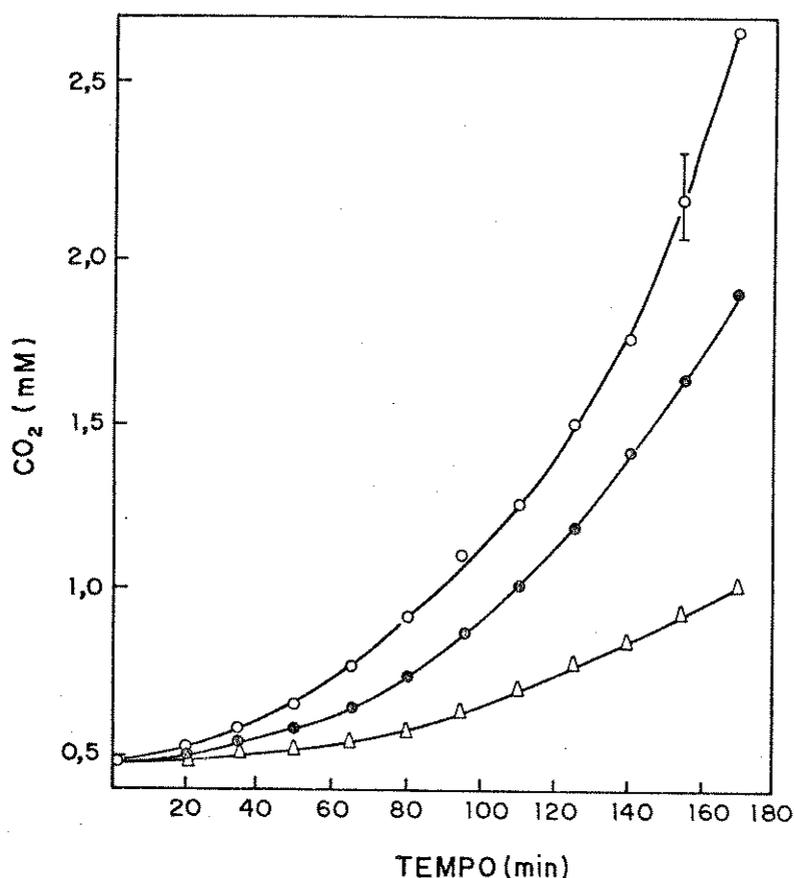


Figura III.1 - Comportamento microbiano frente aos íons Cu(II) (●) e Cd(II) (△), comparado com o controle que não recebeu nenhum metal (○). A barra indica o maior desvio padrão obtido para todas as medidas efetuadas.

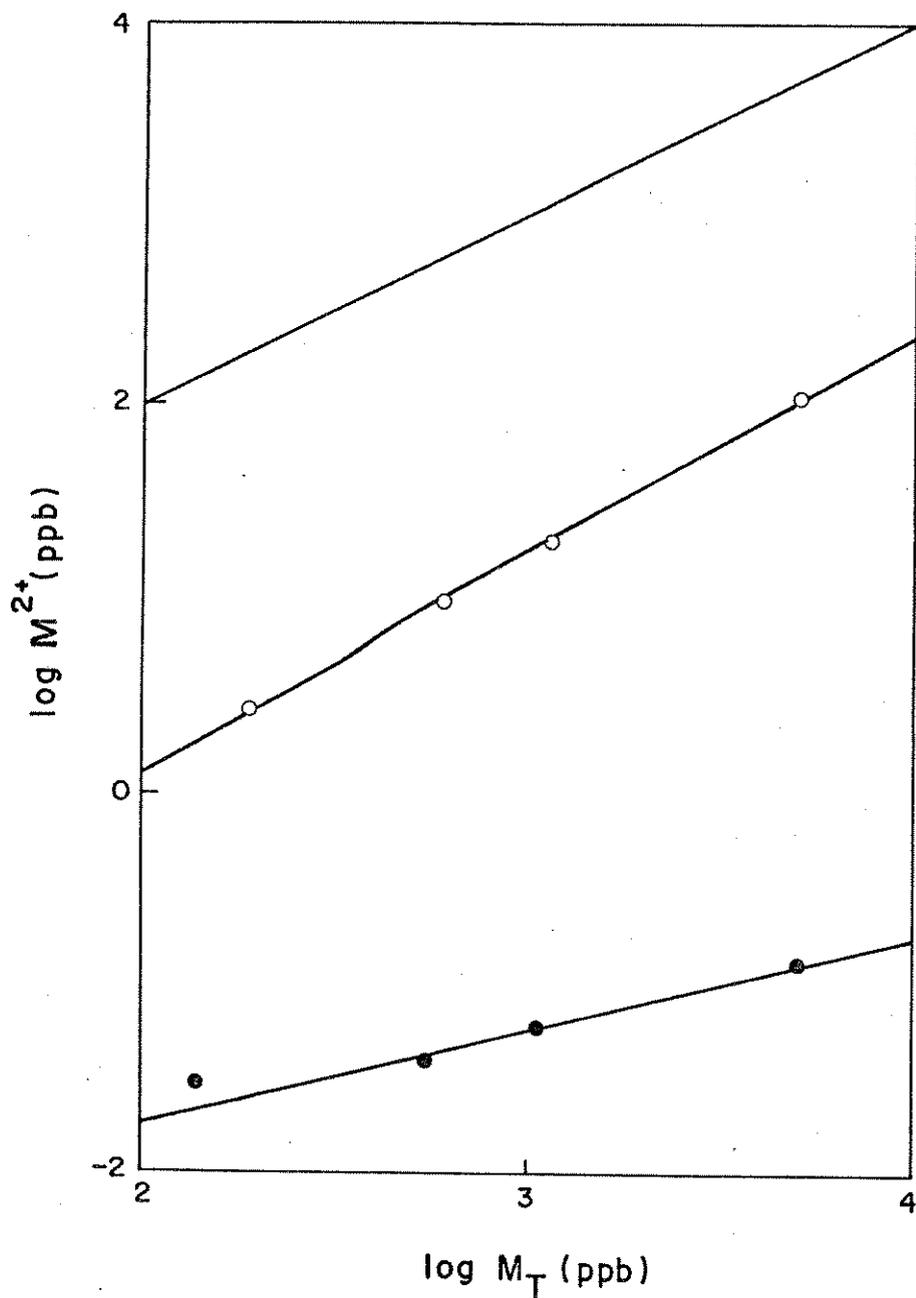


Figura III.2 - Especiação do cádmio (O) e cobre (●) no meio de cultura a 25°C e pH = 6,85. A linha contínua serve como referência.

A toxicidade dos íons Hg(II) também foi investigada. A figura III.3 mostra a resposta bacteriana frente a várias concentra-

ções deste metal. Pode-se observar que nenhum efeito deletério foi notado durante duas horas de experimento quando submetido a uma concentração de 10 ppb de mercúrio. Uma inibição severa na respiração bacteriana foi observada para 50 ppb do metal, e na concentração de 100 ppb, a respiração foi totalmente inibida.

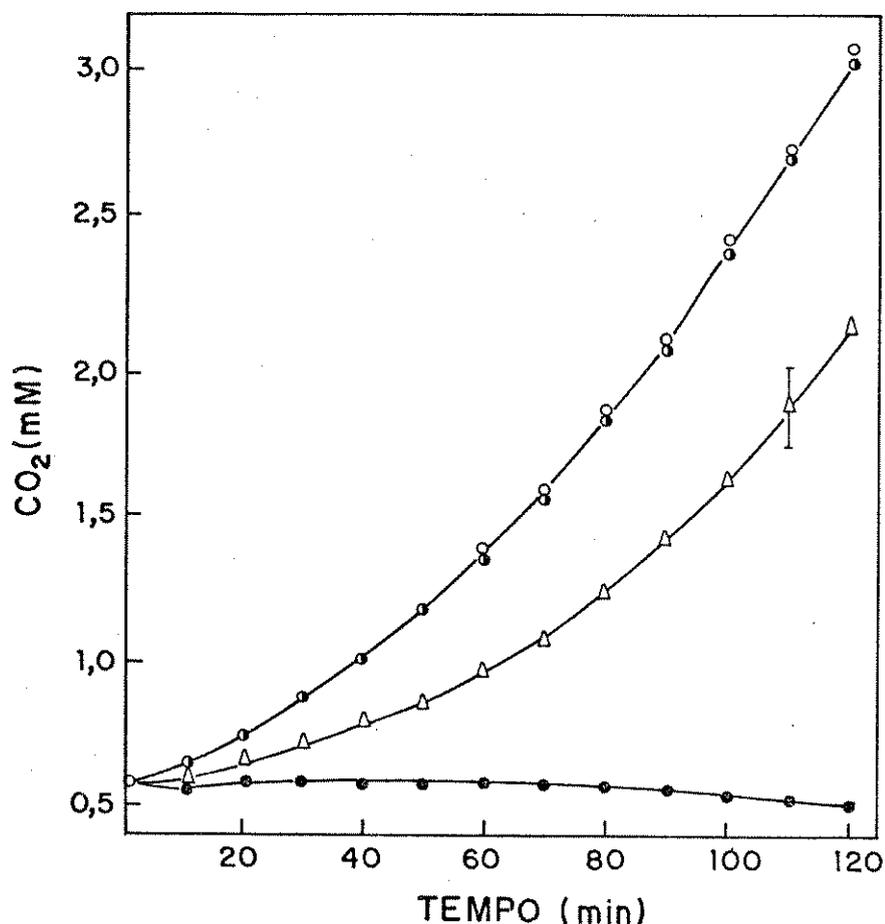


Figura III.3 - Comportamento microbiano frente aos íons Hg(II), nas concentrações analíticas de 10 (○), de 50 (Δ) e de 100 ppb (●), comparado com o controle (○) que não recebeu nenhum metal. A barra indica o maior desvio padrão obtido para todas as medidas efetuadas.

Nesse ensaio não foi possível a especificação do mercúrio no meio de cultura pelas dificuldades analíticas inerentes a este procedimento.

III.B.2 - ESPECIAÇÃO DE Cd(II) NO MEIO DE CULTURA:

Conforme já mencionado, em se tratando de metais, os testes de toxicidade requerem, além da concentração analítica dos mesmos, um outro parâmetro muito importante: a especificação do metal no meio de cultura. Como já visto, para alguns metais este procedimento analítico pode ser extremamente complexo pela falta de sensores específicos para as espécies a serem quantificadas. Há uma diferença básica entre íons livres e íons que estão complexados. A maioria dos métodos analíticos são capazes de determinar apenas a concentração total do elemento (Kalvoda, 1987).

Muitos autores têm demonstrado que a fração "livre" (hidratada), do metal é a forma mais tóxica para a vida aquática. As frações fortemente complexadas ou associadas com partículas coloidais são muito menos tóxicas (Hunt, 1987; Jardim et alii, 1984; Florence e Batley, 1980; Allen et alii, 1980). Desta forma, os ambientes aquáticos que contém alta concentração de compostos orgânicos e inorgânicos podem levar o sistema a um apreciável tamponamento metálico, podendo assim receber um maior aporte de metais sem que haja efeitos deletérios para a biota (Jardim, 1983; Campos, 1988).

Para elucidar a importância deste tópico, neste trabalho foi feita a especificação do cádmio no meio de cultura utilizado nos

testes de toxicidade. Sabendo-se que o ácido cítrico é um forte complexante de metais, foi feita a especiação do metal, na presença e na ausência deste composto no meio de cultura.

As curvas, mostradas na figura III.4 foram construídas lançando-se em gráfico a atividade do metal ($pCd = -\log a_{Cd^{2+}}$) em função da concentração total do metal adicionado no meio de cultura ($-\log Cd_T$). A linha contínua mostrada neste gráfico serve como referência, pois assume a atividade do íon igual à concentração analítica do mesmo, ou seja, assume a ausência de hidrólise e/ou complexação do metal.

Pode-se observar na figura III.4 que as frações relativas à espécie iônica $Cd(II)$, tanto no meio de cultura com ácido cítrico como na ausência desse composto, estão sempre abaixo da concentração total. Uma maior complexação foi observada no meio de cultura onde estava presente o ácido orgânico. Este comportamento era previsto, uma vez que o ácido cítrico é um forte complexante de metais (Ferrin e Dempsey, 1983).

Os dados também revelam que em concentrações acima de $1,8 \times 10^{-4} M$ ($-\log M_T = 3,74$), próximo à solubilidade do metal neste pH (6,80), no meio de cultura não ocorre mais uma variação brusca na atividade do íon com o aumento da concentração total de cádmio.

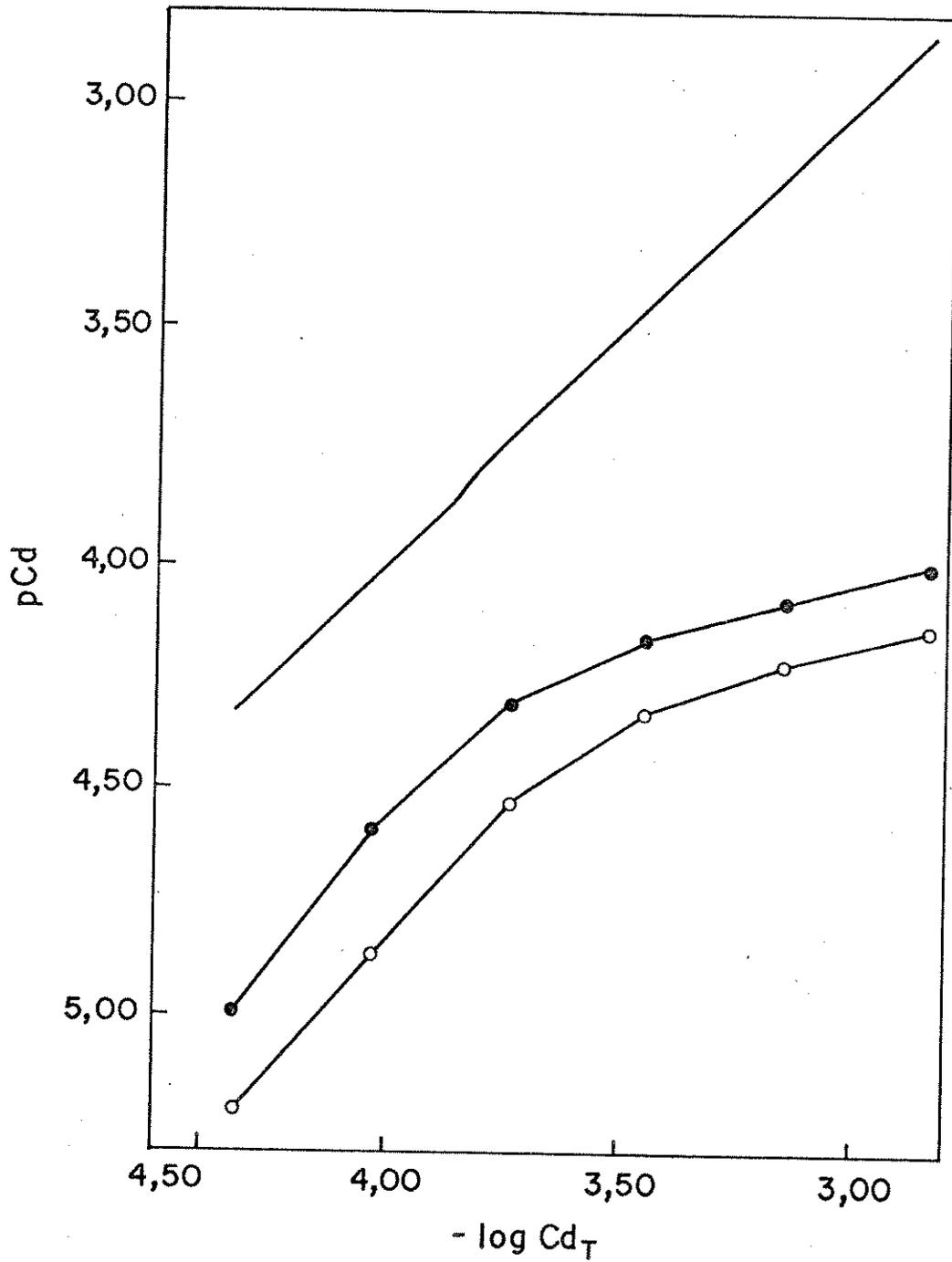


Figura III.4 - Especiação do cádmio no meio de cultura contendo ácido cítrico (○) e na ausência deste composto (●).

III.B.3 - TESTE DE TOXICIDADE COM SEDIMENTO E ANTIBIÓTICO:

Sabendo-se que os sedimentos de alguns corpos d'água são potencialmente tóxicos porque acumulam grande parte dos compostos que aportam no sistema aquático, amostras de alguns sedimentos também foram submetidas ao teste de toxicidade aqui proposto. Na figura III.5, dois tipos de respostas microbianas podem ser observadas. No primeiro caso, a estimulação no crescimento das bactérias pode ser detectada em 60 minutos, causada por sedimentos provenientes de corpos altamente eutróficos. Este comportamento é esperado desde que os sedimentos podem atuar como uma fonte adicional de micro e macronutrientes. Como visto, os sedimentos aqui investigados provocam uma estimulação e não uma inibição na respiração das bactérias.

Recentemente, num trabalho semelhante, Dutka et alii (1988) fizeram uma avaliação das condições da água e do sedimento do rio Saint John (Canadá). O resultado foi a uma estimulação na quantidade de ATP das algas (este foi o parâmetro escolhido para inferir toxicidade) em 23 das 38 amostras de sedimento estudadas. Os autores também discutem que a presença relativamente baixa da bactéria *E. coli* no sedimento poderia ser um indicador do estágio de poluição alcançado pelo rio.

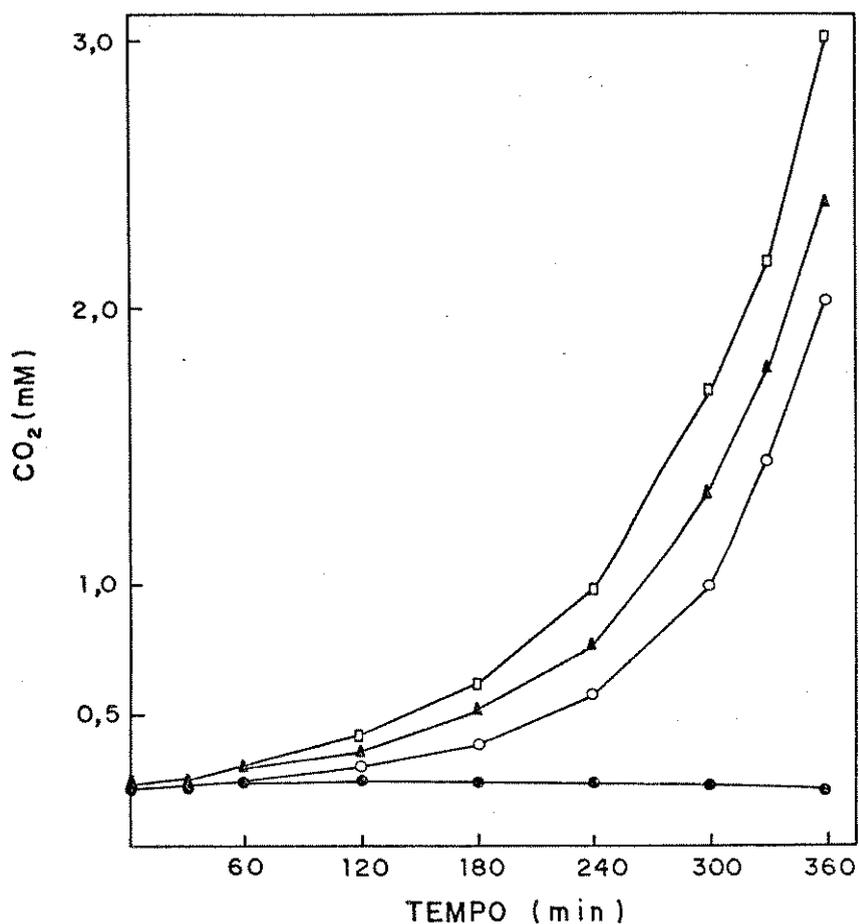


Figura III.5 - Estimulação na respiração microbiana causada pela adição de sedimentos secos (3,0 g/100 ml do meio de cultura) do Rio Tiête (□) e Lago da UNICAMP (▲), comparado com o controle (○). A Inibição causada pelo antibiótico Bactrin (500 mg/100 ml do meio de cultura) também é mostrada (●).

Da mesma maneira, Munawar e Munawar (1987) mostram em seu trabalho que, na adição de sedimento bruto no meio de cultura de *Chlorella vulgaris*, houve um aumento significativo na assimilação de carbono, da ordem de 1500 a 10000% comparado com o controle, provocando assim uma estimulação na taxa de crescimento dos organismos teste.

Quando se realizam testes de toxicidade com sedimentos, a inibição ou estimulação, principalmente em testes de crescimento da população de algas, são consideradas igualmente indesejáveis, pois qualquer alteração na produtividade primária de algas pode colocar em perigo o ecossistema aquático como um todo (Walsh e Merrill, 1984).

Na figura III.5 também pode ser visto como o antibiótico Bactrim inibiu totalmente a produção microbiana de CO_2 . Essa inibição foi detectada em 20 minutos, indicando que esse procedimento pode ser muito útil em antibiogramas de curta duração, ou seja, uma alternativa para o tradicional ensaio microbiológico em agar, o qual consome de 18 - 24 horas.

III.B.4 - CÁLCULO DE EC_{50} :

A toxicidade é usualmente expressa em termos da concentração que produz um efeito específico numa específica proporção da população dos organismos testes após um determinado tempo de ensaio (HMSO, 1983). Nesse sentido, torna-se importante a quantificação da substância tóxica neste trabalho.

Apesar de se dispor de vários parâmetros para comparar os resultados de testes de toxicidade aguda, tais como EC₅₀, LC₅₀ dentre outros, muitos são os métodos usados na estimativa ou no cálculo de tais parâmetros a partir dos resultados obtidos experimentalmente. (Kooijman et alii, 1983; HMSO, 1983).

Dutka et alii (1983) fizeram uma comparação entre os resultados obtidos em quatro diferentes testes de toxicidade: o teste Microtox, o teste de mobilidade da bactéria *Spirillum volutans*, a inibição na respiração da população microbiana presente no lodo ativado e a inibição da TTC-dehidrogenase nesta mesma matriz. As substâncias tóxicas testadas foram o 3,5 diclorofenol, o cloreto de cetiltrimetilamônio (Cetremida), o lauril sulfato de sódio, o fenol, o sulfato de cobre, o cloreto de mercúrio e o sulfato de zinco. Os resultados estão apresentados na tabela III.2.

É interessante notar que cada procedimento (teste) possui seu próprio padrão de sensibilidade frente aos diferentes tipos de compostos testados. Embora limitado pelo número de resultados obtidos, os testes poderiam ser classificados, de um modo geral, de acordo com a sua sensibilidade como: teste Microtox > teste com *Spirillum volutans* > teste de respiração > teste TTC-dehidrogenase, do mais sensível para o menos sensível.

Tabela III.2 - Comparação dos resultados obtidos em quatro testes de toxicidade frente a vários agentes tóxicos. Todos os valores em mg/l.

Agente tóxico	Microtox ¹	S. volutans ²	Lodo ativado	
			Respiração ³	Inibição TTC ⁴
3,5 Diclorofenol	2,9	5,0	38	80
Cetremida	0,86	1,45	5,8	18,5
Lauril sulfato de sódio	1,8	4,15	188	48
Fenol	34,3	300	740	1400
Cobre	3,8	10	34	2,1
Mercúrio	0,046	1,0	1,3	1,5
Zinco	3,45	11,6	6,1	24

1- EC₅₀ (15 minutos); 2- 90% Inibição (2 horas); 3- Respiração (30 minutos) e 4- TTC-dehidrogenase (60 minutos).

Como era de se esperar, a magnitude de EC_{50} varia de acordo com o tempo de exposição do organismo teste frente à substância tóxica. Esses valores tendem a diminuir em função do aumento do tempo de exposição. Greene et alii (1985) realizaram o teste Microtox com várias substâncias potencialmente tóxicas explorando este aspecto. Os resultados encontram-se na tabela III.3.

Tabela III.3 - Comparação de toxicidade relativa, EC_{50} (mg), para diferentes períodos de exposição no teste Microtox.

Agente tóxico	Tempo de exposição (minutos)				
	5	15	30	60	90
Mercúrio	0,06	0,02	0,01	-	-
Cobre	1,21	0,28	0,23	0,12	-
Arseniato de sódio	3,57	1,73	1,60	-	-
Zinco	11,98	1,56	0,86	0,68	0,67
Arsenito de sódio	24,67	18,39	16,60	-	-
Trióxido de arsênio	73,73	43,56	33,39	31,43	-
Cádmio	102,59	25,43	13,79	3,85	2,97

A fim de avaliar a confiabilidade dos resultados obtidos sob as mesmas condições, mas em laboratórios distintos, Greene et alii (1985) fizeram uma comparação entre os resultados obtidos no teste Microtox (EC_{50} em 15 minutos) realizado em quatro laboratórios. Como mostra a tabela III.4, os valores de EC_{50} obtidos mostraram uma grande dispersão. Isso mostra que o teste Microtox ainda não é um procedimento padrão quando se tenta inferir toxicidade de um agente qualquer, mesmo porque as bactérias usadas nos testes podem ser mais resistentes que outras pela própria adaptação à diferentes agentes tóxicos no seu ambiente de origem.

Tabela III.4 - Comparação entre resultados obtidos em diferentes laboratórios (A-E) para o teste Microtox. Resultados expressos em EC_{50} (mg/l) para 15 minutos de exposição.

Resultados obtidos							
	A	B	C	D	E	M	± sd
Mecúrio	0,02	-	0,05	-	0,02	0,03	± 0,01
Cobre	0,28	0,80	3,80	0,28	-	1,29	± 1,69
Zinco	1,56	4,00	3,50	6,08	-	3,79	± 1,86
Arsenito de sódio	18,39	26,00	-	-	-	22,20	± 5,38
Cádmio	25,43	20,00	-	41,40	140,49	56,83	± 56,51

A = Greene et alii, 1985; B = Beckman, 1981; C = Dutka et alii, 1981; D = Qureshi et alii, 1983; E = De Zwart et alii, 1983.

M = média dos valores tabelados e sd = estimativa do desvio padrão.

No presente trabalho, os valores de EC_{50} foram obtidos através da interpolação gráfica em curvas da porcentagem de inibição da respiração microbiana, para um período de 60 minutos, em função da concentração da substância tóxica. No caso de cádmio, utilizou-se a atividade do metal ao invés da concentração.

A figura III.6 mostra o comportamento bacteriano frente ao sal de amônio quaternário, Cetremida, um conhecido bactericida.

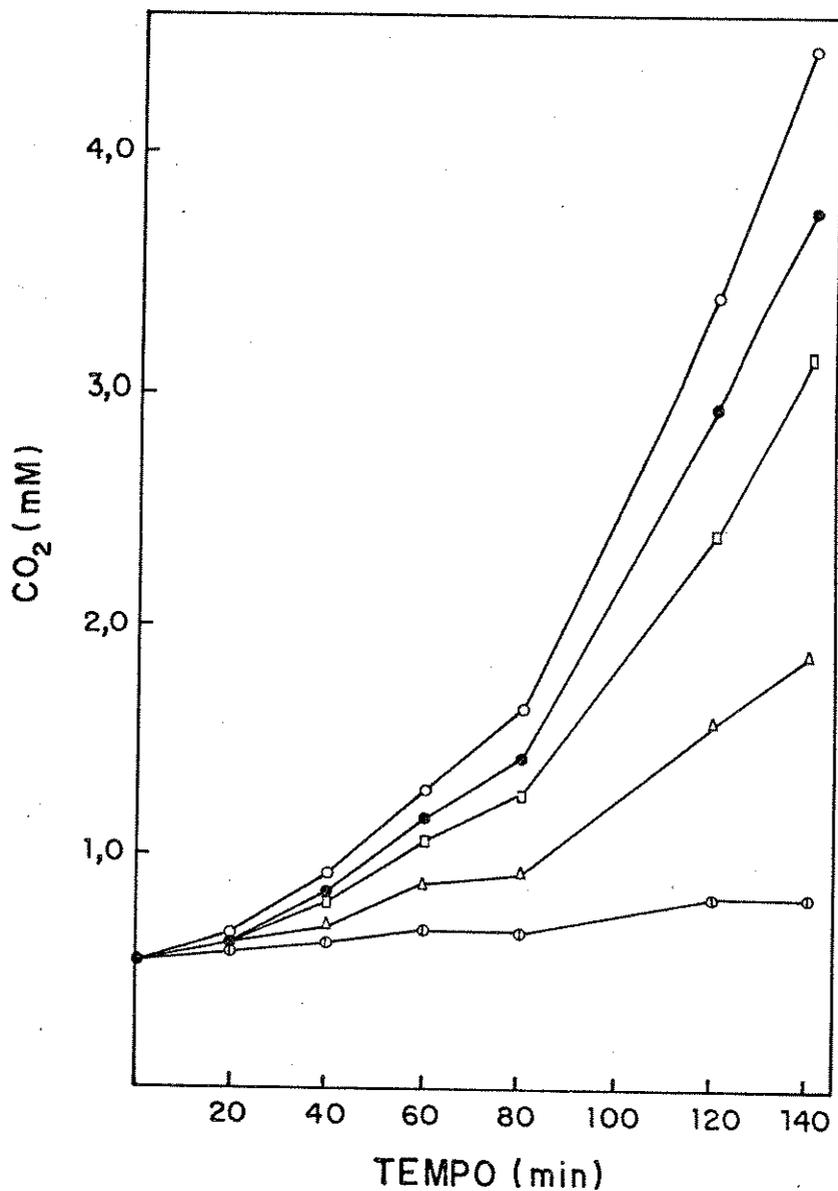


Figura III.6 - Comportamento microbiano frente ao Cetremida, nas concentrações de 5,19 (●), 6,74 (◻), 8,30 (Δ) e 10,38 ppm (◉), comparado com o controle isento deste (○).

Na figura III.7 é mostrado o gráfico da porcentagem de inibição da respiração, após 60 minutos, em função da concentração do Cetremida. O EC_{50} (60 minutos) para este caso foi de 8,10 ppm.

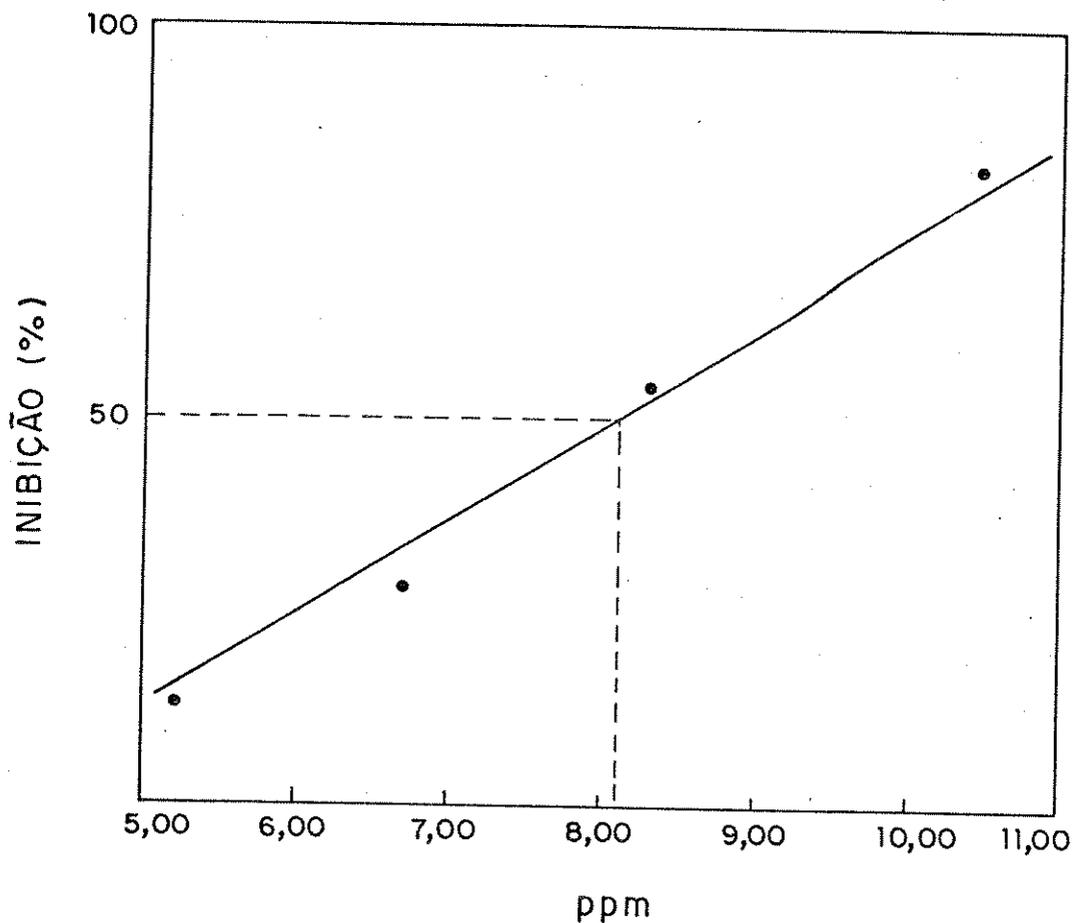


Figura III.7 - Porcentagem da inibição na respiração das bactérias em função da concentração de Cetremida (com referência ao controle) para uma exposição de 60 minutos.

Da mesma maneira, também foram calculados EC_{50} para os íons níquel e cádmio. Os valores obtidos neste trabalho foram comparados com outros encontrados na literatura e mostrados na tabela III.5.

Tabela III.5 - Comparação de EC_{50} (obtidos neste trabalho) para Cetremida, Ni(II) e Cd(II) com outros valores da literatura, em mg/l.

Cetremida

Este trabalho	7,88	
Microtox (15 minutos)	1,50	Vymazal, 1987.
Microtox (15 minutos)	0,86	Dutka et alii, 1983
<i>S. volutans</i>	1,45	Dutka et alii, 1983
Respiração		
(lodo ativado)	5,8	Dutka et alii, 1983.
TTC-dehidrogenase	18,5	Dutka et alii, 1983.
Pf ATP-TOX	0,59	Vymazal, 1987.

Níquel

Este trabalho	76,67	
Microtox (15 minutos)	22,50	Vymazal, 1987.
Assimilação de glicose (30 minutos)	41,50	Kaiser, 1987.
Pf ATP-TOX	4,33	Vymazal, 1987.
Ec ATP-TOX	10,40	Vymazal, 1987.

Cádmio

Este trabalho	14,62	
Microtox (15 minutos)	18,80	Vymazal, 1987.
Microtox (15 minutos)	25,43	Greene et alii, 1985.
Microtox (15 minutos)	20,00	Beckman, 1981
Microtox (15 minutos)	41,40	Quresh et alii, 1983.
Microtox (15 minutos)	140,49	De Zwart et alii, 1983.

A comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto nesse trabalho com outros testes de toxicidade aguda é uma questão bastante controvertida. Embora Doward e Barisas (1984) compararam os valores de LC₅₀ obtidos para trutas (Rainbow Trout) com os valores de EC₅₀ obtidos pelo teste Microtox e com inibição de 40% na respiração de *Escherichia coli* (eletrodo de bactéria)

utilizando vários compostos tóxicos, os resultados obtidos mostraram discrepâncias em até 3 ordens de magnitude. Essas variações são esperadas, pois os testes de toxicidade foram feitos com diferentes organismos. Além disso, os parâmetros usados para inferir toxicidade (LC_{50} , EC_{50} e $I_{40\%}$) são entidades definidas operacionalmente que podem não ser intercorrelacionadas.

III.B.5 - TESTES DE TRATABILIDADE:

Na verdade, os testes de tratabilidade são testes de toxicidade nos quais o efeito principal não é a inibição, mas sim a eventual estimulação da respiração. Isto indica que o composto ou a mistura de compostos contém substâncias que podem ser metabolizadas pela bactéria, ou seja, degradada dentro do espaço de tempo que durou o teste.

Foram feitos testes de toxicidade-tratabilidade com o lodo da estação de tratamento de esgoto sanitário (Hospital das Clínicas UNICAMP) como também de um efluente de uma indústria metalúrgica. Em ambos os testes não houve estimulação ou inibição da respiração bacteriana nas condições do ensaio. Muito embora esses dois tipos de lodos possuam um potencial tóxico, eles não apresentaram qualquer efeito para as bactérias. Nesse sentido, abre-se a possibilidade destes serem tratados microbiologicamente.

Já para os resultados obtido nos testes de toxicidade-tratabilidade com um efluente contendo o herbicida conhecido comercialmente como PARAQUAT, após uma pequena estimulação na respiração microbiana no início do teste, passados 100 minutos do ensaio

inverteu-se o efeito, ocorrendo a partir daí uma brusca inibição na respiração (figura III.8). Este comportamento foi proporcional a concentração do efluente. Sendo assim, a possibilidade desse efluente ser tratado biologicamente é muito remota.

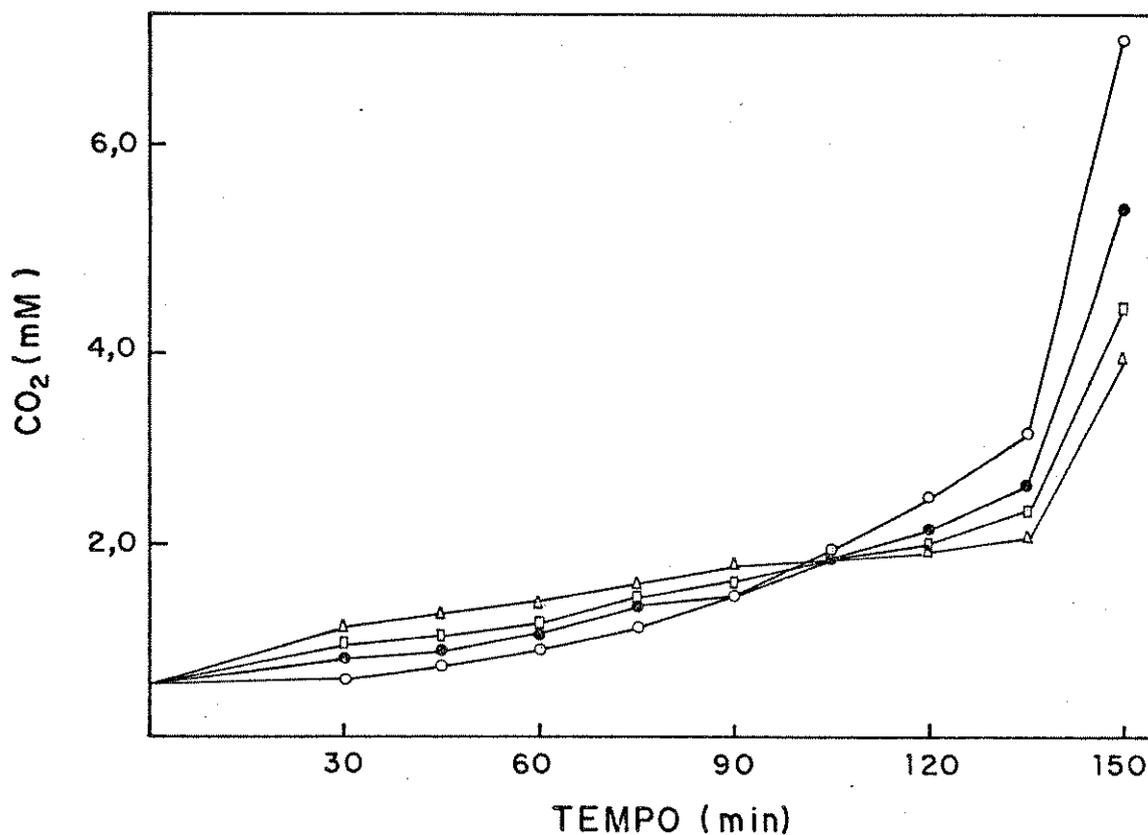


Figura III.8 - Comportamento microbiano frente ao efluente nas concentrações de 0,5 (●), 1,0 (□) e 2,0% (△), comparado com o controle que não recebeu efluente (○).

CAPÍTULO IV

CONCLUSÃO

Atualmente, qualquer método analítico aplicável à determinação do CO_2 que combine rapidez, precisão, exatidão e baixo custo deve ser encarado como prioritário dentro da química analítica ambiental. Cientistas dedicados ao estudo da preservação ambiental necessitam de tal ferramenta para a quantificação das espécies carbônicas (H_2CO_3^* , HCO_3^- e CO_3^{2-}) no sistema aquático, na atmosfera e na troca do CO_2 que ocorre nesta interface. A quantificação destas espécies é o parâmetro principal na coleta de informações a respeito do fluxo de carbono entre esses reservatórios e das possíveis consequências desse fenômeno para o meio ambiente (O'Neill, 1985).

No campo da biotecnologia, a fermentação e a respiração de micróbios e leveduras são dois entre os numerosos exemplos da necessidade de se melhorar os métodos analíticos para monitorar continuamente a concentração de CO_2 (Sonnleitner e Fiechter, 1988).

De acordo com Karube et alii (1988), devido ao alto custo de enzimas, sensores enzimáticos estão sendo trocados por sensores a base de micróbios para promover o monitoramento contínuo dos produtos e substratos em processos de fermentação, incluindo CO_2 . Muito embora sensores biológicos têm sido usados na determinação de CO_2 (Suzuki et alii, 1987), os sensores químicos apresentam um maior nível de segurança, desde que eles não são afetados pelas condições adversas e incontroláveis do meio de cultura.

Foi demonstrado nesse trabalho que a determinação de CO_2 pode ser feita pela combinação do sistema FIA com um sensor eletroquímico. Uma aplicação direta deste método em testes de toxicida-

de aguda foi demonstrado ser viável. É importante também mencionar que alguns íons inorgânicos tais como sulfetos, cianetos e acetatos, além de alguns gases dissolvidos, tais como SO_2 , podem causar interferência no método proposto. Cabe ressaltar porém, que tais substâncias não são normalmente encontrados em condições nas quais o método é proposto.

O método proposto abre inúmeras opções no vasto campo da utilização de técnicas analíticas em testes de toxicidade (e tratabilidade) de resíduos sólidos industriais, águas residuárias e esgoto doméstico. Pode também ser utilizado como uma ferramenta bastante útil na avaliação do grau de poluição de corpos d'água via a análise de sedimentos. Quando comparado a outros procedimentos rotineiros neste campo da ciência, o procedimento proposto pode fornecer as respostas procuradas num tempo relativamente curto.

Finalmente, é importante salientar que a determinação do CO_2 pelo método FIA com detecção condutométrica pode ser encarado como um substituto ideal ao tradicional ensaio de toxicidade de antibióticos para bactérias gran-negativas e gran-positivas. Nesses antibiogramas, o procedimento tradicional lança mão de um meio de cultura sólido (agar), num procedimento que normalmente requer um mínimo de 18 horas para a obtenção de resultados confiáveis.

CAPÍTULO V

REFERÊNCIAS

- Allen, R. (1980). The Impact of CO₂ on World Climate, Environment, 22(10), 6-13, 37-38.
- Allen, H.E.; Hall, R.H. e Brisbin, T.D. (1980). Metal Speciation. Effects on Aquatic Toxicity, Environ. Sci. Technol., 14(4), 441- 443.
- Beckman Instruments, Inc. (1978). Microtox Model 2055 Toxicity Analyser System, Carlsbad, CA.
- Beckman Instrument, Inc. (1981). Advantages of Using Several Test Time. Microtox Application Notes, N M102, Carlsbad, CA.
- Ben-Yaakov, S. e Guterman, H. (1984). A New Experimental Technique for Validating Exchange Models of Carbon Dioxide Between the Atmosphere and Sea-Water, Talanta, 31, 1095-1099.
- Bitton, G. e Dutka, B.J. (1986). Toxicity Testing Using Microorganisms (Editado por Bitton, G e Dutka, B.J.), Vol. 1, CRC Press Inc., Boca Raton, Fla.
- Bradshaw, A.L. e Brewer, P.G. (1988a). 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.

- Bradshaw, A.L. e Brewer, P.G. (1988b). High Precision Measurements of Alkalinity and Total Carbon Dioxide in Seawater by Potentiometric Titration. 2. Measurements on Standard Solutions, Mar. Chem., 24, 155-162.
- Campos, M.L.M. (1988). Fotodegradação de Compostos Orgânicos Presentes em Ambientes Aquáticos Naturais e suas Interações com Metais Cobre, Ferro e Cádmio; Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP.
- De Zwart, D. e Sloof, W. (1983). The Microtox as an Alternative Assay in the Acute Toxicity Assessment of Water Pollutants, Aquatic. Toxicol., 4, 129-193.
- Dorward, E.J. e Barisas, B.G. (1984). Acute Toxicity Screening of Water Pollutants Using a Bacterial Electrode, Environ. Sci. Technol., 18, 967-972.
- Durand, M. e Favard, P. (1972). A Célula. Universidade de São Paulo e Edgard Blucher Ltda (Ed), São Paulo, Brasil.
- Dutka, B.J. e Bitton, G. (1986). Toxicity Testing Using Microorganisms (Editado por Bitton, G. e Dutka, B.J.), Vol. II, CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

- Dutka, B.J.; Jones, K.; Kwan, K.K.; Bailey, H. e McInnis, R. (1988). Use of Microbial and Toxicant Screening Tests for Priority Site Selection of Degraded Areas in Water Bodies, *Wat. Res.*, 22, 503-510.
- Dutka, B.J.; Nyholm, N. e Petersen, J. (1983). Comparison of Several Microbiological Toxicity Screening Tests, *Wat. Res.*, 17, 1363-1368.
- Dutka, B.J e Kwan, K.K. (1981). Comparison of Three Microbial Toxicity Screening Tests With the Microtox Test, *Bull. Environ. Contam. Toxicol. Chem.*, 27, 753-757.
- EPA/Corps of Engineers Technical Committee in Criteria for Dredge and Fill Materials. (1977). Ecological Evaluation of Proposed Discharge of Dredge Materials into Ocean Water, *Env. Effects Laboratory, U.S. Army Eng. Wat. Exp. Stn.*, Vicksburg, MS.
- Faria, L.C. (1987). Determinação Condutométrica de Amônia em Digeridos de Kjeldhal, Aguas e Solos por Análise por Injeção em Fluxo, Tese de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP.
- Finch, G.R.; Smith, D.W. e Stiles, M.E. (1988). Dose-response of *Escherichia Coli* in Ozone Demand-Free Phosphate Buffer, *Wat. Res.*, 22, 1563-1570.

- Florence, T.M. e Battley, G.E. (1980). Chemical Speciation in Natural Waters, CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry, 9(3), 219-296.
- Forstner, U. e Salomons, W. (1980). Heavy Metals Review Paper: Trace Metal Analysis on Polluted Sediments, Part I: Assessment of Sources and Intensities, Env. Sci. Letters, 11, 494-505.
- Fukushi, K. e Hiiro, K. (1987). Determination of Total Carbon Dioxide in Seawater by Capillary Type Isotacophoresis, Fresenius Z. Anal. Chem., 328, 247-250.
- Gran, G. (1952). Determination of the Equivalence Point in Potentiometric Titrations. Part II, Anal. Chem., 77, 661-670.
- Greene, J.C.; Miller, W.E.; Debacon, M.K.; Long, M. e Bartels, C.L. (1985). A Comparison of Three Microbial Assay Procedures for Measuring Toxicity of Chemical Residues, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14, 659-667.
- Goldstein, E.G. (1988). Testes de Toxicidade de Efluentes Industriais, Ambiente, 2(1), 33-38.
- Hastings, J.W.; Nealson, K.H. (1978). Bacterial Bioluminescence, Ann. Rev. Microbiol., 31, 549.

Hileman, B. (1989). Global Warming, CHEM. & Eng. News, 13, 25-44.

HMSO Books. (1987). 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.

HMSO Books. (1983). Acute Toxicity with Aquatic Organisms, 1981; Her Majesty's Stationery Office (Ed), Londres.

Hunt, D.T.E. (1987). Trace Metals speciation and Toxicity to Aquatic Organisms - a review, Water Research Centre, Bucks TR, 247, 1-27.

International Joint Commission. (1982). Guidelines and Register for Evaluation of Great Lakes Dredging Projects, Rept. Dredging Subcomm. to Water Quality Programs Comm. of the Great Lakes Wat. Wat. Qual. Bd.

Jardim, W.F. (1983). Some Chemical and Biological Aspects of Copper Toxicity to Cyanobacteria, PhD Thesis, The University of Liverpool.

Jardim, W.F.; König, A. e Pearson, H.W. (1984). Toxidez de Cobre em Micro-organismos: a necessidade da Especificação Química, Quím. Nova, 7(3), 138-140.

- Johnson, K.M.; Sieburth, J.McN.; Williams, P.J.IeB. e Brandstrom, L. (1987). Coulometric Total Carbon Dioxide Analysis for Marine Studies: Automation and Calibration, Mar. Chem., 21, 117-133.
- Kaiser, K.L.E. (1987). QSAR in Environmental Toxicology. II, K.L.E. (Ed), D. Reidel, Amsterdam.
- Kalvoda, R. (1987). Electroanalytical Methods in Chemical and Environmental Analysis. Plenum Publishing Corporation e SNTL-Publishers of Technical Literature, Praga.
- Karube, I.; Matsunaga, T. e Suzuki, S. (1979). Microbioassay of Nystatin with a Yeast Electrode, Anal. Chim. Acta, 109, 39-44.
- Karube, I.; Tamiya, E.; Yokoyama, K.; Kitagawa, Y.; Suzuki, H. e Asano, Y. (1988). Application of Microbiological Sensors in Fermentation Processes, Anal. Chim. Acta, 213, 69-77.
- Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O. e Oldersma, H. (1983). Parametric Analyses of Population Growth in Bio-assays, Wat. Res., 17, 527-538.
- Loewenthal, R.E. e Marais, G.V.R. (1976). Carbonate Chemistry of Aquatic Systems: Theory and Application, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor.

- Long, L.G. e Winefordner, J.D. (1983). Limit of Detection: A Closer Look at the IUPAC Definition, Anal. Chem., 55, 712-724.
- McKee, P.M. (1980). Sediment Contamination and Bioassessment Procedures for the Ecological Evaluation of Sediment Quality with Emphasis on the Great Lakes. Beak Consultants Ltd., for Great Lakes Biomnology Lab., Dept. Fish. and Oceans and Dept. of Supply and Services.
- Mearns, A.J.; Swartz, R.C.; Cummins, J.M.; Dinnel, P.A.; Plesha, P. e Chapman, P.M. (1986). Inter-Laboratory Comparison of a Sediment Toxicity Test Using the Marine Amphipod, *Baetoporeia amblyopus*; Mar. Environ. Res., 19, 13-37.
- Motomizu, S.; Toei, K.; Kuwaki, T. e Oshima, M. (1987). Gas-diffusion Unit with Tubular Microporous Poly(tetrafluoro-ethylene) Membrane for Flow-injection Determination of Carbon Dioxide, Anal. Chem., 59, 2930-2932.
- Munawar, M. e Munawar, I.F. (1987). Phytoplankton Bioassays for Evaluating Toxicity of "in situ" Sediment Contaminants, Hydrobiologia, 149, 87-105.
- O'Neill, P. (1985). "Environmental Chemistry", George Allen & Unwin (Ed.) Ltda London, UK.

- Pamatmat, M.M. (1982). Metabolism of a Burrowing Polychaete: Precaution Needed when Measuring Toxic Effects, Mar. Poll. Bull., 13, 364-367.
- Park, K.; Kennedy, G.H. e Bobson, H.H. (1964). Comparison of Gas Chromatographic Method and pH-Alcalinity Method for Determination of Total Carbon Dioxide in Sea Water, Anal. Chem., 36, 1686.
- Pasquini, C. e Faria, L.C. (1987). Flow-Injection Determination of Ammonia in Kjeldal Digests by Gas Diffusion and Conductometry, Anal. Chim. Acta, 193, 19-27.
- Pasquini, C.; Jardim, W.F. e Faria, L.C. (1988). Adaptation of a Cold Vapour Mercury Analyser to Flow Injection Analysis, J. Autom. Chem., 10(4), 188-191.
- Perrin, D.D. e Dempsey, B. (1983). Buffers for pH and Metal Ion Control, Chapman and Hall (Ed), Nova Iorque.
- Prater, B. e Hoke, R.A. (1980). A Method for the Biological and Chemical Evaluation of Sediment Toxicity, In Contaminants and Sediments, R.A. Baker (Ed), Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich., 483-499.

- Qureshi, A.A.; Coleman, R.N. e Paran, J.H. (1983). Evaluation and Refinement of the Microtox Test for use in Toxicity Screening, 1st Int. Symp. Toxicity Testing Using Bacteria, Nat. Water Res. Inst., Burlington, Ont., Canada, May 17-19.
- Rebello, A.L. (1987). Efeito Estufa: uma ameaça no ar, *Ciência Hoje*, 5(29), 50-56.
- Roberts, D.G. e Smith, D.M. (1988). Infrared Gas Analysis of Both Gaseous and Dissolved CO₂ in Small-Volume Marine Samples, *Limnol. Oceanogr.*, 33, 135-140.
- Rochon, R. (1985). Problems Associated with Dredging Operations on the St. Lawrence. Situation, Methods and Areas for Research; Environmental Protection Service Report Series; Environmental Protection Service, Environmental Canada, Ottawa, Canada; 1-72.
- Ruzicka, J. e Hansen, E.H. (1974). New potentiometric gas sensor: the air-gap electrode, *Anal. Chem. Acta*, 69(1), 129-141.
- Simpson, D.L. e Kobos, R.K. (1977). Potenciometric Microbiological Assay of Gentamicin, Streptomycin, and Neomycin with a Carbon Dioxide Gas-Sensing Electrode, *Anal. Chem.*, 55, 1974-1977.

- Sonnleitner, B. e Fiechter, A. (1988). High-Performance Bioreactors: a New Generation, *Anal. Chim. Acta*, 213, 199-205.
- Stewart, K.K. (1981). Flow-Injection Analysis: A Review of its Early History, *Talanta*, 28, 789-797.
- Stoker, H.S. e Seager, S.L. (1972). *Environment Chemistry; Air and Water Pollution*. Scott, Foresman and Company (Ed), Glenview, Illinois, Londres.
- Stumm, W. e Morgan, J.J. (1981). *Aquatic Chemistry: An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. John Wiley and Sons, Inc (Ed), 2 Ed., New York, Chichester, Brisbane, Toronto.
- Suzuki, H., Tamiya, E. e Karube, I. (1987). An Amperometric Sensor for Carbon Dioxide Based on Immobilized Bacteria Utilizing Carbon Dioxide, *Anal. Chem. Acta*, 199, 85-91.
- Swartz, R.C.; DeBen, W.A.; Jones, J.K.P.; Lamberson, J.O. e Cole, F.A. (1984). Phoxocephalid Amphipod Bioassay for Marine Sediment Toxicity. *Aquatic Toxicology: Seventh Symposium*. American Society for Testing and Materials, Filadélfia, 284-306.

Swartz, R.C.; Ditsworth, G.R.; Schults, D.W. e Lamberson, J.O. (1985a). Sediment Toxicity to a Marine Infaunal Amphipod: Cadmium and its Interaction with Sewage Sludge, Mar. Environ. Res., 18, 133-153.

Swartz, R.C.; Shults, D.W.; Ditsworth, G.R.; DeBen, E.A. e Cole, F.A. (1985b). Sediment Toxicity, Contamination, and Macrobenthic Communities Near a Large Sewage Outfall, Validation and Predictability of Laboratory Methods for Assessing the Fate and Effects of Contaminants in Aquatic Ecosystems, ASTM STP 865. T.P. Boyle, ED., American Society for Testing and Materials, Filadélfia, 152-175.

Swinnerton, J.W.; Linnenbom, V.J. e Cheek, C.H. (1962). Determination of Dissolved Gases in Aqueous Solutions by Gas Chromography, Anal. Chem., 34, 483-485.

Takahashi, T. (1989). The CO₂ Puzzle, Oceanus, 29, 22-29.

Tech-Line Instruments. (1988). Technical Application Bulletin N 1: The Phase III Arthur Automatic Respirometer. ArTech International, Inc., Wisconsin.

Turbak, S.C.; Olson, S.B. e McFeters, G.A. (1986). Comparison of Algal Assay Systems for Detecting Waterborne Herbicides and Metals, Wat. Res., 20, 91-96.

Vymazal, J. (1987): Toxicity and Accumulation of Cadmium with Respect to Algae and Cyanobacteria: a review, Toxic. Asses., 2, 387.

Walsh, G.E. e Merrill, R.G. (1984). Algal Bioassays of Industrial and Energy Process Effluents. Algae as Ecological Indicators. Shubert, L.E., Academic Press Inc. USA, 329-360.