



Universidade de Brasília

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM TITULADOR AUTOMÁTICO PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS POR SUPRESSÃO DE
FLUORESCÊNCIA**

ALAN RIBEIRO MÓL

Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré

Brasília-DF

2015

ALAN RIBEIRO MÓL

**DESENVOLVIMENTO DE UM TITULADOR AUTOMÁTICO PARA
CARACTERIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS POR
SUPRESSÃO DE FLUORESCÊNCIA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fonseca

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Fabríz Sodré

Brasília - DF
2015

COMUNICADO

Comunicamos a aprovação da Defesa de Dissertação de Mestrado do (a) aluno (a) **Alan Ribeiro Mól**, matrícula nº **13/0086291**, intitulada **“Desenvolvimento de um Titulador Automático para a Caracterização de Substâncias Húmicas por Supressão de Fluorescência”**, apresentada no (a) Auditório Verde do Instituto de Química (IQ) da Universidade de Brasília (UnB) em 12 de fevereiro de 2015.



Prof. Dr. Alexandre Fonseca
Presidente de Banca (IQ/UnB)



Prof. Dr. Cícero Célio de Figueiredo
Membro Titular (FAV / UnB)



Prof^a Dr^a Ana Cristi Basile Dias
Membro Titular (IQ/UnB)



Prof^a Dr^a Fernanda Vasconcelos de Almeida
Membro Suplente (IQ/UnB)

Em 12 de fevereiro de 2015.

*“Where nature finishes producing its own species,
man begins, using natural things and with the help
of this nature, to create an infinity of species”.*

- Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Thais e Gerson, que me deram todas as condições para que chegasse até aqui, e muito mais. À minha irmã, Alice, que sempre foi e será minha grande amiga e companheira, e a toda a minha família. À minha namorada Rafaela, pelo companheirismo em todas as horas, em especial nas de maior dificuldade.

Ao meu orientador, Prof. Alexandre Fonseca, que sempre esteve disponível para me orientar e encontrou tempo e disposição para me ajudar em meio à gravidez de sua esposa e nascimento de sua filha (obrigado, Alessandra e Júlia!). Ao meu coorientador Prof. Fernando Sodré, que idealizou o projeto e me guiou para que os objetivos iniciais fossem alcançados com sucesso.

Aos outros integrantes do Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica, Prof^a. Ana Cristi, Laiz, Camila, Hadassa e Eduardo, e aos outros membros do grupo AQQUA, em especial em especial à Tati pelas análises de TOC e ao Prof. Jez Braga pelas diversas discussões sobre a parte matemática e estatística.

Aos meus amigos de graduação, Guilherme Matos e Larissa Chaperman, que me acompanharam em toda jornada acadêmica como colegas de estudo e amigos nas horas vagas (e às vezes nas não-vagas também). Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Prof. Wagner, Micaella, Anne, Elaine, Adelson, Jaques, Rayner, Nuno e tantos outros, que contribuíram imensamente para a minha formação.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Química e Fertilidade do Solo, Prof. Jader Busato, Prof. Cícero Célio, Eduardo Barros e outros, pelo apoio e para que eu pudesse conciliar as atividades profissionais com a pós-graduação.

Ao Prof. Jarbas Rohwedder, da Universidade de Campinas, pelo valioso empréstimo de vários equipamentos de laboratório.

Ao INCTAA/CNPq, pelo apoio financeiro dado ao projeto.

RESUMO

As substâncias húmicas formam complexos com metais que são de extrema importância para regular a biodisponibilidade destes íons em ambientes terrestres e aquáticos, e por isso a caracterização desta interação é de grande valia. Estas substâncias podem ser estudadas quanto à sua interação com metais por titulação fluorimétrica, em experimentos que podem levar várias horas em função do longo tempo de estabilização dos complexos formados. Neste trabalho, um titulador automático capaz de realizar estas titulações de forma automática foi desenvolvido juntamente com um programa de computador para controlar o dispositivo e realizar análise dos dados. O equipamento realiza as análises utilizando uma bomba de seringa para adições de titulante (de 12,5 até 200 μL) e uma bomba peristáltica para transporte da solução até o detector, um fluorímetro comercial. Os resultados obtidos foram ajustados ao modelo de Ryan e Weber com a adaptação de Luster, e os parâmetros calculados para substâncias húmicas comerciais ($C_L = 3,91 \times 10^{-05}$, $I_{ML} = 17,06$, $\text{Log } K = 5,14$) foram comparados aos obtidos de titulações manuais das mesmas amostras ($C_L = 3,54 \times 10^{-05}$, $I_{ML} = 22,43$, $\text{Log } K = 5,14$), fornecendo resultados sem diferenças significativas com 95% de confiança. O titulador automático foi utilizado também para o estudo da matéria orgânica dissolvida em águas naturais coletadas próximas a Brasília, e os resultados obtidos foram corroborados pelas caracterizações de carbono orgânico dissolvido e espectroscopia de fluorescência sincronizada, que indicaram predominância de matéria orgânica não humificada, mas que não impediu a realização do experimento.

ABSTRACT

Humic substances constitute complexes with metals that are of utmost importance in regulating bioavailability of these ions in terrestrial and aquatic environments, which makes the characterization of these interactions of great value. These substances may be studied in sight of their interactions with metals by fluorimetric titrations by means of experiments that may take up to several hours until completion because of the long complex stabilization times. In this work, an automatic titration capable of performing said titrations was developed along with a computer software to control the device and analyze the data. The equipment executes the analysis using one syringe pump for titrant additions (from 12.5 up to 200 μL) and one peristaltic pump for solution transportations between the reactor and the detector, which is a commercial fluorometer. The results obtained were adjusted to the Ryan and Weber model with the adaptations proposed by Luster, and the calculated parameters for commercial humic substances ($C_L = 3.91 \times 10^{-05}$, $I_{ML} = 17.06$, $\text{Log K} = 5.14$) were compared to those obtained by manual titrations of the same sample ($C_L = 3.91 \times 10^{-05}$, $I_{ML} = 17.06$, $\text{Log K} = 5.14$), providing results with no statistical difference at a 95% confidence level. The automatic titrator was also used in studies of dissolved organic matter found in natural waters sampled near the city of Brasília, and the obtained results were corroborated by the total organic carbon measurement and synchronized fluorescence spectroscopy characterization, which indicated the greater abundance of non-humified organic matter, but that did not hinder the titrations experiments.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Substâncias húmicas.....	1
1.1.1 Caracterização das substâncias húmicas	3
1.2 Automação em química analítica.....	8
1.2.1 Automação de titulações volumétricas	9
1.2.2 Tituladores automáticos descritos na literatura	11
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Aparatos utilizados nos experimentos	17
3.2 Reagentes e soluções	20
3.3 Estudos preliminares para avaliação do sistema em fluxo	20
3.3.1 Sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para determinação de nitrito.	21
3.3.2 Sistemas para a determinação de quinina	24
3.3.3 Avaliação do procedimento de adição de padrão ao reator	30
3.4 Titulações fluorimétricas de substâncias húmicas	30
3.4.1 Ácido húmico comercial.....	31
3.4.2 Amostras de água natural	35
3.5 Caracterização das amostras de água natural	36
3.6 Desenvolvimento do programa de computador	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Estudos preliminares	39
4.1.1 Sistema SIA para determinação de nitrito	39
4.1.2 Sistemas para determinação de quinina	43
4.1.3 Avaliação do procedimento de adição de padrão ao reator	46
4.2 Titulações fluorimétricas de substâncias húmicas	49
4.2.1 Ácido húmico comercial.....	49
4.2.2 Amostras de água natural	60
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS.....	68

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

AF	Ácido Fúlvico
AH	Ácido Húmico
CL	Concentração de ligante
CM	Concentração de metal
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
K	Constante de Estabilidade Condicional
LED	Diodo Emissor de Luz
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
NED	n-(1-naftil) etilenodiamina
PARAFAC	Parallel Factor Analysis
SAM	Sulfanilamida
SH	Substâncias Húmicas
SIA	Análise por Injeção Sequencial
VS	Válvula Solenoide

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação dos diferentes mecanismos utilizados para adição de titulante em tituladores automáticos.	13
Tabela 2. Volumes de Cu^{2+} adicionados para cada leitura realizada.	34
Tabela 3. Pontos de amostragem de água natural.	36
Tabela 4. Tempos esperados para estabilização do complexo entre substância húmica e metal encontrados na literatura.	50
Tabela 5. Parâmetros ajustados ao modelo de Ryan e Weber das titulações de ácido húmico comercial realizadas de forma automática.	52
Tabela 6. Parâmetros ajustados ao modelo de Ryan e Weber das titulações de ácido húmico comercial realizadas de forma manual.	53
Tabela 7. Valores do modelo de Ryan e Weber obtidos após cálculo de I_{ML} pelo modelo de Luster para as titulações de ácido húmico comercial realizadas de forma automática e manual.	57
Tabela 8. Comparação entre os ajustes obtidos com a adaptação de Luster dos resultados das titulações manuais para dois pares de comprimentos de onda distintos.	59
Tabela 9. Resultados da análise de carbono orgânico dissolvido das amostras de água natural.	62
Tabela 10. Valores obtidos para os ajustes das titulações de água natural ao modelo de Ryan e Weber com a adaptação de Luster.	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Circuito elétrico utilizado para enviar o sinal digital para as válvulas solenoides.	17
Figura 2. Esquema do reator utilizado nos experimentos com substâncias húmicas. O corpo do reator era composto de um tubo de vidro com 54,70 mm de diâmetro externo e 70,0 mm de altura, com um volume total de aproximadamente 130 mL.....	19
Figura 3. Foto do reator utilizado nos experimentos com substâncias húmicas.....	19
Figura 4. Sistema de análise por injeção sequencial para determinação de nitrito. VS: Válvulas solenoides, AC: Adaptador para confluência.....	21
Figura 5. Segmentos criados durante análise em SIA de íons nitrito.....	22
Figura 6. Estado do sistema após inicialização. O brilho ao redor do tubo indica a posição e a solução com que ele está preenchido. (Válvulas na posição desligada). VS: Válvulas solenoides, AC: Adaptador para confluência	23
Figura 7. Sistema com bobinas para determinação de Quinina. B ₁ e B ₂ : bobinas de teflon com 2,0 e 4,0 m de comprimento, respectivamente. VS: válvula solenoide representada na posição desligada. TAP: Tubo de Adição de Padrão.....	25
Figura 8. Representações do preenchimento dos tubos em diferentes etapas do experimento. A sombra dos tubos representa a solução presente. Amarelo: Quinina. Cinza: Ar. Azul: Mistura reacional.....	28
Figura 9. Sistema para testes com quinina utilizando duas unidades de propulsão. TAP: Tubo de adição de padrão.....	29
Figura 10. Aparato experimental utilizado nos experimentos com substâncias húmicas. TAP: Tubo de adição de padrão.	31
Figura 11. Sequência lógica dos experimentos de titulação de substâncias húmicas.....	33
Figura 12. Pontos de amostragem de água natural na bacia hidrográfica do Rio Paranoá, Brasília, DF. A imagem de satélite foi obtida no programa Google Earth.....	35

Figura 13. Tela do programa desenvolvido ao término de uma titulação de ácido húmico comercial.....	38
Figura 14. Leituras de absorção de radiação para elaboração de curva analítica de nitrito. A linha tracejada indica a separação entre diferentes concentrações.....	40
Figura 15. Indicação do sinal analítico e a respectiva faixa do segmento de solução. O ponto <i>i</i> representa o início do sinal analítico referente ao nitrito, e o ponto <i>f</i> o final deste sinal. A média dos valores entre <i>i</i> e <i>f</i> foi utilizada como leitura do ponto.....	41
Figura 16. Curva analítica de nitrito obtida pela análise por SIA com fluxo monossegmentado. As barras de erro são relativas ao desvio padrão da média de três repetições.....	42
Figura 17. Curva analítica de quinina construída no sistema utilizando apenas uma unidade propulsora e bobinas.....	44
Figura 18. Foto do sistema durante a realização de uma titulação de ácido húmico comercial.....	45
Figura 19. Curva analítica de quinina construída no sistema utilizando duas unidades propulsoras e bobinas.....	46
Figura 20. Gota formada na saída do tubo de adição de padrão pela adição com o tubo suspenso.....	47
Figura 21. Aumento da intensidade de fluorescência em virtude da difusão de quinina do tubo de adição para o reator.....	48
Figura 22. Variação pelo tempo da fluorescência normalizada após adição de 12,5 µL de Cu ²⁺ 0,16 mol L ⁻¹	50
Figura 23. Curvas de titulação de ácido húmico comercial realizadas de forma automática pelo equipamento desenvolvido. Cada série de pontos representa uma repetição. ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 360/415 \text{ nm}$).....	51
Figura 24. Curvas de titulação de ácido húmico comercial realizadas de forma manual. Cada série de pontos representa uma repetição. ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 360/415 \text{ nm}$).....	53
Figura 25. Comparação das curvas obtidas a partir dos resultados de 3 titulações realizadas no equipamento desenvolvido e de forma manual. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três medidas. ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 360/415 \text{ nm}$).....	54

Figura 26. Comparação das intensidades de fluorescência médias para cada ponto das titulações realizadas de forma automática e manual.	55
Figura 27. Resultados obtidos após as titulações das amostras de água natural.	61
Figura 28. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para matéria orgânica dissolvida natural e para diferentes frações húmicas. ($\Delta\lambda = 18$ nm).	64
Figura 29. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para as amostras de água natural. ($\Delta\lambda = 18$ nm).	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Substâncias húmicas

As substâncias húmicas (SH) são as principais constituintes da matéria orgânica presente em águas naturais e em solos. Exercem influência em vários fenômenos físicos, químicos e bioquímicos que ocorrem naturalmente nos meios em que estão presentes [1]. Por serem formadas a partir de moléculas provenientes da decomposição de organismos e associadas também a outras biomoléculas presentes no meio, as SH não possuem fórmula molecular definida ou propriedades físico-químicas únicas e exatas, tais como massa molar, estrutura, constantes de acidez, etc. Pelo contrário, suas características dependem fortemente de sua origem e do meio em que estão quando estudadas. No entanto, pode-se afirmar que as substâncias húmicas possuem massa molar grande (da ordem de kilodaltons e dezenas de kilodaltons), apresentam coloração escura tanto na forma purificada quanto em solução, e interagem de várias formas nos ambientes onde são encontradas.

Apesar de serem estudadas há várias décadas [2], ainda não existe consenso na comunidade científica quanto à estrutura molecular das substâncias húmicas e de suas frações. De fato, pode-se considerar impossível a definição de uma fórmula molecular para as SH dadas as características que levam à formação dessas moléculas. Nesse sentido, o estudo das SH normalmente tem maior enfoque em caracterizá-las para elucidar os aspectos que são inerentes às suas funções no ambiente.

A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, em inglês) separa as substâncias húmicas em três frações, de acordo com a solubilidade em água em diferentes valores de pH. São considerados ácidos húmicos (AH) a fração solúvel apenas em meios alcalinos, ácidos fúlvicos (AF) a fração solúvel em qualquer pH, e humina a fração insolúvel, existindo, portanto, apenas em materiais sólidos [3].

Nas Ciências Agrárias, as substâncias húmicas são amplamente estudadas quanto aos seus efeitos, predominantemente positivos, no crescimento de plantas. Alguns dos efeitos observados em plantas que foram

tratadas com substâncias húmicas foram a indução do crescimento de raízes laterais [4,5] e a diminuição de espécies reativas de oxigênio em folhas [6].

As substâncias húmicas aquáticas constituem a principal fração da matéria orgânica dissolvida (MOD) encontrada em águas naturais e possuem influência principalmente na biodisponibilidade e especiação de outras substâncias e íons, como hormônios e metais. Os principais fatores que influenciam na formação de complexos entre substâncias húmicas e metais são as propriedades polifuncionais e as cargas conformacionais do ligante [7].

As propriedades polifuncionais são referentes aos grupos ligantes presentes na macromolécula da substância húmica, logo, possuem alta relação com o tipo de material orgânico que deu origem àquela molécula, e são os principais responsáveis pelas características dos complexos formados entre SH e metais [8]. Estes grupos ligantes são formados por espécies doadoras de elétrons, principalmente oxigênio na forma de ácidos carboxílicos e fenólicos [9]. Outros ligantes contendo oxigênio também encontrados em substâncias húmicas que contribuem para a formação de complexos são ácido salicílico, difenóis, catecol, ácido ftálico e ácido cítrico [8]. Grupos funcionais com outros elementos doadores de elétrons, como enxofre e nitrogênio, também podem influenciar nas interações, mas possuem papel secundário devido à pequena quantidade destes elementos (entre 1% e 3%, para ambos), quando comparados ao oxigênio (até 60% para ácidos fúlvicos) [7,10], e estão mais associados a interações com metais específicos, como a ligação entre mercúrio e grupos tióis [11].

As cargas conformacionais são dependentes da estrutura tridimensional da molécula, que pode variar dependendo de fatores como pH e força iônica do meio, concentração da SH e seu grau de hidratação, assim como interações com espécies carregadas positivamente que já estejam formadas. Esta variação na estrutura tridimensional da molécula leva à formação e à remoção de impedimentos estéricos, modificando a disponibilidade dos sítios ligantes para o metal.

A ampla variabilidade das estruturas das substâncias húmicas faz com que seja importante caracterizá-las de acordo com sua origem e forma

encontrada na natureza, para que sua influência naquele meio possa ser adequadamente estudada. As interações entre SH e agregados sólidos presentes em águas naturais podem causar, por exemplo, uma migração de metais para o sedimento do corpo aquático em que se encontram [12]. Sabe-se, também, que as substâncias húmicas interferem consideravelmente na utilização de nanomateriais para remoção de metais pesados de corpos aquáticos, no entanto, os resultados apresentados na literatura são controversos e demonstram interferências tanto positivas quanto negativas [13].

Ryan e colaboradores [14] identificaram que ácidos fúlvicos aquáticos influenciam na distribuição isotópica do cobre em solução, alterando a biodisponibilidade de cada isótopo diferentemente. Inúmeros estudos demonstram que a presença das SH diminui a biodisponibilidade de metais em águas naturais [15–17], embora existam relatos recentes que mostram o crescimento da disponibilidade em virtude do aumento de sítios ligantes na superfície das algas, que ocorre em função da presença de substâncias húmicas adsorvidas [18]. As propriedades complexantes das SH também podem afetar os seres humanos, desde que sejam encontradas na água de consumo, influenciando a absorção e distribuição de metais dissolvidos no organismo [19].

Considerando a grande importância das substâncias húmicas, é de suma importância que estas moléculas sejam estudadas para que se possa entender seus efeitos em águas naturais e solos, em especial quanto à biodisponibilidade e especiação de metais.

1.1.1 Caracterização das substâncias húmicas

Diversas técnicas analíticas são utilizadas no estudo de substâncias húmicas, incluindo técnicas espectroscópicas de absorção de radiação na região do ultravioleta, visível e infravermelho, e emissão de fluorescência; métodos eletroquímicos de caracterização, como voltametria e potenciometria; técnicas para o estudo do material sólido, como difração de raios-x; e também para identificação dos ambientes químicos de seus elementos por ressonância magnética nuclear. É comum também o emprego de métodos de separação, em especial eletroforese e cromatografia, para se obter características sobre o tamanho molecular e hidrofobicidade [7].

Para se entender a interação entre substâncias húmicas e outras espécies químicas, propriedades como a proporção entre grupos fenólicos e carboxílicos, índices de aromaticidade e hidrofobicidade e constantes de acidez e de formação de complexos devem ser conhecidas. As interações entre substâncias húmicas e outras espécies em solução podem ser estudadas por meio de diferentes abordagens. Os primeiros estudos na área utilizavam técnicas de saturação da SH com a espécie de interesse e posterior determinação do metal que foi complexado. Dhillon e colaboradores estudaram as interações entre SH, íons fosfato (KH_2PO_4 marcado isotopicamente com P^{32}) e zinco (ZnSO_4 marcado com Zn^{65}) determinando com contador de Geiger os ligantes que remaneceram complexados após troca em resina catiônica [20]. De forma similar, Picard e Felbeck estudaram o efeito das SH na solubilidade de íons Fe^{2+} , no entanto utilizaram o método de deslocação dos íons com acetato de amônio para disponibilizar o Fe em solução, que foi determinado por absorção atômica [21]. Estes métodos forneceram informações valiosas sobre a interação SH-metal, mas não permitem o cálculo de constantes de equilíbrio já que não contém informações sobre as interações em função da concentração de metal.

Alguns modelos foram desenvolvidos para se estudar a capacidade de complexação de cobre frente a substâncias húmicas com o objetivo de se obter a constante de estabilidade condicional do complexo metal-SH (K). Esta constante é definida em função das concentrações de metal ([M]), substância húmica livre ([L]) e complexo ([ML]). Considerando que as interações obedecem a uma estequiometria 1:1, K pode ser definido como:

$$K = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} \quad 1$$

Como não se pode determinar diretamente a concentração de ligante, o valor de K pode ser obtido através de titulações em que a concentração de metal livre é observada em função da concentração total do metal em solução. Segundo o modelo desenvolvido, independentemente, por van den Berg [22] e Ruzic [23]:

$$\frac{[M]}{[ML]} = \frac{1}{K[L]} + \frac{[M]}{[L]} \quad 2$$

Os resultados obtidos formam uma reta pela relação entre $[M]/[ML]$ e $[M]$, com inclinação igual a $[L]^{-1}$. O valor de K pode ser obtido pela divisão da inclinação pelo intercepto e o valor de $[ML]$ pela subtração do metal adicionado pelo metal detectado. Os experimentos consistem na determinação de $[M]$ em cada ponto da titulação, que pode ser realizada por métodos eletroquímicos (voltametria e potenciometria) ou espectroscópicos (espectroscopias de absorção e emissão atômica) [7].

Apesar de não se conhecer detalhadamente as estruturas moleculares das substâncias húmicas, sabe-se que elas possuem muitos anéis aromáticos condensados e ligações duplas conjugadas, grupos que comumente emitem fluorescência. Ao interagir com íons metálicos estes grupos passam a ter características físico-químicas diferentes e parte da fluorescência é suprimida. Este fenômeno é muito utilizado para a caracterização das interações entre substâncias húmicas e metais, pois os resultados obtidos são relacionados diretamente às SH, e não indiretamente quando se realiza medidas do metal livre em solução.

Diferentes abordagens experimentais foram desenvolvidas para se estudar as interações entre substâncias húmicas e metais pela supressão de fluorescência. Estes métodos consistem na observação da fluorescência emitida pela matéria orgânica frente a diferentes concentrações do metal. As medidas de fluorescência podem ser realizadas em modo emissão [24], sincronizado [25] ou pela matriz de excitação-emissão [26]. Os resultados podem ser analisados diretamente ou por ferramentas quimiométricas, como decomposição PARAFAC [27], e então ajustados a um modelo matemático para a obtenção dos parâmetros físico-químicos da amostra [28–30].

O modelo de Ryan e Weber [24] para determinação da constante de estabilidade condicional (K) e da concentração de ligante (C_L), baseado na supressão de fluorescência observada em modo emissão, consiste na titulação fluorimétrica das substâncias húmicas com metais, e é descrito de acordo com a seguinte equação:

$$I = \frac{I_{ML} - 100}{2KC_L} \left[(KC_L + KC_M + 1) - \sqrt{(KC_L + KC_M + 1)^2 - 4K^2C_LC_M} \right] + 100 \quad 3$$

Nesta abordagem, a substância húmica é titulada com pequenos volumes de uma solução de concentração conhecida do metal, e a fluorescência emitida é medida para cada ponto em um par $\lambda_{exc}\lambda_{em}$ previamente definido. O experimento é realizado até que a fluorescência emitida (I) se aproxime do valor da fluorescência do ligante complexado (I_{ML}). Os valores de constante de estabilidade condicional (K), concentração do ligante (C_L) e da fluorescência do ligante complexado são obtidos por ajuste não-linear da fluorescência emitida em função da concentração de metal adicionado (C_M).

O modelo de Ryan e Weber também foi desenvolvido para um sistema em que as interações são de proporção 1:1. Além desta suposição, o modelo considera que as moléculas fluorescentes são representativas de todo o sistema, e que apesar de ser uma mistura complexa, as SH têm um comportamento médio representado por K e C_L [24].

Desde que foi proposto, o modelo foi amplamente utilizado para a caracterização das interações entre substâncias húmicas e metais. Por exemplo, Wu e colaboradores utilizaram o modelo de Ryan e Weber para caracterizar as interações de ácidos fúlvicos com fulereno [31]. Plaza e colaboradores estudaram ácidos húmicos extraídos de composto orgânico e solo frente à complexação com cobre, zinco, cádmio e chumbo, e obtiveram resultados indicando que os AH diminuem a biodisponibilidade destes metais [26]. Sodr e e Grassi verificaram diferenças na matéria orgânica dissolvida presente em rios em fun o de influências antrópicas e efeitos sazonais [32].

Apesar de ser relativamente simples experimentalmente, o método proposto por Ryan e Weber possui algumas características que devem ser observadas durante a sua execu o para se garantir resultados confiáveis:

- A alíquota utilizada para a leitura de fluorescência deve ser totalmente retornada ao reator, para que não haja mudanças no volume total além do que foi adicionado de titulante.
- O volume de titulante adicionado deve ser o menor possível para minimizar a dilui o da amostra, que pode alterar o comportamento

das substâncias húmicas ali presentes. Este ponto é importante especialmente no caso de titulações de águas naturais sem extração dos ácidos fúlvicos.

- A reação de complexação entre a SH e o titulante normalmente é lenta, e por isso deve-se esperar um intervalo entre a adição do titulante e a leitura de fluorescência.

Para se evitar erros relacionados à transferência manual da mistura para a cubeta do fluorímetro, alguns autores relatam o uso de bomba peristáltica para transportar a mistura até a cubeta em fluxo [24,26,33], procedimento que facilita a realização do experimento, mas não resolve as outras dificuldades mencionadas acima.

Em relação ao tempo de equilíbrio da reação, existem duas alternativas. A primeira, e mais óbvia, consiste em aguardar o tempo previamente determinado para cada ponto, tomando-se os cuidados necessários para que a marcação do tempo seja precisa, o que torna o experimento longo (chegando a várias horas de execução) e tedioso (o analista deve realizar procedimentos várias vezes no tempo correto, durante toda a duração da análise, prejudicando sua repetibilidade). A segunda alternativa, proposta inicialmente por Ventry [33], consiste na utilização de várias misturas com diferentes concentrações de titulante, de forma que para cada ponto da curva de titulação, um frasco diferente é utilizado, e todos os pontos são preparados e lidos ao mesmo tempo. Essa abordagem foi bem aceita por outros pesquisadores e utilizada em diversos trabalhos [31,34,35].

Um fator determinante na comparação das duas propostas é a diferença nas interações que ocorrem entre substância húmica e metal quando a adição é realizada de forma gradual, com tempo suficiente para equilíbrio, e de forma única para cada ponto da titulação. A complexação das SH com Fe(III) causa mudanças conformacionais em sua estrutura, disponibilizando sítios que não estavam disponíveis na conformação inicial [36], e efeitos similares são esperados pela interação com Cu(II) e outros metais. Este tipo de fenômeno é o mais esperado em ambientes naturais, onde o aporte destes metais

normalmente ocorre de forma gradual e em volumes da escala dos corpos aquáticos, que permitem largas diluições e tempos de equilíbrio.

Apesar de se apresentar como uma boa alternativa para o problema da longa duração do experimento, a proposta de Ventry também apresenta dificuldades experimentais não existentes no método original. Com uma mistura por ponto da curva de titulação, o gasto de amostra e reagentes aumenta significativamente, o que pode ser problemático no caso de uso de titulantes certificados, que tem alto custo, e de amostras disponíveis em baixas quantidades, situação frequente devido à baixa eficiência da extração de substâncias húmicas.

O uso de vários frascos também aumenta a probabilidade de erros experimentais e gera a possibilidade de que diferenças entre os pontos sejam provenientes destes erros, e não do efeito das concentrações. Ademais, a manipulação de muitas misturas em um mesmo experimento pode ser trabalhosa, e a repetibilidade entre o manuseio das soluções e o tempo de leitura após a adição do reagente fica prejudicada. Conclui-se, então, que a abordagem original proposta por Ryan e Weber é mais coerente para a determinação das propriedades das substâncias húmicas relacionadas ao experimento.

1.2 Automação em química analítica

A automação de procedimentos realizados em laboratórios de química tem como principais objetivos a redução do tempo gasto nos experimentos e o aumento na qualidade dos resultados em virtude da diminuição dos erros causados provenientes do analista, tendo como consequência análises mais baratas e resultados mais confiáveis [37]. Em química analítica, define-se como sequência analítica o grupo de etapas pelas quais uma análise química deve passar para que seja completa. Estas etapas são definição do problema analítico, seleção do método, amostragem, preparo de amostra, medida da variável, calibração, avaliação dos resultados e ação [38]. Com exceção das etapas iniciais de definição do problema e seleção do método, e da etapa final, ação, para todas as outras existe a possibilidade de se implementar, parcial ou totalmente, procedimentos automatizados. Em alguns casos, a automação inclusive serve como elo entre as etapas.

1.2.1 Automação de titulações volumétricas

Classicamente, uma titulação é definida como um experimento em que um reagente padrão conhecido, o titulante, reage de forma estequiométrica e reproduzível com o analito, que terá sua concentração determinada de acordo com a quantidade de titulante utilizado. Em titulações volumétricas, o volume do titulante é medido para se calcular a quantidade de analito presente [38]. Essa definição abrange apenas titulações para determinação de concentração, e pode ser expandida para uma mais ampla, em que a medida observada não é necessariamente uma concentração, mas apenas um processo que causa um efeito proporcional à concentração do titulante e que depende somente das características do analito, ou seja, titulações em que o analito não tem sua concentração medida, mas é caracterizado pelo seu comportamento frente ao titulante, como, por exemplo, a caracterização de substâncias húmicas.

A titulação, apesar de ser um método clássico, ainda é empregada na análise de inúmeros analitos em diferentes amostras. Quando as características da matriz amostral são bem conhecidas e os devidos cuidados analíticos são tomados, as figuras de mérito obtidas com métodos titrimétricos como limite de detecção e sensibilidade podem ser, muitas vezes, comparáveis àquelas de métodos instrumentais. Para que isso seja alcançado, os erros experimentais devem ser minimizados, principalmente no que se refere às medições e decisões tomadas pelo analista, em especial durante as etapas de pipetagem e observação de resultados, quando necessário. Neste sentido, a automação de procedimentos de titulação surge como uma alternativa para diminuir a interferência humana nas análises, colaborando não só para a otimização do seu desempenho analítico, mas também como ferramenta para reduzir o consumo de insumos químicos, uma vez que o controle de pequenos volumes, da ordem de microlitros, pode ser facilmente obtido a partir de tituladores automáticos com alta confiabilidade.

Em uma titulação volumétrica, existem dois fatores que devem ser cuidadosamente controlados para que o resultado obtido seja confiável: a adição de titulante e a aquisição do sinal analítico (determinação do ponto final ou acompanhamento de determinada propriedade). O titulante deve ser uma solução de concentração bem estabelecida, e o volume adicionado deve ser

medido com precisão e exatidão. Nas titulações para determinação de concentração, o ponto final da titulação deve se aproximar ao máximo do ponto de equivalência, e sua definição também é de extrema importância para a qualidade dos resultados. Em titulações de caracterização, o ponto final está intimamente relacionado com a grandeza física sendo estudada, e deve ser analisado caso-a-caso. A automação pode ser utilizada como ferramenta poderosa para que esses fatores sejam controlados com sucesso.

A adição de titulante pode ser realizada por meio de mecanismos de propulsão de solução, que muitas vezes também são utilizados no mesmo experimento para o transporte de outras soluções, como indicador, amostra e soluções de limpeza. Os mecanismos mais comuns utilizados são bombas peristálticas e bombas de seringas, mas existem também tituladores que utilizam bombas recíprocas, de pistão e solenoides, e também conta-gotas, buretas automatizadas e até gás comprimido para realizar a adição de titulante. As bombas frequentemente são utilizadas em sistemas contendo válvulas para o controle e direcionamento do fluxo das soluções. Cada um desses mecanismos possui vantagens e desvantagens que justificam seu uso em diferentes aplicações [39–41].

A determinação do ponto final depende, em primeiro lugar, do tipo de titulação que será realizada. Enquanto as titulações com ponto final detectado por mudanças de cor na solução exigem uma adaptação em relação à clássica detecção visual, em muitos casos a detecção é intrinsecamente realizada de forma eletrônica, como nas medidas eletroquímicas de potenciometria ou amperometria, o que facilita substancialmente a automação de experimentos deste tipo. As determinações de ponto final realizadas de forma visual normalmente podem ser automatizadas por meio de técnicas fotométricas, pela detecção da mudança na absorção de radiação visível de certo comprimento de onda pela solução.

Os recursos que podem ser utilizados para automação de um experimento de titulação são vastos, e vão variar de acordo com o problema analítico a ser resolvido e a disponibilidade de recursos. Além da melhoria nos

resultados mencionada anteriormente, a automação de titulações volumétricas também pode ter as seguintes vantagens:

- Possibilidade de miniaturização, que resulta na diminuição das quantidades de insumos gastos e resíduos produzidos.
- Aumento da frequência amostral, que possibilita a análise em escalas industriais.
- Diminuição de custos, como consequência dos dois pontos anteriores.
- Aumento de reprodutibilidade devido a diminuição da interferência de um analista.

1.2.2 Tituladores automáticos descritos na literatura

Devido à ampla utilização de titulações volumétricas, são muitas as abordagens que podem ser utilizadas para se automatizar esse tipo de análise. Os tituladores automáticos descritos na literatura variam especialmente quanto aos dois fatores principais citados anteriormente, que são a forma de adição de titulante e o modo de aquisição do sinal analítico. Existem, no entanto, diversas outras características que normalmente justificam apenas a modificação de algum sistema já existente, como mudanças na ordem de grandeza dos volumes de solução utilizados, implementação de ferramentas para auxílio na troca de amostras e diminuição dos custos do dispositivo.

O uso de um conta-gotas é uma das abordagens mais simples utilizadas para se automatizar, mesmo que parcialmente, uma titulação. Nestes sistemas, é comum que a maioria das etapas do experimento sejam realizadas manualmente, como adição da amostra e de indicador ou a determinação do ponto final. Os conta-gotas podem ser criados de duas maneiras, sendo a mais comum um sistema que detecta o caimento de uma gota pela interrupção momentânea de um feixe de radiação infravermelha, mecanismos amplamente disponíveis comercialmente [42–44]. Outra forma de se contar gotas precisamente consiste na detecção da corrente elétrica que passa em um circuito que é fechado quando a gota é formada e entra em contato com um fio de aço [45].

Conta-gotas possuem baixa precisão, e por isso são utilizados apenas em análises que não exigem grande reprodutibilidade. Maior precisão pode ser obtida, por exemplo, pela utilização de bombas peristálticas, de seringa, de pistão ou solenoides, normalmente em conjunto com válvulas solenoides para direcionar o fluxo das soluções [46,47] ou com válvulas de fluxo em *loop* no casos de sistemas em fluxo [48–50].

O uso de bombas peristálticas em tituladores automáticos é bem comum [47,48,51], pois estes dispositivos são comumente utilizados também para outros procedimentos da análise, como adição de amostra e lavagem do sistema. As bombas peristálticas, no entanto, possuem precisão menor que as bombas de seringa, principalmente pela medição indireta do volume adicionado (por meio das medidas de vazão e tempo) e pelo desgaste dos tubos utilizados [52]. Em uma bomba de seringa o pistão é controlado por um motor de passos, que oferece alta precisão e pode ser empregado em conjunto com seringas de diversos volumes, e por isso são utilizadas quando volumes muito pequenos de titulante são necessários [48,50]. Uma bomba de pistão pode ser utilizada no lugar de uma bomba de seringa, e apesar de permitir fluxos maiores de solução, não atinge a mesma precisão [53].

Os mecanismos utilizados para adição de titulante podem ser comparados subjetivamente de acordo com algumas características principais, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação dos diferentes mecanismos utilizados para adição de titulante em tituladores automáticos.

Dispositivo	Precisão	Volume mínimo	Características da operação	Custo
Bomba de seringa	Alta	Baixo	É necessário movimento em ambos sentidos, o que normalmente exige uso de válvulas multiportas.	Médio
Bomba peristáltica	Média	Médio	Os tubos utilizados sofrem desgaste com o uso e a medição do volume depende do tempo de operação e do diâmetro do tubo, demandando calibração.	Alto
Outras bombas	Baixa	Médio	O volume adicionado também depende do tempo de operação e demandam calibração.	Baixo
Conta-gotas	Baixa	Alto	É imprescindível um mecanismo para contar as gotas, assim como formas de se iniciar e interromper a adição de titulante.	Baixo

O primeiro fator observado ante a escolha do detector que será utilizado é o fenômeno que ocorre em função da adição de titulante. As medições mais comuns são as espectroscópicas (absorção de radiação ultravioleta ou visível e emissão de fluorescência nesta mesma faixa) e as eletroquímicas (condutividade e potenciometria com eletrodos de pH e outros íon-seletivos).

As titulações com detecção por mudança na coloração de um indicador são as mais clássicas, e podem ser automatizadas de maneira relativamente simples. Em equipamentos dedicados a análises específicas, o sistema de detecção pode ser construído facilmente com um diodo emissor de luz (LED) e um fotodiodo como fonte e detector de radiação, respectivamente [46,49,54], ou até mesmo LEDs idênticos para ambas funções [47]. Detectores comerciais também são facilmente adaptáveis aos sistemas em fluxo, já que normalmente possuem saída do sinal analítico que pode ser interpretado pelo programa do titulador automático, e são frequentemente utilizados nos equipamentos descritos na literatura [48,50]. Detectores de fluorescência são utilizados de maneira similar aos de absorção molecular e também podem ser construídos em laboratório [55] ou comerciais.

Os detectores por meio de métodos eletroquímicos são facilmente automatizados, pois o sinal analítico já é gerado de forma eletrônica, logo, os

desafios se concentram principalmente na instalação dos sensores no equipamento. As medidas potenciométricas, de íons H_3O^+ e outras espécies para as quais existem eletrodos seletivos, e as amperométricas podem ser realizadas por meio da adaptação de eletrodos e microeletrodos aos próprios frascos de reação de diversas formas em tituladores automáticos [45,46,56,57].

Os métodos para determinação de ponto final discutidos, tanto visuais quanto eletroquímicos, também são utilizados como detectores do ponto final em titulações coulométricas, no entanto, esta técnica se diferencia das titulações volumétricas quanto à origem do titulante. Na titulação coulométrica, ou coulometria de corrente controlada, o titulante é gerado *in situ* pela oxidação ou redução de um reagente auxiliar, com o emprego de um galvanostato que fornece o potencial e mantém a corrente elétrica constante no sistema. As principais vantagens desta abordagem são uma maior facilidade no controle de titulante adicionado, pois o fornecimento de pequenas quantidades de cargas elétricas é mais preciso do que de pequenos volumes. Obviamente, não há necessidade de um sistema de propulsão de solução para o titulante.

Titulações coulométricas também são alvos de estudos de automação e miniaturização. Nestes casos, o enfoque normalmente é direcionado à diminuição dos custos e dos gastos com reagentes, como no titulador desenvolvido por Kanyanee e colaboradores para a titulação coulométrica em 50 μL de solução [58] e na célula desenvolvida por Oliveira e colaboradores para titulações coulométricas em fluxo-batelada [59]. No caso de algumas determinações, como de água em substâncias orgânicas pelo método de Karl-Fischer e do índice de bromo, tituladores automáticos comerciais são amplamente disponíveis e os mais utilizados em pesquisas e em laboratórios de rotina [60–62].

Voltando à análise de SH por titulação, a abordagem experimental proposta inicialmente por Ryan e Weber ainda é considerada como uma das mais importantes para a caracterização da interação entre substâncias húmicas e outras substâncias, especialmente metais. Esta abordagem, no entanto, possui características que tornam a realização do experimento extremamente morosa, o que não só dificulta sua realização e repetição, como se torna uma fonte de

erros em virtude da fadiga do analista após várias horas de análise ininterruptas. Este problema pode ser minimizado, e talvez até eliminado, pela utilização de técnicas de automação analítica, com foco na eliminação da presença do analista durante o experimento, e aumento da qualidade dos resultados pela utilização de dispositivos mais precisos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi o desenvolvimento de um equipamento que realize titulações fluorimétricas para a caracterização de substâncias húmicas de forma automática, e a avaliação do sistema desenvolvido por meio da realização de titulações de diferentes amostras e comparação destes resultados com o método manual.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

1. Identificar a melhor abordagem para o desenvolvimento do equipamento, em relação aos dispositivos utilizados e seu modo de operação;
2. Desenvolver um programa de computador capaz de controlar estes dispositivos e exibir, armazenar e analisar os resultados obtidos;
3. Utilizar o equipamento desenvolvido em titulação de ácido húmico comercial, comparando os resultados obtidos com titulações das mesmas amostras realizadas de forma manual;
4. Aplicar o instrumento em amostras de água natural e avaliar os resultados obtidos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aparatos utilizados nos experimentos

Alguns dispositivos foram utilizados em diversas etapas do desenvolvimento do equipamento, e são detalhados nesta seção.

Para a movimentação de pequenos volumes de solução com alta precisão, foi utilizada uma bomba de seringa (PSD/4, Hamilton) com uma seringa de 12,50 mL (Model 1025.5 TLL SYR, Hamilton), com volume mínimo dispensável igual 4,2 μ L, conectada a uma válvula de 8 vias (HVCX, 8-5, Hamilton). A bomba de seringa foi conectada ao microcomputador do instrumento através de porta serial RS-232. Uma fonte AC/DC com saída de 24 Volts e 2,0 A foi utilizada para alimentação elétrica.

Nos testes iniciais, foram utilizadas válvulas solenoides (P/N 225T032, NResearch Corporated) as quais foram acionadas através de um circuito elétrico *labmade* (Figura 1) baseado em um banco de transistores (ULN2803) alimentado com 24 V.

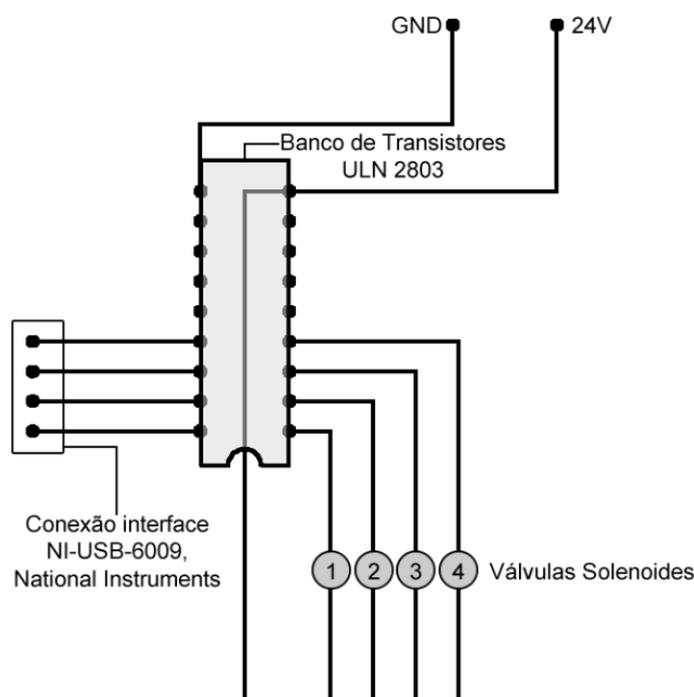


Figura 1. Circuito elétrico utilizado para enviar o sinal digital para as válvulas solenoides.

Para medidas de absorção molecular na região do espectro visível foi utilizado um fotômetro *labmade* baseado em um LED de cor verde (λ_{max} 520 nm),

como fonte de radiação e um fotodiodo (OPT101) como detector [54]. Para controlar as válvulas solenoides e receber os sinais analógicos gerados pelo fotômetro, foi utilizada uma interface USB (NI-USB-6009, National Instruments).

Nos experimentos de fluorescência, foi utilizado um fluorímetro (Digital Fluorometer Turner Quantech FM109510-33, Thermo Scientific) com filtro ótico de excitação em 360 nm e de emissão em 415 nm. O fluorímetro foi conectado ao microcomputador através de conexão serial RS-232. As leituras de fluorescência foram realizadas em cubeta de fluxo, fabricada em quartzo, com volume interno de 440 μ L e caminho ótico de 10 mm (59FL, NSG Precision Cells).

No sistema com duas unidades propulsoras foi utilizada uma bomba peristáltica (IPC, Ismatec) para o transporte de solução até o fluorímetro. A bomba peristáltica foi conectada ao microcomputador através de conexão serial RS-232.

Nos experimentos com substâncias húmicas, foi utilizado um reator fabricado com um tubo de vidro com 54,70 mm de diâmetro externo e 70,0 mm de altura, com um volume total de aproximadamente 130 mL (Figura 2). A este tubo foram acopladas uma base e uma tampa fabricadas em nylon. A tampa continha dois orifícios, um para adição de reagente e o outro para entrada de excesso de solução durante o procedimento de leitura. A base possuía duas saídas para as laterais, sendo que apenas uma delas foi utilizada para retirada da solução para leitura do sinal analítico. Uma fotografia do reator é apresentada na Figura 3.

O controle de todo o hardware incluindo, bomba peristáltica, bomba de seringa e válvulas solenoides, assim como a aquisição dos sinais analíticos provenientes do fotômetro e do fluorímetro foram realizados por computador através de um software escrito em Visual Basic .NET descrito em maiores detalhes na seção 3.6.

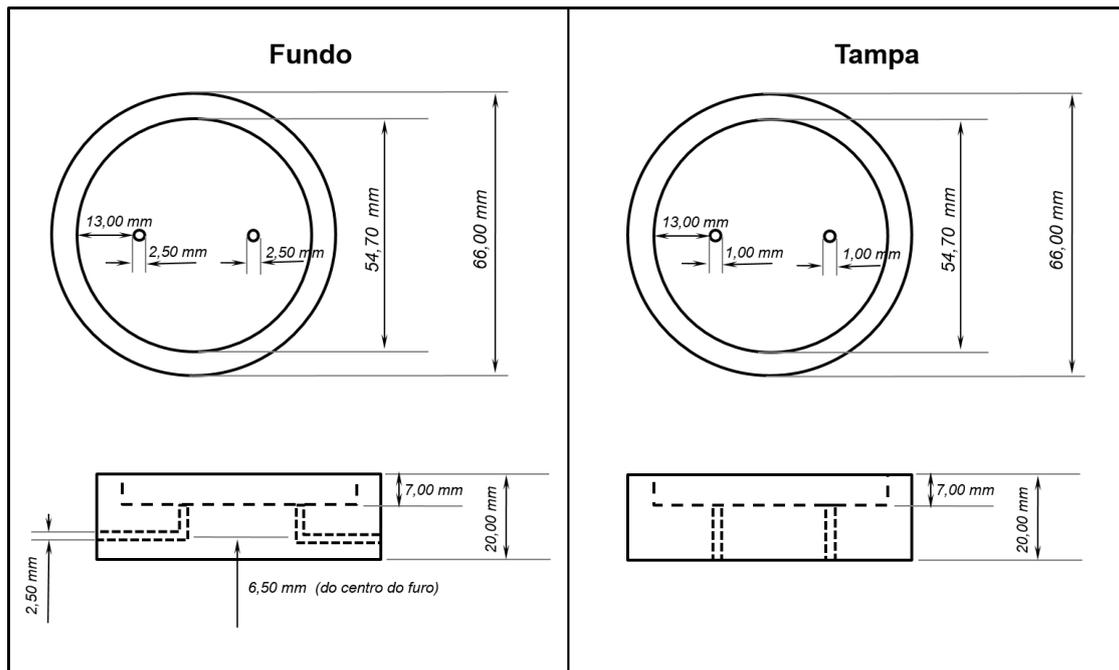


Figura 2. Esquema do reator utilizado nos experimentos com substâncias húmicas. O corpo do reator era composto de um tubo de vidro com 54,70 mm de diâmetro externo e 70,0 mm de altura, com um volume total de aproximadamente 130 mL.

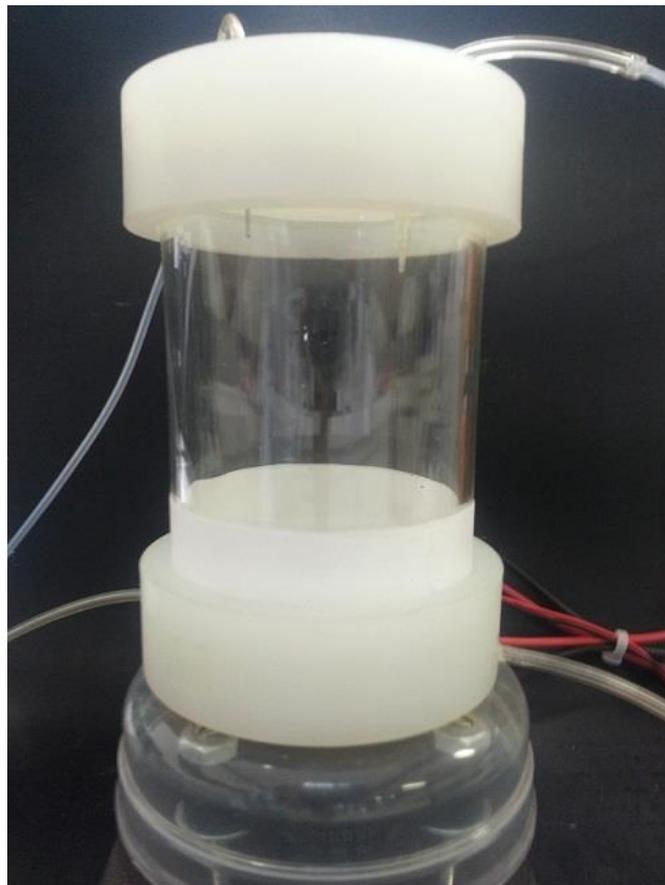


Figura 3. Foto do reator utilizado nos experimentos com substâncias húmicas.

3.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções utilizadas foram preparadas em água destilada ou purificada por osmose reversa.

A solução indicadora de nitrito, conhecida como reagente de Griess, continha uma mistura de n-(1-naftil) etilenodiamina (NED) ($0,50 \text{ g L}^{-1}$) e sulfanilamida (SAM) ($0,20 \text{ g L}^{-1}$) em ácido clorídrico 0,5% v/v. Essas soluções foram preparadas a partir da dissolução/diluição dos reagentes NED (Vetec), SAM (Synth) e ácido clorídrico (Ecibra), e eram armazenadas em frasco âmbar e utilizadas por no máximo 7 dias. A solução estoque de NO_2^- foi preparada pesando-se KNO_2 (Aldrich, 97%) para o preparo de uma solução estoque $1,00 \text{ g L}^{-1}$ que foi diluída para uma solução com $1,00 \text{ mg}$ de NO_2^- por litro.

Nos estudos preliminares utilizando quinina, a solução estoque 250 mg L^{-1} foi preparada a partir da dissolução da massa apropriada de quinina (Sigma, 98%) em H_2SO_4 (Vetec) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$,

O ácido húmico comercial utilizado foi preparado pela dissolução em água destilada de ácido húmico grau técnico (Aldrich), cujas impurezas não foram determinadas, na concentração de 40 mg L^{-1} imediatamente antes de sua utilização, e então o pH da solução foi ajustado para 6,0 com HNO_3 10% v/v. Nas titulações, utilizou-se sulfato de cobre (Reagen, 99,5%) de concentração aproximadamente $0,16 \text{ mol L}^{-1}$ como fonte de íons Cu^{2+} .

3.3 Estudos preliminares para avaliação do sistema em fluxo

Nesta etapa, algumas montagens foram realizadas para servir de base para o desenvolvimento do equipamento e para a familiarização com o hardware que seria utilizado nas outras fases do projeto. Em um primeiro momento, um sistema em fluxo monossegmentado [63] para determinação fotométrica de íons nitrito foi montado para verificar a capacidade do software de controlar corretamente a bomba de seringa e as válvulas solenoides. Em seguida, foram montados sistemas de análise similares à análise em batelada para a determinação fluorimétrica de quinina, os quais foram utilizados como modelo para se avaliar o desempenho geral do instrumento a partir de um sistema químico bem conhecido.

3.3.1 Sistema de análise por injeção sequencial (SIA) para determinação de nitrito.

O primeiro protótipo desenvolvido consistiu em um sistema SIA monossegmentado para a determinação fotométrica de NO_2^- baseada na reação de Griess [64]. O sistema utilizado (Figura 4) continha uma bomba de seringa, quatro válvulas solenoides, um adaptador para confluência dos fluidos fabricado em acrílico, uma bobina de retenção (tubo de teflon com 1,4 m de comprimento e 2,0 mm de diâmetro interno) e o fotômetro de LED. Os dispositivos foram conectados por tubos de teflon com 0,8 mm de diâmetro interno.

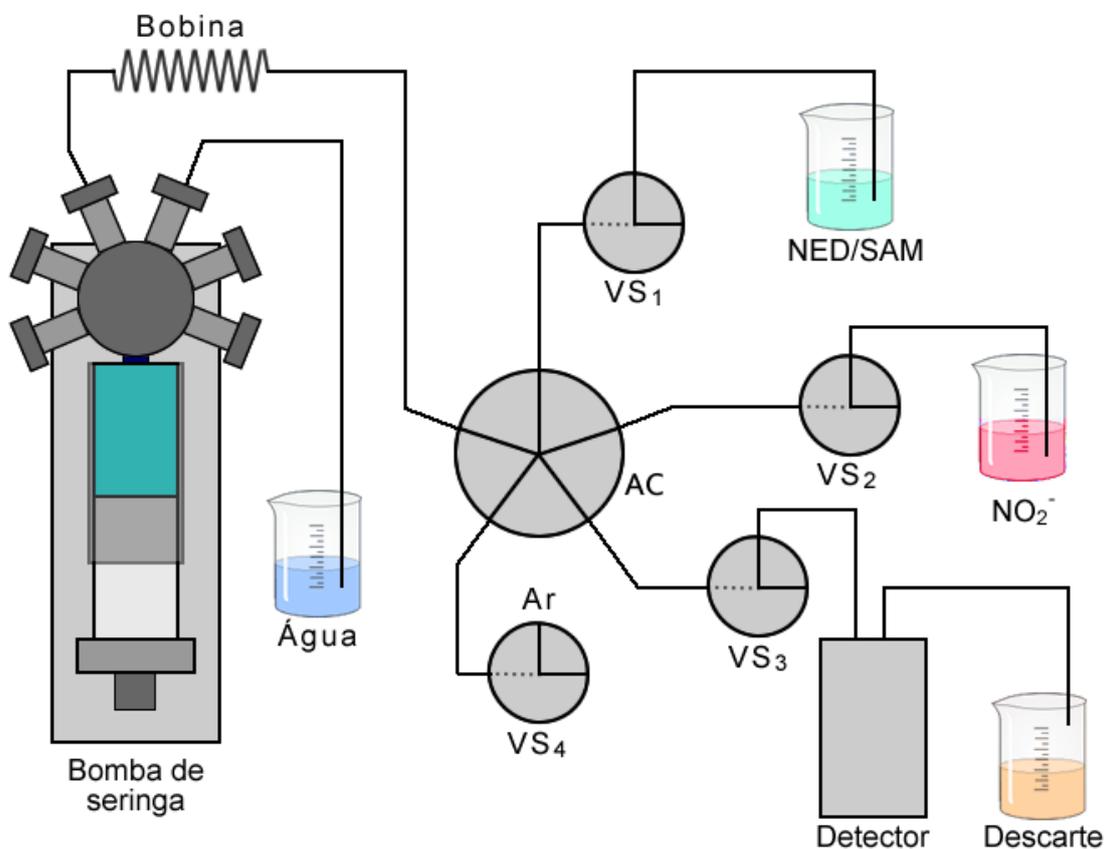


Figura 4. Sistema de análise por injeção sequencial para determinação de nitrito. VS: Válvulas solenoides, AC: Adaptador para confluência.

Nesta análise foram desenvolvidas curvas analíticas com soluções de concentração na faixa de 0,1 a 0,5 mg L^{-1} de NO_2^- por meio da diluição de um padrão 1 mg L^{-1} realizada pelo sistema em fluxo. Cada ponto da curva analítica era criado em um fluxo monossegmentado, que consistia em solução

carreadora, ar, segmentos das soluções de analito e indicador, e novamente ar e solução carreadora, como mostra a Figura 5.

Branco	Água	300 μ L Ar	1000 μ L Griess				300 μ L Ar	Água	
0,1 mg L ⁻¹	Água	300 μ L Ar	300 μ L Griess		300 μ L Griess		300 μ L Ar	Água	
	└── 50 μ L NO ₂ ⁻ ─┘								
0,2 mg L ⁻¹	Água	300 μ L Ar	267 μ L Griess		266 μ L Griess		267 μ L Griess	300 μ L Ar	Água
	└── 100 μ L NO ₂ ⁻ ─┘								
0,3 mg L ⁻¹	Água	300 μ L Ar	233 μ L Griess	150 μ L NO ₂ ⁻	234 μ L Griess	150 μ L NO ₂ ⁻	233 μ L Griess	300 μ L Ar	Água
0,4 mg L ⁻¹	Água	300 μ L Ar	200 μ L Griess	200 μ L NO ₂ ⁻	200 μ L Griess	200 μ L NO ₂ ⁻	200 μ L Griess	300 μ L Ar	Água
0,5 mg L ⁻¹	Água	300 μ L Ar	167 μ L Griess	250 μ L NO ₂ ⁻	166 μ L Griess	250 μ L NO ₂ ⁻	167 μ L Griess	300 μ L Ar	Água

Figura 5. Segmentos criados durante análise em SIA de íons nitrito.

O procedimento experimental foi dividido em duas etapas. Inicialmente, uma inicialização do sistema era realizada para se lavar as conexões e posicionar as soluções no centro do adaptador de confluência. Durante esta etapa, o êmbolo da bomba de seringa estava sempre preenchido com água. O grande comprimento da bobina foi necessário para garantir que o segmento não chegasse à seringa, causando uma possível contaminação. A inicialização era realizada de acordo com os seguintes passos:

1. Os tubos utilizados nas conexões entre as válvulas solenoides e os frascos com as soluções de amostra (NO₂⁻) e de indicador (NED/SAM) eram manualmente posicionados para o frasco de descarte.
2. Aspirava-se 12,00 mL de água destilada para a seringa.
3. As válvulas solenoides VS₁, VS₂ e VS₃ eram acionadas, de modo sequencial, permitindo a lavagem das respectivas linhas com 4,00 mL de água destilada através de cada válvula.
4. Os tubos eram reposicionados para seus respectivos frascos, já contendo as soluções.
5. 5,00 mL de água destilada eram aspirados para a seringa.

6. 2,00 mL da solução de nitrito eram aspirados através de VS₂, e em seguida 1,00 mL da solução aspirada era dispensado através de VS₃, permitindo preenchimento da linha entre VS₂ e o adaptador de confluência com solução de nitrito.
7. 2,00 mL da solução do reagente NED/SAM eram aspirados através de VS₁, e então 1,00 mL dispensados através de VS₃, permitindo preenchimento da linha entre VS₁ e o adaptador de confluência com solução de NED/SAM.
8. Para finalizar todo o volume contido na seringa (7,00 mL) era dispensado através de VS₃ para lavagem da linha do detector.

Ao término dessa inicialização, os tubos estavam preenchidos até o adaptador para confluência dos fluídos, de forma que volumes exatos de cada solução e de ar poderiam ser aspirados, como ilustra a Figura 6.

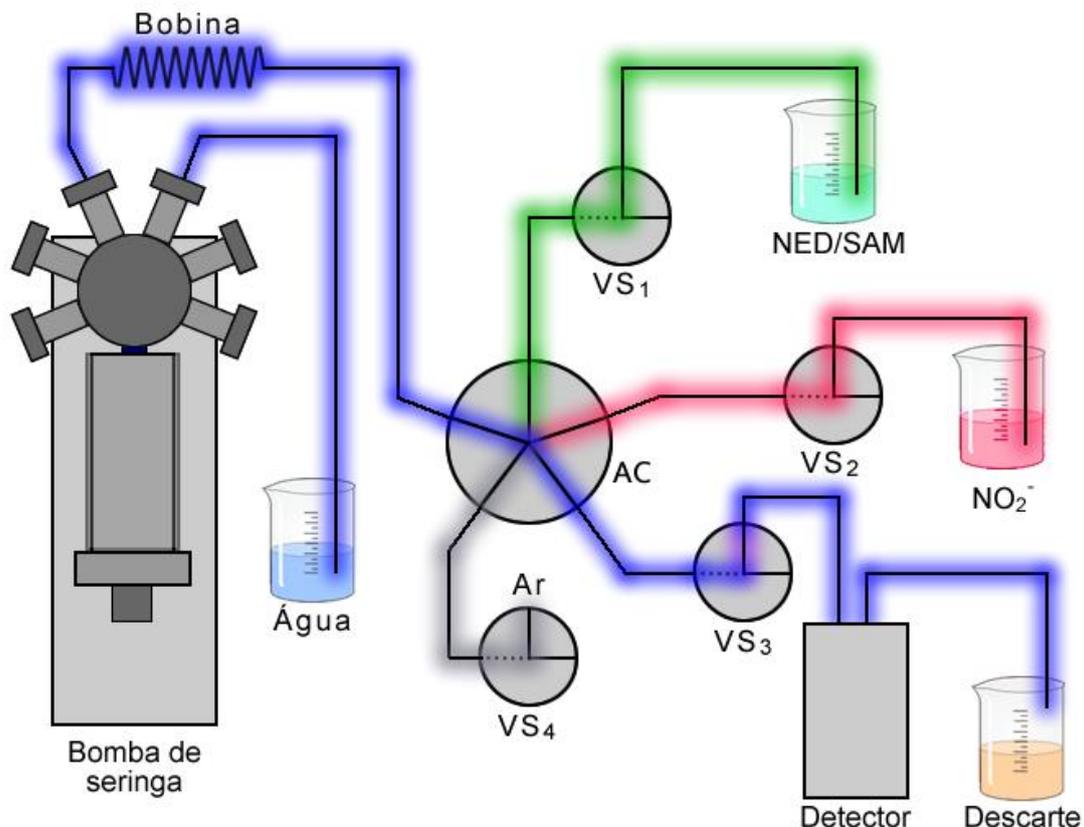


Figura 6. Estado do sistema após inicialização. O brilho ao redor do tubo indica a posição e a solução com que ele está preenchido. (Válvulas na posição desligada). VS: Válvulas solenoides, AC: Adaptador para confluência

Para o preparo dos segmentos de amostra e reagente e para a leitura, os seguintes passos eram realizados:

1. Aspiração de 2 mL de água para a seringa.
2. Aspiração de 0,3 mL de Ar através de VS₄, para dar início ao segmento.
3. Aspiração de 3 segmentos de reagente de Griess e 2 de solução de nitrito, de forma intercalada, como mostra a Figura 5, sendo os volumes ajustados de acordo com a concentração a ser analisada.
4. Aspiração de 0,3 mL de ar através de VS₄ para finalizar o segmento.
5. Movimentação do segmento no sentido da bomba em 0,5 mL, através de VS₃, para evitar interferências da confluência na agitação.
6. Mistura dos reagentes pela movimentação do segmento em passos de 0,5 mL em ambos sentidos por cinco vezes.
7. Ativação da leitura do sinal analítico do fotômetro, seguida pela dispensa de todo o segmento através de VS₃.

Ao término da obtenção do sinal analítico, o sistema já estava preparado para preparar um novo segmento e realizar sua leitura. De fato, o *software* desenvolvido continha as opções para realização de todos os pontos, incluindo replicatas, de forma automática após a inicialização.

3.3.2 Sistemas para a determinação de quinina

Foram avaliados dois sistemas distintos durante os estudos. O primeiro sistema era composto por uma única unidade de propulsão (bomba de seringa) e por um arranjo de tubos de teflon que permitia as adições do analito (quinina 100 mg L⁻¹) em um reator e as leituras de fluorescência. No segundo sistema, as medidas eram realizadas de forma similar àquela proposta no primeiro sistema, mas uma bomba peristáltica foi adicionada ao sistema e utilizada para o transporte da solução entre o reator e o detector, simplificando as operações.

3.3.2.1 Sistema com uma única unidade de propulsão

A primeira abordagem utilizada na determinação de Quinina (Figura 7) consistia no uso da bomba de seringa como unidade propulsora das soluções, duas bobinas de tubos de Teflon, uma válvula solenoide e um reator posicionado

sobre um agitador magnético. As leituras do sinal analítico foram realizadas no fluorímetro descrito anteriormente.

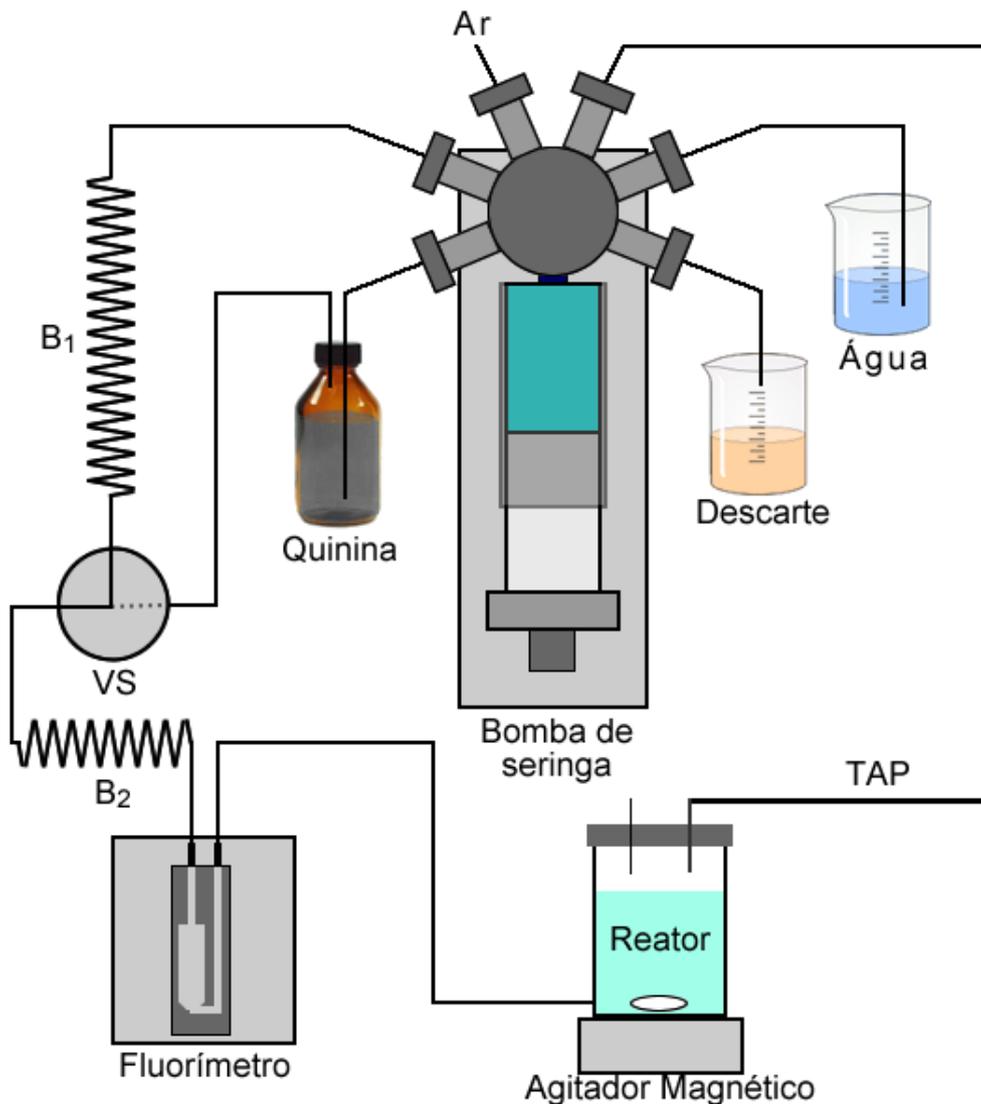


Figura 7. Sistema com bobinas para determinação de Quinina. B₁ e B₂: bobinas de teflon com 2,0 e 4,0 m de comprimento, respectivamente. VS: válvula solenoide representada na posição desligada. TAP: Tubo de Adição de Padrão.

O reator consistia em um frasco de plástico, de volume de aproximadamente 50 mL, contendo um orifício na lateral, próximo ao fundo, e uma tampa de plástico com dois orifícios, um deles conectado à bomba de seringa e o outro servindo apenas para o alívio da pressão no interior do frasco. Dentro do frasco foi posicionada uma barra magnética para agitação. O agitador utilizado foi montado no próprio laboratório.

Neste sistema, a bomba de seringa era responsável tanto pela adição dos pequenos volumes de quinina ao reator quanto pelo transporte da mistura do reator até o fluorímetro e deste para o frasco de reação. Para exercer essas duas funções, foi necessário o uso das bobinas e da válvula solenoide de maneira que não houvesse contato direto da mistura reacional com a solução estoque de quinina presente na seringa, e também para se evitar a presença de ar dentro da seringa, que poderia levar a erros nas adições de pequenos volumes.

As bobinas consistiam em tubos de teflon de diâmetro interno de 0,8 mm. A primeira bobina (B_1 , 4,0 m de comprimento), ligada diretamente à bomba de seringa e à porta comum da válvula solenoide, era utilizada de forma que, durante o procedimento de leitura, apenas solução estoque de quinina seria aspirada para dentro da seringa. Já a segunda bobina (B_2 , 2,0 m de comprimento) era utilizada para armazenar parte da mistura reacional durante a leitura, e impedir que esta solução chegasse à bobina B_1 , que ficava parcialmente preenchida com quinina. Um segmento de ar, com volume controlado pelo acionamento da válvula solenoide, separava as soluções entre as duas bobinas.

Previamente a realização das medidas, era realizada a inicialização do sistema, a qual consistia basicamente em preencher a seringa e alguns tubos de Teflon do sistema com uma solução padrão de quinina (250 mg L^{-1}), de acordo com a válvula da bomba de seringa selecionada, permitindo a adição posterior de volumes exatos do analito ao reator. A descrição mais detalhada deste procedimento é feita a seguir.

1. 5,00 mL de quinina eram aspirados para a seringa.
2. 1,00 mL era dispensado de volta ao frasco de padrão (quinina) para retirar eventuais bolhas formadas pelo ar presentes na parte interna da válvula da seringa.
3. A tampa do reator era posicionada manualmente sobre um frasco de descarte
4. 1,50 mL de quinina eram dispensados para o descarte, preenchendo o tubo de adição de padrão.

5. A bobina 1 era preenchida com 2,00 mL de quinina, com a válvula solenoide ligada (conectada ao frasco da solução estoque de quinina).
6. 0,60 mL de ar eram aspirados para a bobina 1 através da válvula solenoide na posição ligada.

Após a inicialização, o reator era preenchido manualmente com 20 mL de água, posicionado sobre o agitador magnético e fechado adequadamente com a tampa. A Figura 8A mostra o estado do sistema imediatamente antes do início das medidas.

As medidas eram iniciadas pelo branco, que consistia na solução já presente no reator. Após a leitura do branco, eram intercalados procedimentos de adição de 50 μ L de quinina e leitura de intensidade de fluorescência. A leitura do sinal analítico era realizada de acordo com o seguinte procedimento:

1. 1,30 mL da solução presente no reator era aspirada até a cubeta. A solução ocupava a bobina 2, mas não chegava até a válvula solenoide (Figura 8B).
2. Era realizada a leitura pelo fluorímetro (média de 10 valores).
3. A seringa era movimentada em 1,50 mL através das bobinas B₁ e B₂ para devolver a solução presente na cubeta ao reator, permitindo uma nova adição do padrão. Este volume era suficiente para devolver toda solução aspirada e um excesso de ar presente em B₁, garantindo o retorno de toda solução (Figura 8C).
4. Aspiração de 0,20 mL de ar através da válvula solenoide na posição ligada para B₁, com objetivo de restaurar o volume de ar necessário para leitura seguinte (Figura 8D).

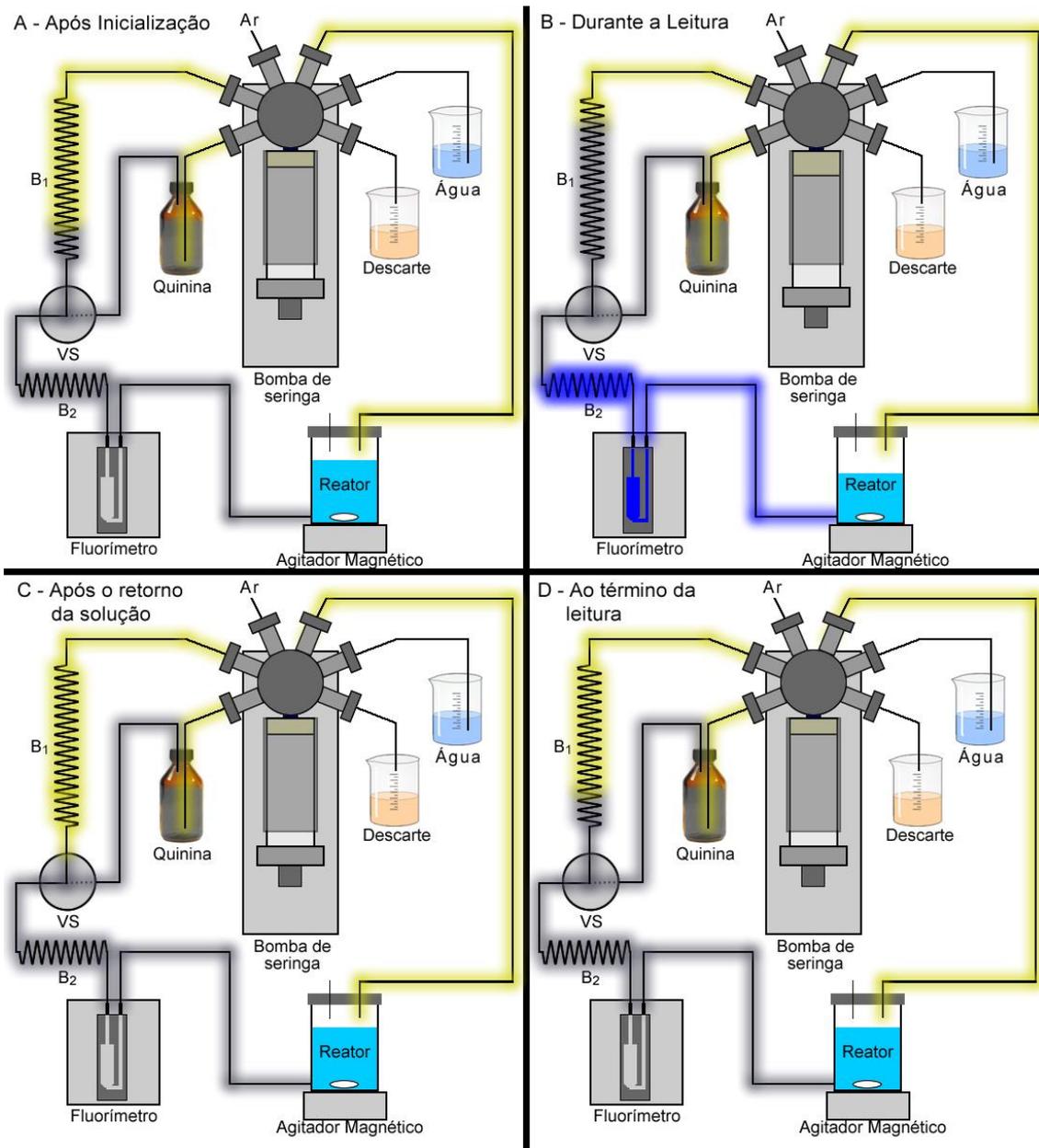


Figura 8. Representações do preenchimento dos tubos em diferentes etapas do experimento. A sombra dos tubos representa a solução presente. Amarelo: Quinina. Cinza: Ar. Azul: Mistura reacional.

As etapas de adição de quinina e leitura eram então repetidas de acordo com o número de pontos desejados no experimento. De maneira geral, realizou-se medidas na faixa de 0,625 até 6,250 mg L⁻¹ de quinina. Os volumes adicionados foram levados em consideração para o cálculo da concentração final.

3.3.2.2 Sistema com duas unidades de propulsão

No sistema com a bomba peristáltica (Figura 9), as bobinas foram removidas e a bomba de seringa foi utilizada exclusivamente para a adição do padrão ao reator, com o objetivo principal de se simplificar o sistema e suas operações. A bomba peristáltica foi utilizada para transportar a mistura reacional entre o reator e o fluorímetro.

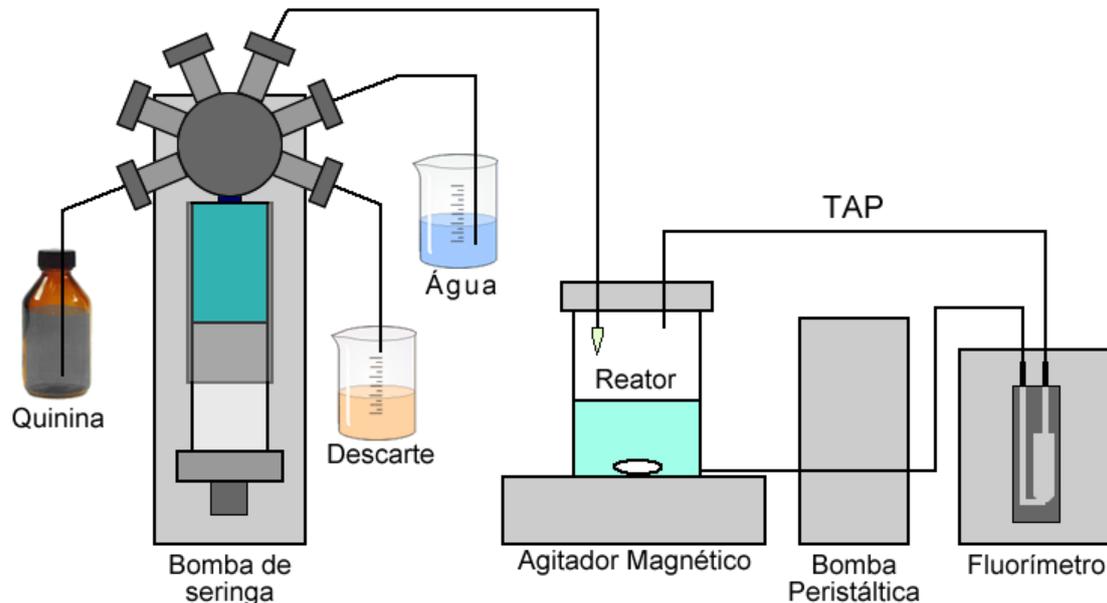


Figura 9. Sistema para testes com quinina utilizando duas unidades de propulsão. TAP: Tubo de adição de padrão.

Neste sistema, também era necessário um procedimento de inicialização, descrito abaixo:

1. 5,00 mL de quinina eram aspirados para a seringa.
2. 1,00 mL era dispensado de volta ao frasco de padrão (quinina) para retirar eventuais bolhas formadas pelo ar presentes na parte interna da válvula da seringa.
3. A tampa do reator era posicionada manualmente sobre um frasco de descarte
4. 1,00 mL de quinina era dispensado para o descarte, preenchendo o tubo de adição de padrão.

Após a inicialização, o reator era preenchido manualmente com 20 mL de água destilada, posicionado sobre o agitador magnético e fechado adequadamente com a tampa.

As medidas eram realizadas para as mesmas concentrações de quinina do sistema anterior, sendo iniciadas pelo branco seguido de adições de 50 μ L de quinina e leitura de intensidade de fluorescência, de acordo com o seguinte procedimento:

1. Ativação da bomba peristáltica no sentido do fluorímetro por 45 segundos, tempo suficiente para preencher a cubeta, sendo o excesso retornado ao reator pela tampa superior.
2. Leitura da fluorescência pelo fluorímetro (média de 10 valores).
3. Ativação da bomba peristáltica no sentido do reator por 45 segundos, tempo suficiente retornar toda solução ao reator por meio da conexão em sua base.

O procedimento de adição de reagente e leitura era realizado 10 vezes, obtendo-se uma curva na faixa de concentração de 0,625 até 6,250 mg L⁻¹ de quinina. Os volumes adicionados foram levados em consideração para o cálculo da concentração final.

3.3.3 Avaliação do procedimento de adição de padrão ao reator

Verificou-se que os pequenos volumes de padrão que seriam adicionados ao reator poderiam levar a erros em virtude da maneira como a adição era realizada. Esses erros estão relacionados com a posição do tubo em relação à solução dentro do reator (mergulhado ou suspenso) e com o diâmetro interno do tubo utilizado. Dessa forma, o procedimento de adição foi avaliado quanto ao diâmetro do tubo de adição, pelo uso de diferentes materiais. Nestes testes, o sistema foi montado e inicializado como no sistema com duas unidades de propulsão, e então o procedimento de leitura foi realizado a cada 60 segundos, sem adições de quinina pela bomba de seringa.

3.4 Titulações fluorimétricas de substâncias húmicas

Para se avaliar o equipamento desenvolvido frente ao analito proposto inicialmente no projeto, foram realizados experimentos com substâncias húmicas

comerciais para otimização dos procedimentos experimentais, sendo o sistema otimizado aplicado posteriormente para a análise de algumas amostras de água natural.

Os experimentos com substâncias húmicas foram realizados com um aparato experimental muito similar ao utilizado nos últimos testes com quinina, com duas unidades propulsoras, tendo como principal diferença a substituição do reator de 50 mL pelo fabricado especificamente para o equipamento e descrito na seção 3.1 (130 mL). A Figura 10 apresenta um diagrama com os componentes do sistema proposto e de suas conexões.

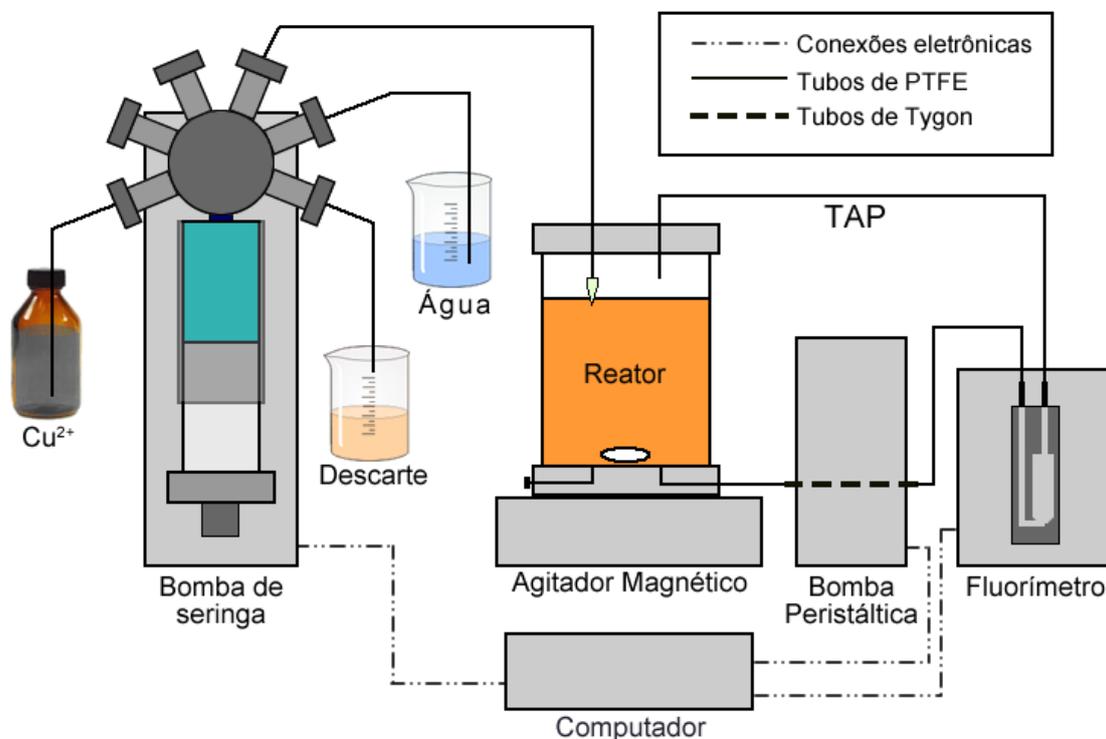


Figura 10. Aparato experimental utilizado nos experimentos com substâncias húmicas. TAP: Tubo de adição de padrão.

3.4.1 Ácido húmico comercial

O ácido húmico comercial foi analisado tanto de forma automática, pelo equipamento desenvolvido, quanto por titulação manual, afim de se comparar os resultados obtidos entre as duas abordagens e verificar se o equipamento exercia alguma influência nos resultados analíticos. Antes destes testes, no entanto, verificou-se o tempo mínimo necessário para que ocorresse a estabilização do sinal após a adição de Cu(II) à solução de substância húmica.

O metal escolhido para os testes com substância húmica foi cobre(II), pois é o metal mais utilizado em estudos similares encontrados na literatura.

3.4.1.1 Verificação do tempo de estabilização do complexo

Foi realizado um experimento com o objetivo de se verificar o tempo necessário para a formação e estabilização do complexo entre cobre(II) e o ácido húmico comercial. Neste teste, o volume referente à primeira adição de titulante (12,5 µL) foi adicionado a 100 mL de solução de ácido húmico comercial (40 mg L⁻¹), e então uma leitura de intensidade de fluorescência foi realizada por minuto, até estabilização do sinal. Este teste foi realizado de forma automática, por uma rotina específica, a qual foi mantida na versão final do programa para uso futuro.

3.4.1.2 Titulação automática

Antes de iniciar o experimento, os parâmetros da análise eram configurados no software. Nestes testes, a adição de titulante foi realizada de acordo com volumes pré-determinados, e o tempo de estabilização utilizado foi de 30 minutos entre a adição e a leitura de fluorescência. Em cada experimento, 100 mL de amostra foram titulados com adições de alíquotas de solução de Cu²⁺ 0,16 mol L⁻¹ até que a concentração do padrão no reator fosse aproximadamente 10 mmol L⁻¹. A seguinte rotina, também ilustrada na Figura 11, foi utilizada:

1. O fluorímetro era configurado manualmente para ajuste do ganho do detector e para o envio de um resultado por segundo ao programa de controle.
2. De forma manual, 100,0 mL de amostra eram adicionados ao reator.
3. O sistema era inicializado para preenchimento da seringa e do tubo de adição de reagente, como detalhado na seção 3.3.2.2.
4. Era realizada a leitura do valor de intensidade de fluorescência inicial, antes da primeira adição de titulante.
5. Uma alíquota de titulante era adicionada ao reator e então era iniciada a contagem regressiva do tempo definido no programa.
6. Após atingido o tempo pré-definido, era realizada a leitura da fluorescência.
7. O processo se repetia a partir da etapa 5 até que todas adições programadas fossem realizadas.

8. Após a última leitura, o experimento era finalizado, e os resultados salvos automaticamente em um arquivo.

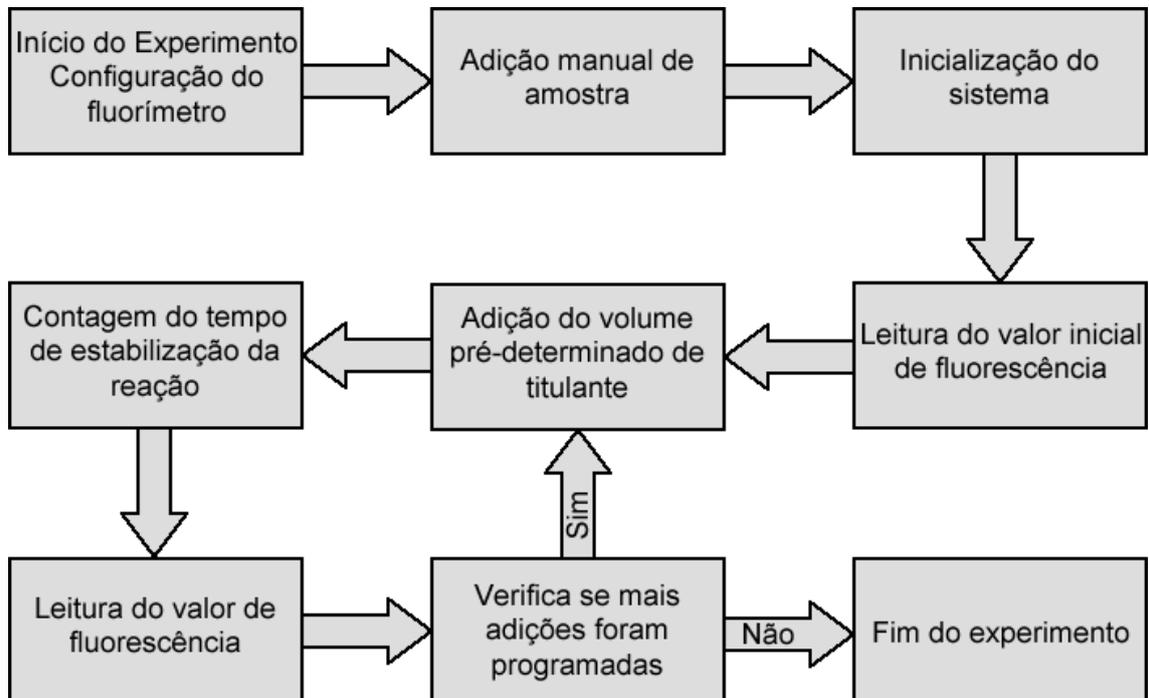


Figura 11. Sequência lógica dos experimentos de titulação de substâncias húmicas.

Cada leitura de fluorescência foi realizada com o seguinte procedimento:

1. A solução era aspirada pela bomba peristáltica através de tubo, inicialmente vazio, conectado ao fundo do reator, por um período suficiente para que toda cubeta de fluxo estivesse preenchida. O excesso de solução aspirada retornava ao reator pelo orifício na tampa do frasco.

2. Eram realizadas as leituras de 10 valores de fluorescência enviados pelo fluorímetro, com velocidade de uma leitura por segundo. A média desses valores era plotada na interface do programa, sendo o valor médio e o desvio padrão armazenados no programa.

3. A solução era então aspirada pela bomba peristáltica da cubeta para o reator por um período suficiente para preencher novamente os tubos e a cubeta com ar.

Em todos os experimentos, as mesmas quantidades de Cu^{2+} foram adicionadas em cada passo. No início da titulação, onde variações maiores do sinal costumam ocorrer, pequenos volumes de titulante ($12,5 \mu\text{L}$) eram

adicionados. Com o decorrer da titulação, os volumes corresponderam aos apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Volumes de Cu^{2+} adicionados para cada leitura realizada.

Leitura	Volume de Cu^{2+} adicionado (μL)	Concentração final de Cu^{2+} (mol L^{-1})
1	0	0
2	12,5	$1,96 \times 10^{-06}$
3	12,5	$3,93 \times 10^{-06}$
4	12,5	$5,89 \times 10^{-06}$
5	25	$9,81 \times 10^{-06}$
6	25	$1,37 \times 10^{-05}$
7	25	$1,77 \times 10^{-05}$
8	25	$2,16 \times 10^{-05}$
9	50	$2,94 \times 10^{-05}$
10	50	$3,72 \times 10^{-05}$
11	50	$4,50 \times 10^{-05}$
12	100	$6,06 \times 10^{-05}$
13	100	$7,62 \times 10^{-05}$
14	100	$9,18 \times 10^{-05}$
15	100	$1,07 \times 10^{-04}$

3.4.1.3 Titulação manual

As titulações manuais foram realizadas com as mesmas soluções utilizadas nas titulações automáticas. Utilizando-se um béquer de 250 mL, 100 mL da solução de SH eram tituladas com adições manuais de Cu^{2+} com o auxílio de uma micropipeta (10-100 μL , LabMate). As alíquotas para leitura eram transferidas manualmente para uma cubeta de quartzo e o sinal fluorescência medido em um espectrofluorímetro (Lumina Fluorescence Spectrometer, Thermo Scientific). Foram realizadas medições em dois pares de comprimento de onda, $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 360/415 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}} = 330/450 \text{ nm}$, sendo o primeiro par relativo aos filtros utilizados na titulação automática e o segundo descrito na literatura como ideal para esta amostra [65]. Após a leitura, a solução na cubeta era devolvida para o béquer. Durante este experimente foi utilizado o mesmo tempo de estabilização, de 30 minutos, e os mesmos volumes de titulante por leitura, conforme a Tabela 2.

3.4.2 Amostras de água natural

Para ampliar a validação do método desenvolvido, algumas amostras de águas naturais foram coletadas em pontos da bacia hidrográfica do Rio Paranoá, próximos à cidade de Brasília, Distrito Federal, e posteriormente analisadas no equipamento desenvolvido.

3.4.2.1 Amostragem e pré-tratamento

As coletas das amostras de água natural foram realizadas em um único dia, no período da tarde, em época de forte estiagem da região. As amostras foram coletadas em frascos plásticos de polipropileno com capacidade de 1000 mL, previamente ambientados com a água do local. No total, seis coletas foram realizadas, nos pontos ilustrados no mapa na Figura 12 e descritos na Tabela 3.

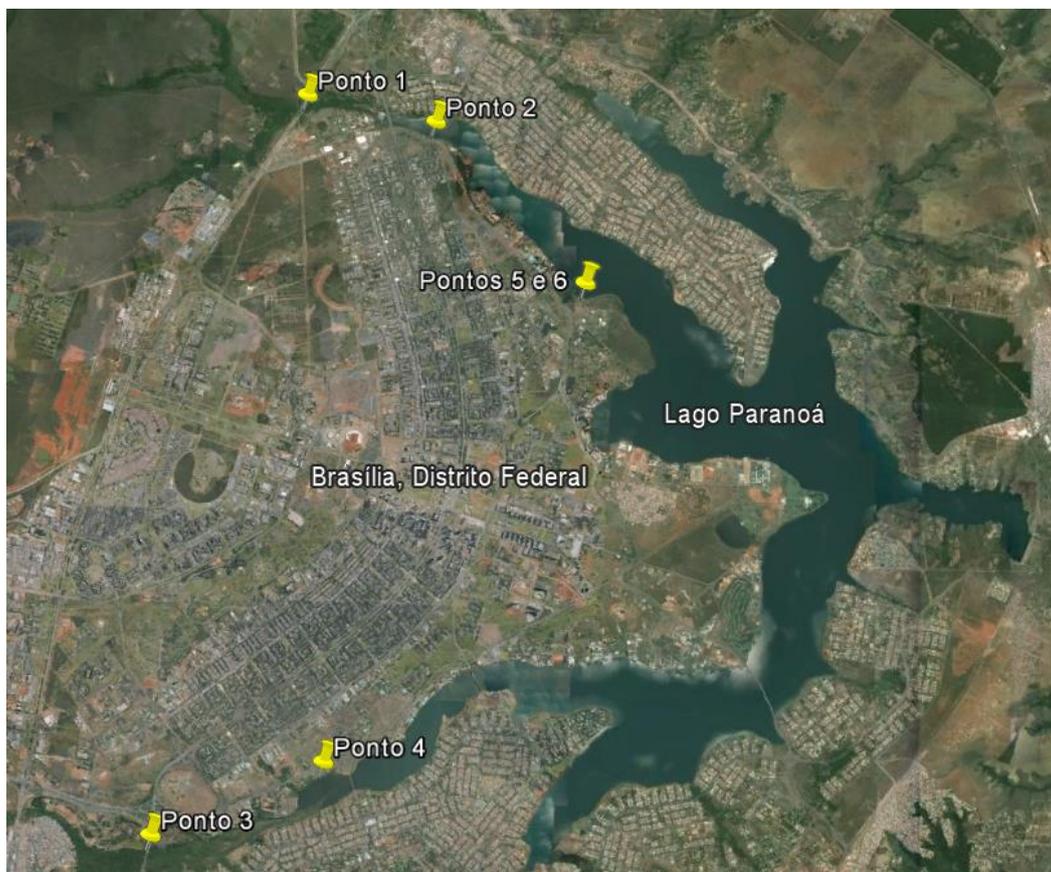


Figura 12. Pontos de amostragem de água natural na bacia hidrográfica do Rio Paranoá, Brasília, DF. A imagem de satélite foi obtida no programa Google Earth.

Tabela 3. Pontos de amostragem de água natural.

Ponto	Local	Corpo Aquático	Coordenadas
1	Ponte Estrada Parque Indústria e Abastecimento (EPIA)	Córrego Ribeirão	15°43'43.2"S 47°54'33.8"W
2	Pier Norte do Lago Paranoá	Lago Paranoá	15°43'58.4"S 47°53'14.0"W
3	Ponte ao final do Eixo Rodoviário Sul	Riacho Fundo / Nascente do LP	15°51'04.9"S 47°55'57.3"W
4	Região da Estação de Tratamento de Água Sul (ETE Sul)	Lago Paranoá	15°50'20.9"S 47°54'14.2"W
5	Centro Olímpico da Universidade de Brasília (C.O. UnB)	Efluente Fluvial	15°45'34.8"S 47°51'40.1"W
6	Centro Olímpico da Universidade de Brasília (C.O. UnB)	Lago Paranoá	15°45'34.3"S 47°51'38.9"W

Logo após as coletas, as amostras foram filtradas a vácuo em membrana de nitrato de celulose com poros de 0,45 µm (512.047, Unifil) e armazenadas em refrigerador a 4 °C.

3.4.2.2 Titulação automática de amostras de água natural

Antes das titulações, uma alíquota da amostra foi retirada e teve o seu pH ajustado para 6,0 para se evitar a precipitação do metal na forma de hidróxido [66,67]. Após o ajuste do pH, 100 mL de amostra foram titulados com Cu^{2+} 0,016 mol L⁻¹ seguindo os mesmos procedimentos utilizados na titulação do ácido húmico comercial, com a inclusão de mais três adições de titulante em cada análise, de 200 µL cada.

3.5 Caracterização das amostras de água natural

O teor de carbono orgânico dissolvido das amostras de água natural coletadas foi determinado na amostra filtrada por combustão catalítica e detecção no infravermelho não dispersivo em um equipamento Shimadzu TOC-L.

Os espectros de fluorescência no modo sincronizado foram obtidos em um espectrofluorímetro Lumina Fluorescence Spectrometer (Thermo Scientific) na faixa de 250 a 600 nm com intervalo entre os comprimentos de onda de excitação e emissão de 18 nm, ou seja, $\lambda_{em} = \lambda_{exc} + 18$ nm. Os espectros foram obtidos com largura de fenda de 10 nm e velocidade de varredura fixada em 60 nm min⁻¹.

3.6 Desenvolvimento do programa de computador

O programa de computador utilizado para controle do equipamento e análise preliminar dos dados foi desenvolvido utilizando-se o pacote Microsoft Visual Basic 2010 Express com a linguagem Visual Basic .NET. Foi utilizado um computador de mesa com processador Intel Core i3, 2GB de memória RAM utilizando o sistema operacional Windows 7.

Para a comunicação do computador com a interface USB utilizada no controle das válvulas solenoides e na leitura dos dados analógicos do fotômetro, foi utilizada a biblioteca fornecida pelo fabricante da plataforma, National Instruments DAQmx, na versão mais atualizada disponível. Todas as outras bibliotecas utilizadas são nativas do pacote de desenvolvimento.

A versão final do software desenvolvido (Figura 13) continha as funções básicas para a realização do experimento, como o comando de inicialização do sistema e da titulação, gráfico e tabela com os resultados e ferramentas para configuração dos parâmetros do experimento. Além desses recursos, diversas ferramentas adicionais foram implementadas, como janela para análise dos resultados, ferramentas para controle da bomba peristáltica e da bomba de seringa, recursos para manipulação de resultados anteriores, entre outros.

No programa, estava disponível uma janela para análise parcial dos resultados obtidos, com a possibilidade de realização do ajuste dos dados ao modelo de Ryan e Weber (Equação 3). Este ajuste era realizado por um algoritmo Gauss-Newton [68] que consiste na redução dos mínimos quadrados da função para se encontrar os valores de K , C_L e I_{ML} com menor soma quadrática dos resíduos

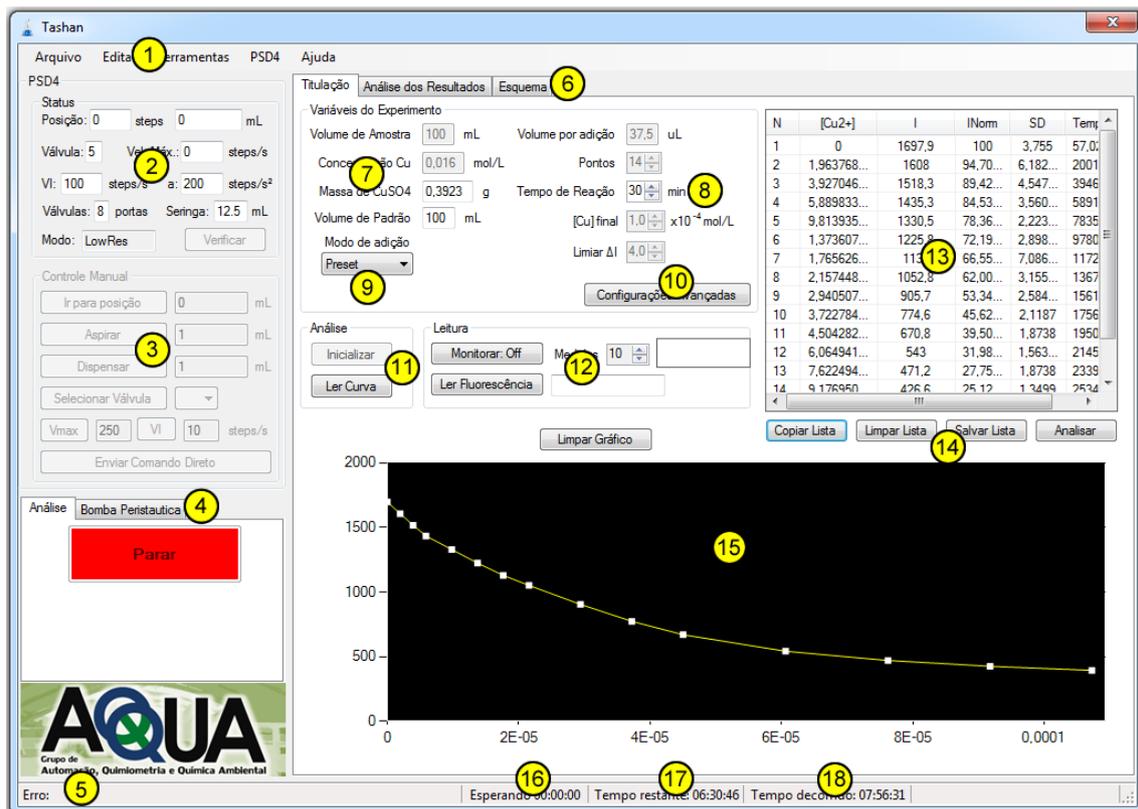


Figura 13. Tela do programa desenvolvido ao término de uma titulação de ácido húmico comercial. 1. Menu principal. 2. Informações sobre o status da bomba de seringa. 3. Controles manuais da bomba de seringa. 4. Janela seletora para interrupção do experimento ou controle manual da bomba peristáltica. 5. Informação sobre o último erro encontrado. 6. Janela seletora dos controles da titulação, da tela de análise dos resultados e da representação esquemática do sistema. 7. Configurações do titulante. 8. Configurações do experimento (disponíveis se necessárias de acordo com o tipo de experimento). 9. Menu para seleção do tipo de experimento. 10. Botão para configurações avançadas. 11. Botões para disparo da inicialização do sistema e da titulação. 12. Configuração e controle manual do sinal recebido do fluorímetro. 13. Tabela com os resultados obtidos. 14. Botões para manipulação dos resultados. 15. Gráfico com os resultados do experimento. 16. Contador regressivo de tempo da ação em execução. 17. Tempo restante do experimento estimado. 18. Tempo decorrido do experimento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudos preliminares

Para se chegar à versão final do equipamento desenvolvido e do programa de computador, foram necessárias várias etapas preliminares, que foram importantes para a familiarização com os dispositivos que seriam utilizados e para o desenvolvimento dos algoritmos indispensáveis para controlá-los. A cada etapa do projeto, alguns fatores que eram esperados na versão final do instrumento eram adicionados, proporcionando assim um desenvolvimento ordenado do titulador automático. Estas etapas preliminares possibilitaram que os recursos de *hardware* e *software* fossem testados com a garantia de que os resultados obtidos eram provenientes apenas da variável em questão.

4.1.1 Sistema SIA para determinação de nitrito

O sistema para determinação de nitrito teve como principal objetivo a verificação da capacidade do programa em controlar corretamente a bomba de seringa e as válvulas solenoides, avaliando-se o sistema através da construção de curvas analíticas para íons nitrito. A Figura 14 mostra os sinais analíticos obtidos em triplicata, para injeções de soluções na faixa de 0,1 a 0,5 mg L⁻¹ de NO₂⁻.

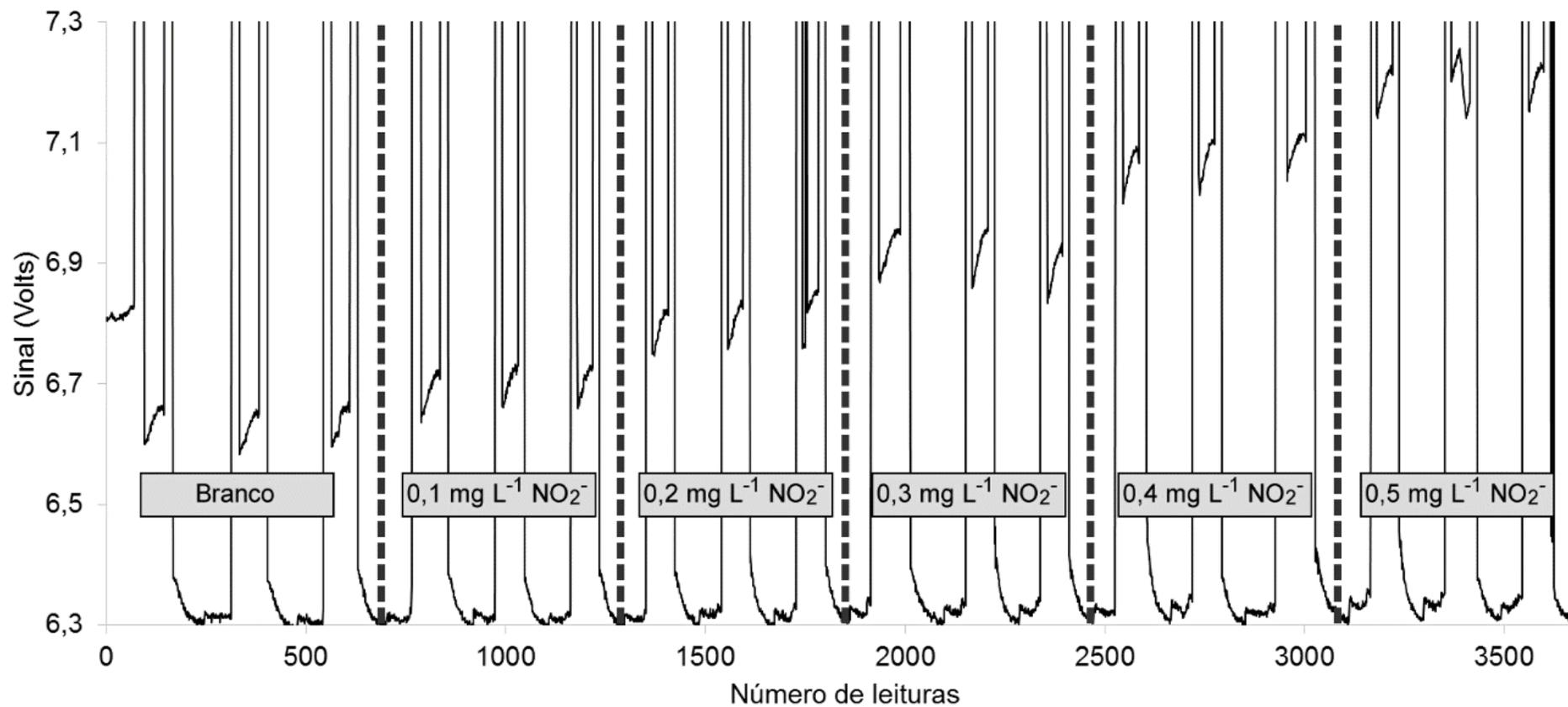


Figura 14. Leituras de absorção de radiação para elaboração de curva analítica de nitrito. A linha tracejada indica a separação entre diferentes concentrações.

O sinal referente à absorção molecular do produto da reação de Griess (relativo ao íon nitrito) é obtido entre os sinais saturados resultantes da passagem, pelo detector, das bolhas de ar que segmentam as soluções, conforme representado na Figura 15. Nesta região, observa-se que o sinal aumenta gradativamente com a passagem do segmento, provavelmente como resultado de um arraste não uniforme do produto colorido no interior do monossegmento. Considerando que os valores médios para os sinais entre os pontos *i* e *f* na Figura 15 foram bastante reprodutíveis (cerca de 7,3% de variação entre as repetições), pode-se afirmar que este efeito não apresentou influência significativa na obtenção da curva analítica. Esses dados mostram também que a bomba de seringa controlou os volumes do segmento de forma precisa, indicando a possibilidade de uso deste elemento de propulsão na construção do titulador automático.

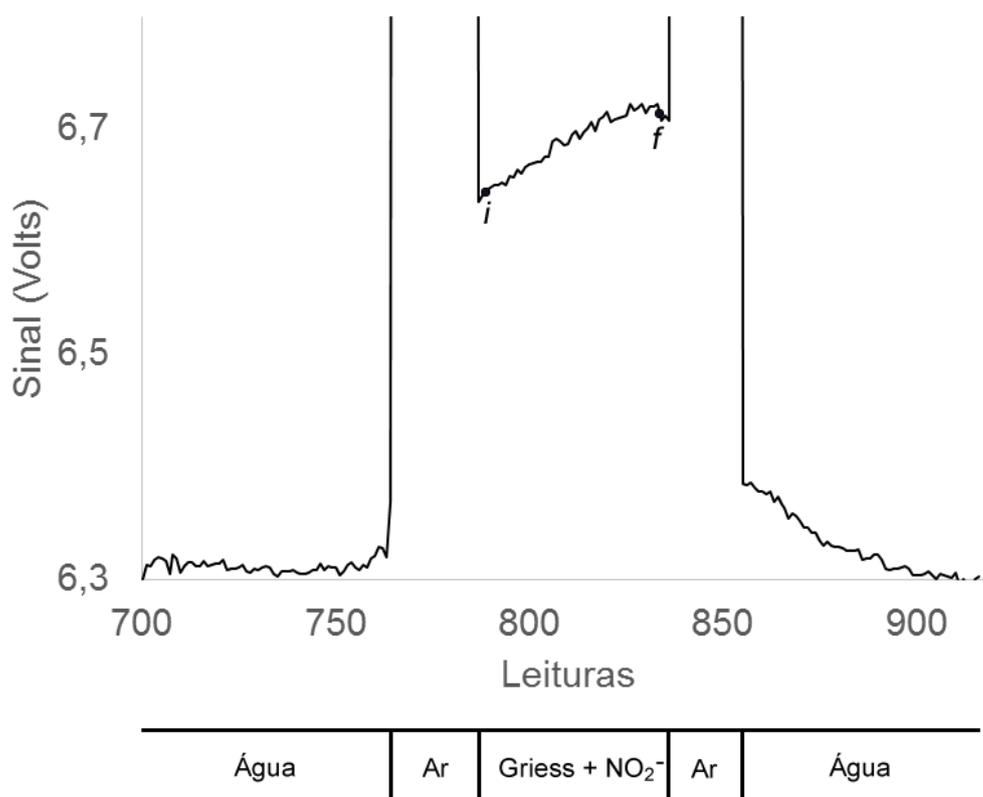


Figura 15. Indicação do sinal analítico e a respectiva faixa do segmento de solução. O ponto *i* representa o início do sinal analítico referente ao nitrito, e o ponto *f* o final deste sinal. A média dos valores entre *i* e *f* foi utilizada como leitura do ponto.

A curva analítica obtida (Figura 16) apresentou um coeficiente de determinação (R^2) superior a 0,99, o que indica uma boa linearidade para a faixa de concentração estudada, e que este sistema poderia inclusive ser adaptado para uma análise de amostras reais contendo nitrito. De fato, a menor concentração detectada com o instrumento proposto ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito/ $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrogênio) é menor do que o limite máximo estabelecido pela resolução CONAMA 357 [69] para águas doces, de 1 mg L^{-1} de nitrogênio, indicando a possibilidade de aplicação do instrumento para este tipo de amostra.

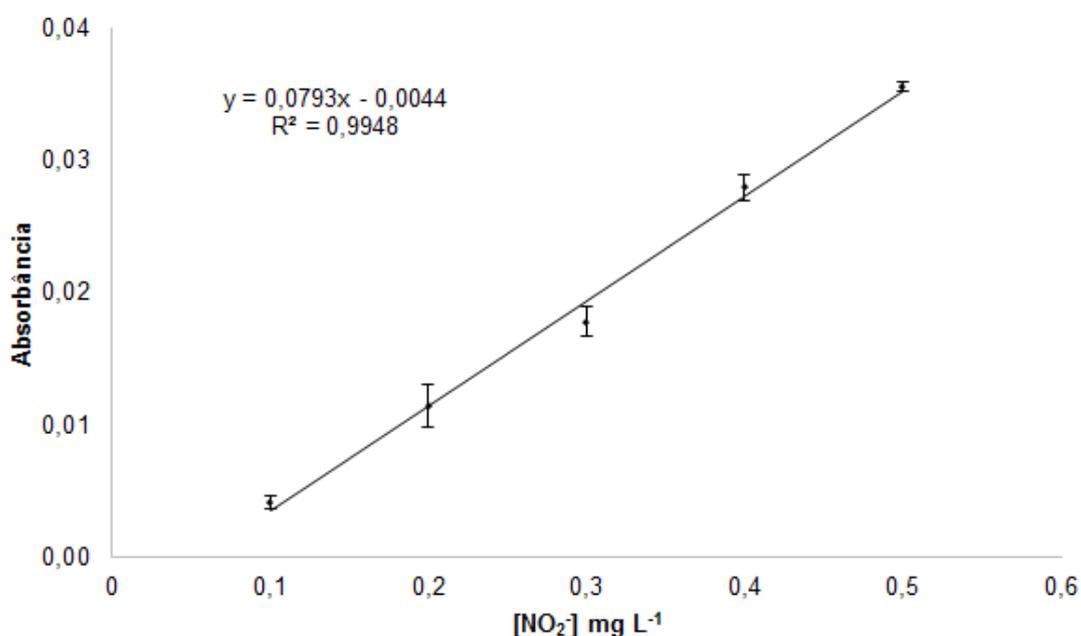


Figura 16. Curva analítica de nitrito obtida pela análise por SIA com fluxo monossegmentado. As barras de erro são relativas ao desvio padrão da média de três repetições.

Os resultados obtidos foram satisfatórios considerando-se que outros parâmetros ainda poderiam ser otimizados no sistema para se buscar uma reprodutibilidade melhor entre os segmentos, como mudança nos volumes do segmento e no fluxo das soluções no sistema, troca do adaptador para confluência de soluções etc.

Considerando a necessidade de se trabalhar com volumes muito maiores do que os suportados por sistemas SIA, esta estratégia não foi aplicada para a construção do titulador automático, mas foi fundamental para a familiarização com os sistemas de análise em fluxo, servindo de base para o desenvolvimento final do instrumento.

4.1.2 Sistemas para determinação de quinina

Os testes com quinina deram início ao uso de com grandes volumes de amostra essenciais para as titulações fluorimétricas de substâncias húmicas. Também, nesta etapa, foi iniciado o uso do fluorímetro, que exigia um algoritmo especial no programa por não possuir uma saída de dados específica para computador. Novamente, foram realizadas curvas analíticas como forma de avaliação do sistema.

4.1.2.1 Sistema com uma única unidade de propulsão

O sistema utilizando bobinas foi proposto visando uma simplicidade do sistema, já que apenas uma válvula solenoide e uma bomba de seringa foram utilizadas, sem a necessidade de uma segunda bomba.

Inicialmente, a adição de quinina ao reator foi realizada com um capilar de vidro na ponta do tubo de adição, gotejando-se a solução padrão sobre a solução contida no reator. A curva de calibração construída a partir deste procedimento é apresentada na Figura 17, a qual apresentou linearidade adequada, com coeficiente de determinação superior a 0,999 para a faixa de concentração de 0,625 até 6,25 mg L⁻¹. É importante observar que o sistema apresentou respostas com razões sinal/ruído (s/r) satisfatórias para incrementos de volume de 50 µL, demonstrando um desempenho adequado do instrumento para o estudo realizado e indicando a possibilidade de uso desta estratégia para a titulação fluorimétrica de substâncias húmicas.

Apesar dos bons resultados, notou-se que o uso das bobinas com ar para se controlar o processo de leitura do sinal analítico exigia um algoritmo relativamente complexo e, ocasionalmente, gerava erros que comprometiam a análise. Durante o procedimento de leitura, o segmento de ar que separava a mistura reacional da solução padrão dentro da seringa levava à formação de pequenas bolhas nos líquidos. A presença dessas bolhas eventualmente atrapalhava a leitura de fluorescência, quando permaneciam dentro da cubeta de fluxo, e também poderiam afetar a exatidão da adição da solução padrão ao reator caso chegassem até a seringa. As bobinas também tornavam os procedimentos de inicialização e lavagem complicados, uma vez que uma grande quantidade de tubos era utilizada. Estes efeitos eram recorrentes e de

difícil controle, de modo que uma nova estratégia para o controle dos fluídos foi proposta, e discutida na seção seguinte.

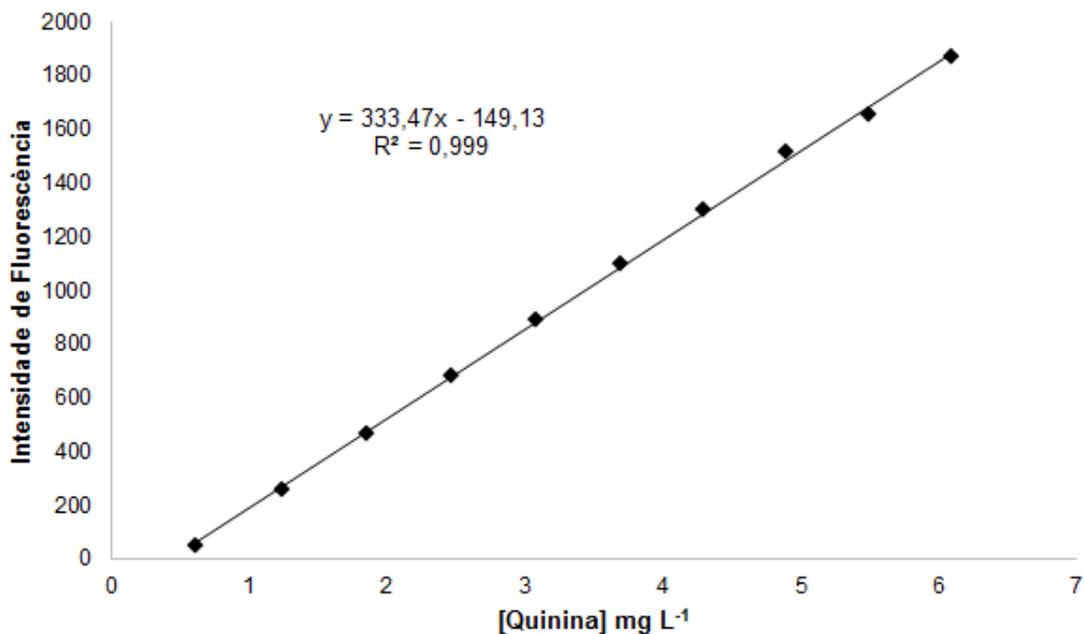


Figura 17. Curva analítica de quinina construída no sistema utilizando apenas uma unidade propulsora e bobinas.

4.1.2.2 Sistema com duas unidades de propulsão

Comparando-se os sistemas apresentados na Figura 7 (sistema com uma unidade de propulsão) e na Figura 9 (sistema com duas unidades de propulsão), observa-se que o segundo sistema é mais simples e de fato isto levou a uma simplificação do algoritmo para o seu controle. Entretanto, a inclusão de uma segunda unidade de propulsão, neste caso, uma bomba peristáltica, pode elevar demasiadamente o custo para a construção do sistema se uma bomba de elevada resolução e com várias linhas for utilizada. De fato, neste trabalho, foi utilizada uma bomba peristáltica com diversas funcionalidades e oito linhas de fluxo, o que eleva bastante o seu custo. Porém, apenas uma única linha de fluxo foi utilizada com velocidade fixa, de modo que uma bomba de linha única mais simples e mais barata poderia ser utilizada sem problemas para a realização destes procedimentos. Atualmente, bombas peristálticas de linha única e de tamanho reduzido podem ser encontradas no mercado ao custo de aproximadamente US\$ 50 [70]. Uma foto do instrumento desenvolvido é apresentada na Figura 18.

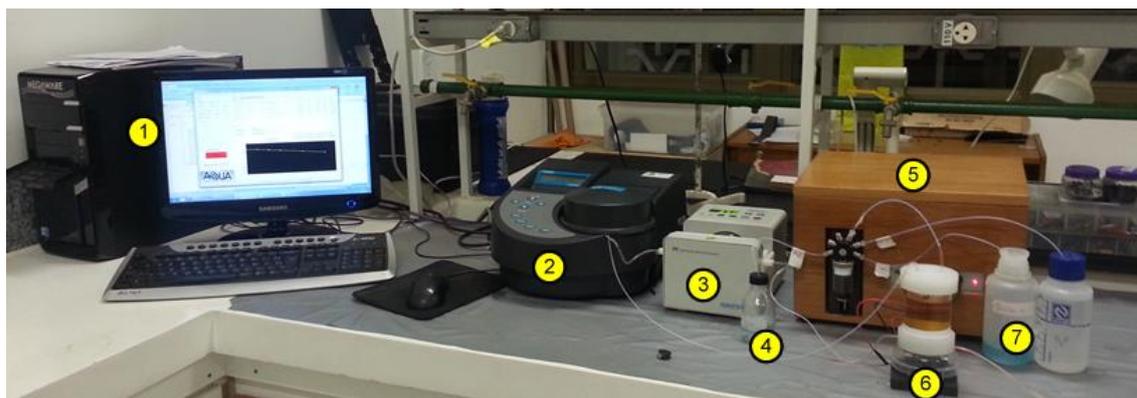


Figura 18. Foto do sistema durante a realização de uma titulação de ácido húmico comercial. 1. Computador executando o programa desenvolvido. 2. Fluorímetro. 3. Bomba peristáltica. 4. Frasco com titulante. 5. Caixa construída para abrigar a bomba de seringa, sua fonte elétrica e os circuitos e conectores das válvulas solenoides (quando utilizadas) e do agitador magnético. 6. Frasco de reação posicionado sobre o agitador magnético. 7. Frascos de descarte e água para lavagem.

A Figura 19 mostra a curva analítica para a determinação de quinina empregando-se o sistema com duas unidades de propulsão, na mesma faixa de concentração e com os mesmos incrementos de volume utilizados anteriormente. Novamente, obteve-se uma boa linearidade ($R^2 \approx 0,999$) e uma boa variação de sinal para os incrementos de volume, demonstrando que a mudança na estratégia de controle de soluções não alterou o desempenho do sistema.

A maior simplicidade de operação deste sistema pode ser ilustrada pelo menor número de linhas de algoritmo de inicialização e leitura, 48, em relação ao sistema anterior, que continha 65. Como consequência da operação mais simples, os procedimentos eram mais rápidos, diminuindo consideravelmente o tempo nas análises de quinina, e, no caso das análises de substâncias húmicas, diminuindo o tempo entre o disparo da leitura e a obtenção do sinal analítico. Esta abordagem também permitiu que o programa fosse configurado para garantir o preenchimento da cubeta de fluxo para a realização da leitura de fluorescência, e posteriormente a devolução de toda solução para o reator, devido ao seu funcionamento reverso, por meio da definição do tempo de funcionamento da bomba peristáltica nestes dois procedimentos. É importante ressaltar que a bomba peristáltica não foi utilizada para transferência de volumes exatos de solução, e sim como uma unidade propulsora que permitia o

preenchimento da cubeta de fluxo. Neste procedimento, a bomba era acionada por um tempo superior ao necessário para preencher e/ou esvaziar a cubeta de forma que o procedimento não era afetado pelas ocasionadas pelo desgaste natural do tubo de Tygon®.

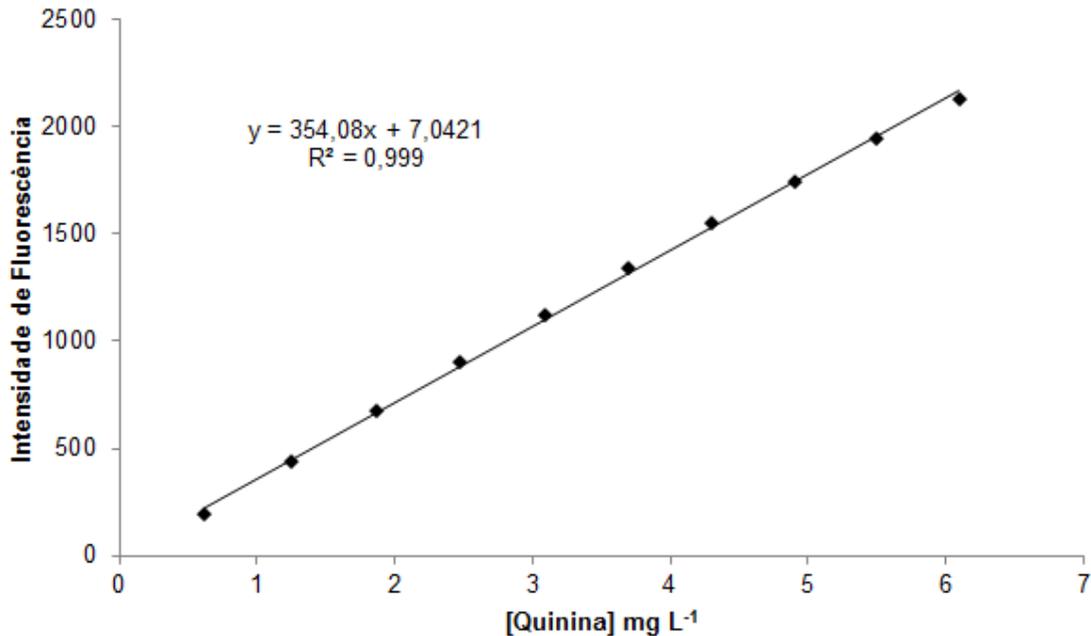


Figura 19. Curva analítica de quinina construída no sistema utilizando duas unidades propulsoras e bobinas

O uso da bomba peristáltica também tornou desnecessária a utilização da válvula solenoide, e como consequência, não foi mais necessário utilizar o circuito eletrônico para seu controle e interface USB com o computador, sendo que ambos apresentaram problemas eletrônicos durante os testes realizados. A bomba peristáltica, por sua vez, é facilmente controlada pelo envio direto de simples comandos de texto.

4.1.3 Avaliação do procedimento de adição de padrão ao reator

Os experimentos realizados nas seções anteriores foram executados sem a imersão, na solução, do tubo para adição da solução padrão ao reator. Durante a adição dos incrementos de volume de 50 µL era possível visualizar que a maior parte do volume adicionado era transferida na forma de um pequeno jato. Entretanto, uma fração desse volume permanecia suspensa na ponta do tubo na forma de uma gota, como mostra a Figura 20, o que poderia comprometer os resultados caso menores incrementos de volume fossem

necessários. Vale destacar que o tamanho da gota formada dependia do incremento de volume adicionado, de forma que não seria possível considerar esse erro constante para experimentos com adições de diferentes incrementos.

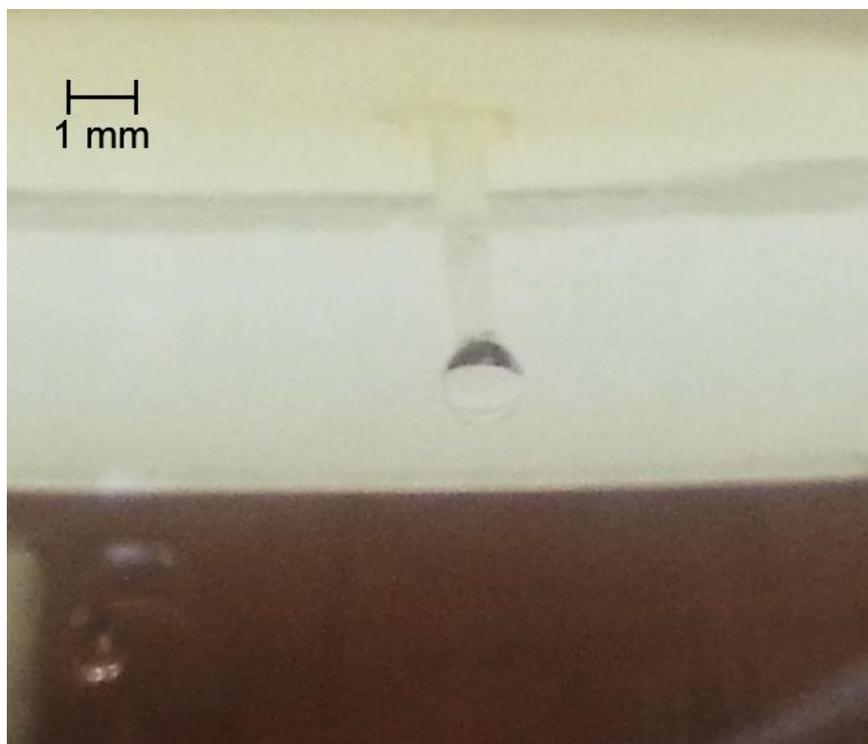


Figura 20. Gota formada na saída do tubo de adição de padrão pela adição com o tubo suspenso.

Considerando esse aspecto, decidiu-se pela adição com o tubo mergulhado na solução, como utilizado em outros tituladores automáticos descritos na literatura [46,47,52]. Deve-se observar, entretanto, que essa forma de adição também pode apresentar erros, em função da difusão de reagente contido no tubo de adição para a solução dentro do reator. De fato, utilizando esta estratégia, o sinal para o branco (reator contendo água destilada) foi monitorado durante 40 minutos mantendo-se o tubo de adição mergulhado na solução, sendo observado um aumento do sinal de fluorescência, como apresentado na Figura 21.

O comportamento observado condiz com o esperado e mostra que após 30 minutos, o sinal aumentou cerca de 100 unidades de fluorescência, o que corresponde a aproximadamente 50% da intensidade obtida para o primeiro ponto da curva de calibração construída anteriormente (Figura 17). Desse modo, o valor de fluorescência medido pode variar consideravelmente caso a leitura seja realizada vários minutos após a adição do padrão, comprometendo os

resultados obtidos. Essa observação é relevante pois, nas titulações de substâncias húmicas, costuma-se aguardar períodos desta magnitude entre a adição do titulante e a leitura de fluorescência.

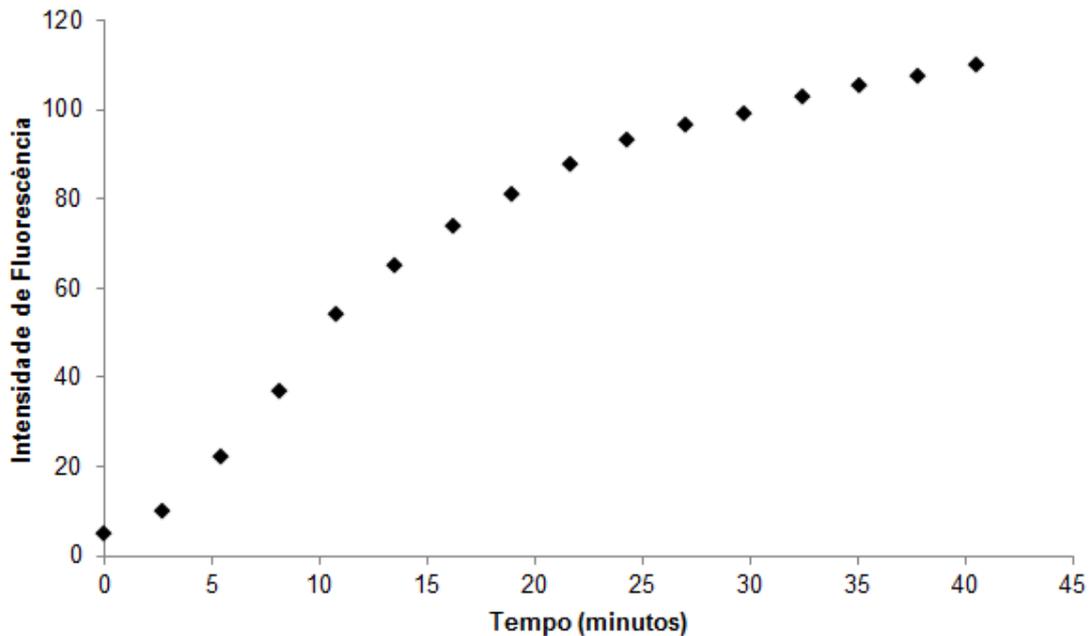


Figura 21. Aumento da intensidade de fluorescência em virtude da difusão de quinina do tubo de adição para o reator.

Segundo a lei de Fick para difusão [71], a velocidade de difusão ($\frac{dn}{dt}$) de um soluto (o padrão) para outro meio (a solução da amostra no reator) é diretamente proporcional à área de interface entre as duas soluções (A), e depende também do gradiente de concentração ($\frac{dC}{dx}$), de acordo com a Equação 4.

$$\frac{dn}{dt} = A \cdot \frac{dC}{dx} \quad 4$$

Logo, para se minimizar os efeitos deste fenômeno, optou-se pela utilização de um tubo de adição com o menor diâmetro interno disponível, a saber, uma ponteira descartável de micropipeta automática para volumes de 0,1 a 10 μL , com diâmetro interno de 0,25 mm, contra 1,0 mm do capilar de vidro utilizado anteriormente. Vale destacar também que nos experimentos seguintes com substâncias húmicas o volume da solução no reator era cinco vezes maior (20 mL nas determinações de quinina e 100 mL nas titulações de substâncias

húmicas), o que poderia levar a uma maior diluição do padrão difundido para o reator. Assim, considerou-se que a difusão através do tubo de adição (utilizando a ponteira de plástico em sua extremidade) causaria uma mudança pouco significativa na concentração de cobre durante o procedimento.

4.2 Titulações fluorimétricas de substâncias húmicas

Para a otimização dos parâmetros experimentais, utilizou-se um ácido húmico comercial para que a avaliação dos resultados obtidos pudesse ser realizada em relação a um sistema conhecido, e que a resposta obtida não era causada por possíveis interferentes presentes em amostras de água natural. Posteriormente, o titulador foi aplicado para a caracterização da matéria orgânica dissolvida em águas naturais.

4.2.1 Ácido húmico comercial

A formação do complexo entre ácidos húmicos e fúlvicos com metais não ocorre instantaneamente, podendo levar diversos minutos até que o sistema chegue ao equilíbrio. Este fenômeno é evidenciado pela lenta variação da supressão de fluorescência frente à adição dos íons Cu^{2+} . Na literatura, uma ampla faixa de tempos de estabilização utilizados pode ser encontrada, como mostra a Tabela 4. Além destes valores, titulantes que não são metais podem exigir períodos de até 24 horas [31].

Considerando esse efeito, foi realizada uma avaliação preliminar da estabilização do sinal fluorimétrico (seção 3.4.1.1) sendo o resultado mostrado na Figura 22. Observa-se que após 30 minutos de diminuição da fluorescência emitida, há uma estabilização do sinal. Este valor está de acordo com outros indicados para o mesmo ácido húmico comercial [65] e foi empregado durante os experimentos seguintes.

Tabela 4. Tempos esperados para estabilização do complexo entre substância húmica e metal encontrados na literatura.

Tempo de estabilização	Amostra	Titulante	Referência
3-5 min	Água do Mar AF de solo	Cu ²⁺	[72]
5 min	Água do Mar AF de lago	Cu ²⁺	[73]
10 min	AF de solo AF de rio	Cu ²⁺	[33]
15 min	AH de solo	Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Pb ²⁺	[26,74]
15 min	AF de solo	Cu ²⁺	[24]
35 min	AH comercial Água de rio	Cu ²⁺	[65]
20 h*	MOD de serrapilheira	Cu ²⁺ e Al ³⁺	[75]
24 h*	MOD em sedimento	Cu ²⁺	[35]

* Experimentos em que os pontos da curva foram preparados simultaneamente em diferentes frascos.

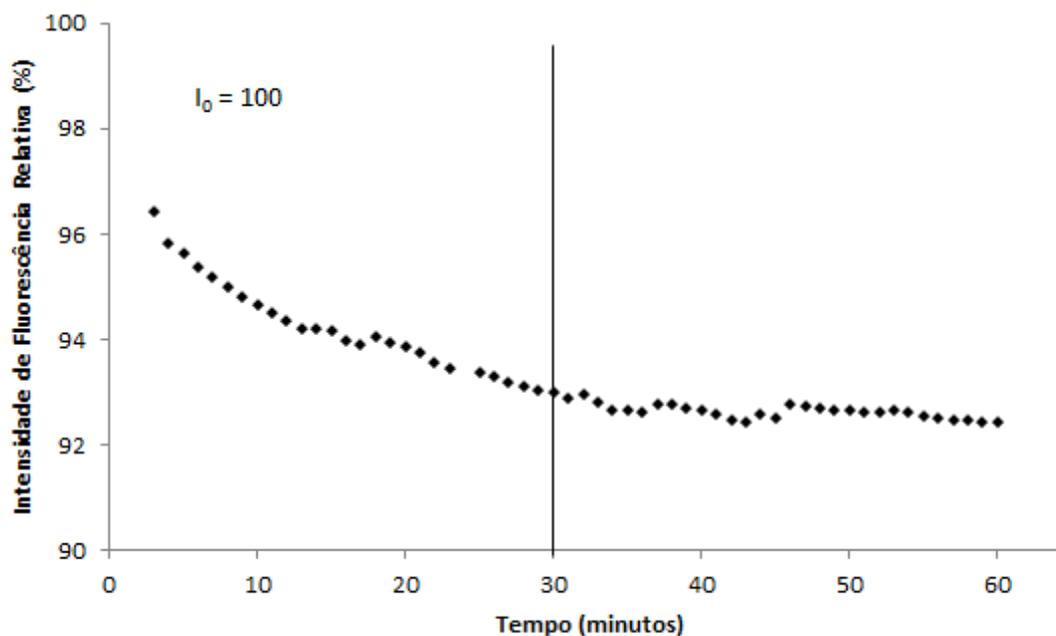


Figura 22. Variação pelo tempo da fluorescência normalizada após adição de 12,5 µL de Cu²⁺ 0,16 mol L⁻¹.

A partir desta constatação, deu-se início às titulações de ácido húmico comercial. A Figura 23 mostra os resultados de três curvas de titulação obtidas

para a mesma solução de ácido húmico e realizadas em sequência. Observa-se que os valores de intensidade de fluorescência obtidos para a mesma adição de titulante são muito próximos, sobrepondo-se. Isto mostra que o sistema apresenta uma precisão adequada para a realização das medidas. De fato, os coeficientes de variação para as três medidas de fluorescência para cada concentração foram inferiores a 5,0%, o que comprova esta afirmação.

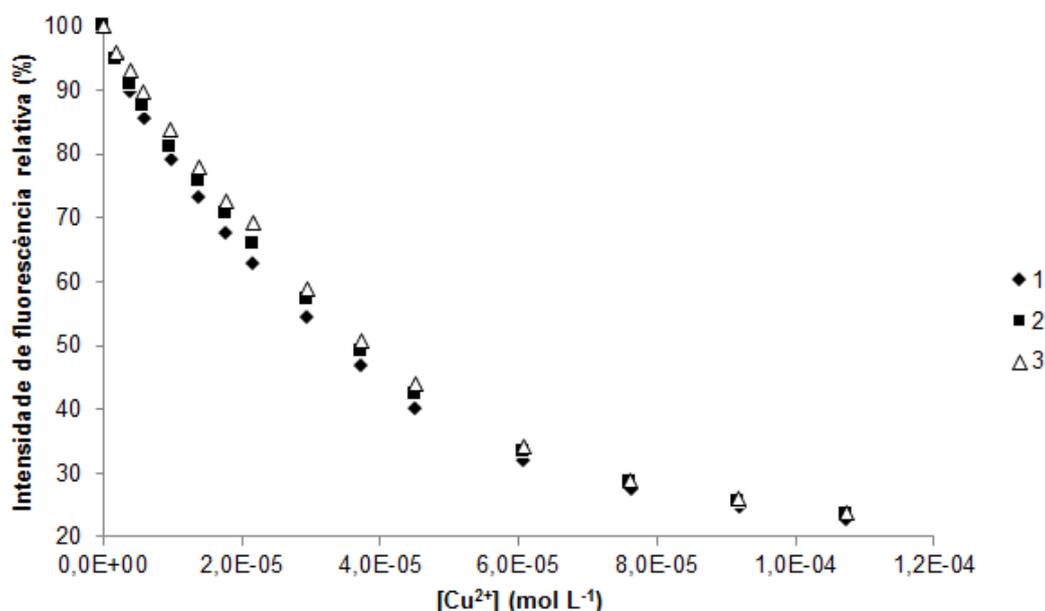


Figura 23. Curvas de titulação de ácido húmico comercial realizadas de forma automática pelo equipamento desenvolvido. Cada série de pontos representa uma repetição. ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 360/415$ nm)

Estes resultados demonstram também a robustez do equipamento desenvolvido, pois os experimentos duraram cerca de 8 horas cada e foram realizados sem a presença de um operador, que só foi necessário durante a etapa inicial. Além disso, o equipamento funcionou por 24 horas seguidas, para a realização do experimento em triplicata, sem que houvesse variação significativa nos resultados obtidos entre as três repetições.

Ao término de cada experimento, os resultados obtidos foram ajustados ao modelo de Ryan e Weber no programa desenvolvido para controle do titulador. Os parâmetros calculados foram comparados ao mesmo ajuste realizado pelo programa OriginPro 9.0 (OriginLab), e os resultados foram os mesmos, demonstrando que o algoritmo de ajuste não-linear implementado funcionou corretamente. Os parâmetros são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros ajustados ao modelo de Ryan e Weber das titulações de ácido húmico comercial realizadas de forma automática.

		C_L	I_{ML}	Log K	R^2
Repetição	1	$2,07 \times 10^{-05}$	4,41	4,70	0,998
	2	$2,92 \times 10^{-05}$	6,12	4,75	0,998
	3	$4,31 \times 10^{-05}$	12,76	5,02	0,999
Estatística	Média	$3,10 \times 10^{-05}$	7,76	4,82	
	Desvio Padrão	$1,13 \times 10^{-05}$	4,41	0,17	
	CV	36,62%	56,83%	3,54%	

CV: Coeficiente de variação.

A Tabela 5 mostra também que o ajuste dos dados à Equação 3 para cada repetição forneceu resultados que diferiram consideravelmente, no caso de C_L e I_{ML} , fornecendo coeficientes de variação de 36,62% e 56,83%, respectivamente. Essa variação não condiz, no entanto, com a similaridade dos resultados experimentais obtidos, já que as intensidades de fluorescência entre os pontos variaram em escala consideravelmente menor, como citado anteriormente. Isso indica uma alta sensibilidade do modelo matemático a pequenas variações nos resultados experimentais, especialmente nos primeiros pontos da curva em que o formato do decaimento é definido. Na literatura, a maioria dos autores não faz menção a repetições, possivelmente devido às dificuldades de se realizar o experimento, sugerindo que a titulação foi realizada apenas uma vez por amostra. Esta falta de informação faz com que não seja possível dizer se estas variações são comuns em outros experimentos.

A mesma titulação foi realizada de forma manual, com aparato experimental completamente diferente, empregando o procedimento que seria normalmente utilizado na ausência do titulador automático (seção 3.4.1.3). A Figura 24 apresenta o resultado dessas análises.

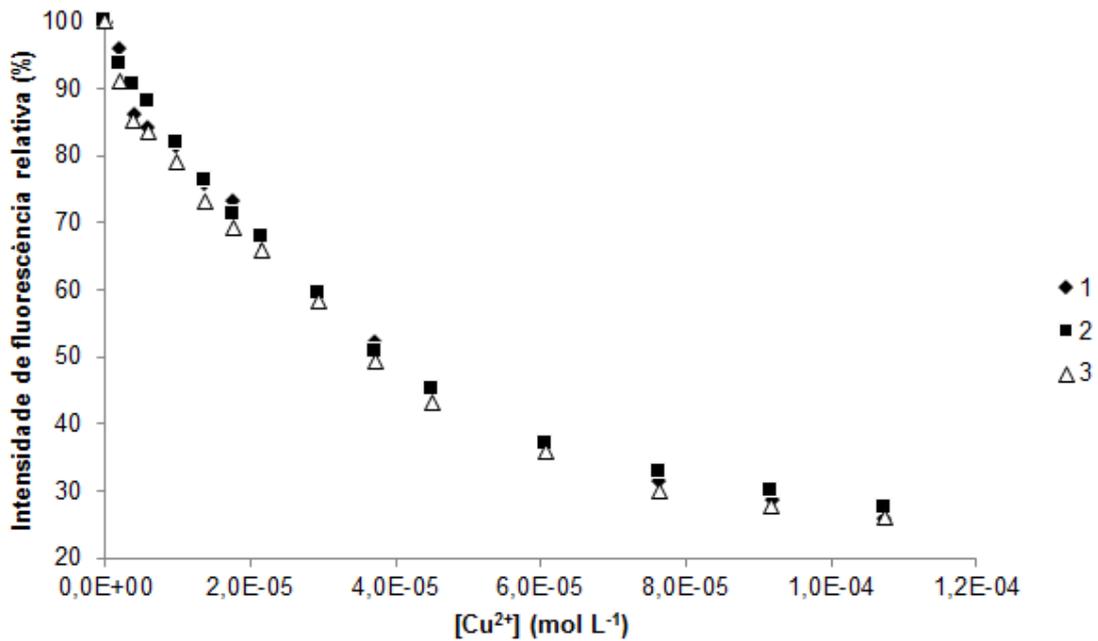


Figura 24. Curvas de titulação de ácido húmico comercial realizadas de forma manual. Cada série de pontos representa uma repetição. ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 360/415$ nm)

Comparando-se com os resultados obtidos pela titulação automática, observa-se que os resultados obtidos são muito similares. Destaca-se uma maior variação entre as repetições de cada ponto no início da titulação, que provavelmente está relacionada ao erro associado à pipetagem manual de volumes, que é mais significativo para volumes menores. O ajuste ao modelo matemático dos resultados obtidos da titulação manual é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros ajustados ao modelo de Ryan e Weber das titulações de ácido húmico comercial realizadas de forma manual.

		CL	IML	Log K	R ²
Repetição	1	$4,88 \times 10^{-15}$	0,00	4,40	0,992
	2	$2,57 \times 10^{-05}$	10,46	4,71	0,998
	3	$6,89 \times 10^{-07}$	0,00	4,44	0,990
	Média	$8,80 \times 10^{-06}$	3,49	4,52	
Estatística	Desvio Padrão	$1,47 \times 10^{-05}$	6,04	0,17	
	CV	166,47%	173,21%	3,74%	

CV: Coeficiente de variação.

O ajuste ao modelo de Ryan e Weber das titulações manuais resultou em alguns valores fora da escala de grandeza esperada. Para a primeira repetição, obteve-se um CL negativo após o ajuste. Como este valor não possui sentido físico, configurou-se a regressão para que este valor não pudesse ser

menor que zero, e o valor obtido foi $4,88 \times 10^{-15}$, que, apesar de positivo, ainda está claramente incorreto. De forma similar, os valores obtidos para IML dessa análise e da terceira repetição foram iguais a zero. Assim, apenas na segunda repetição todos os parâmetros calculados ficaram na ordem de grandeza esperada. É importante ressaltar, no entanto, que os próprios autores que sugeriram o modelo matemático encontraram valores deste tipo [24], e existem na literatura outros registros desse tipo de problema [28,33,72,73].

Para se comparar visualmente os resultados obtidos experimentalmente utilizando as abordagens manual e automática, foram calculadas as curvas com as médias de cada ponto entre as três repetições, ilustradas na Figura 25.

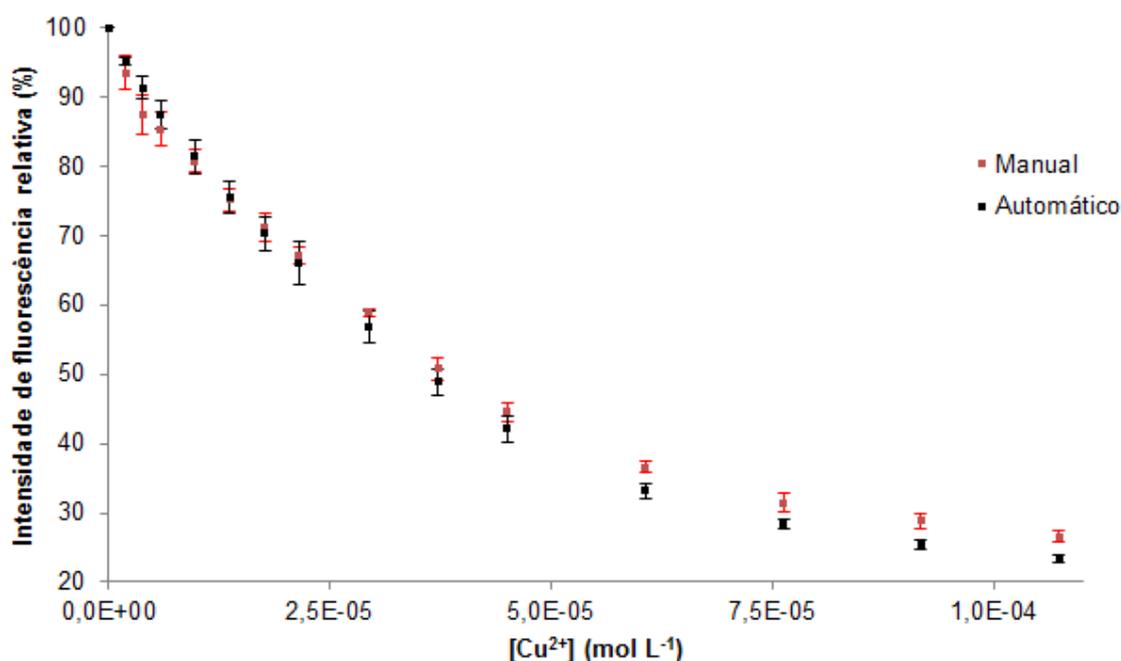


Figura 25. Comparação das curvas obtidas a partir dos resultados de 3 titulações realizadas no equipamento desenvolvido e de forma manual. As barras de erro representam o desvio padrão entre as três medidas. ($\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 360/415$ nm)

As curvas médias apresentam pequena distinção nos resultados, mas comportamentos muito similares, sugerindo que não há grandes diferenças nos resultados obtidos pelas duas abordagens. Outra técnica que pode ser utilizada para se comparar os resultados é a realização de uma regressão linear da intensidade de fluorescência relativa média obtida para cada ponto da titulação automática contra os valores da titulação manual (Figura 26). Observa-se que há boa linearidade ($R^2 > 0,99$) entre os dois modos de análise, ou seja, os

instrumentos responderam de forma proporcional para as adições que foram feitas, e que o titulador automático controlou corretamente os volumes de adição e os procedimentos de leitura.

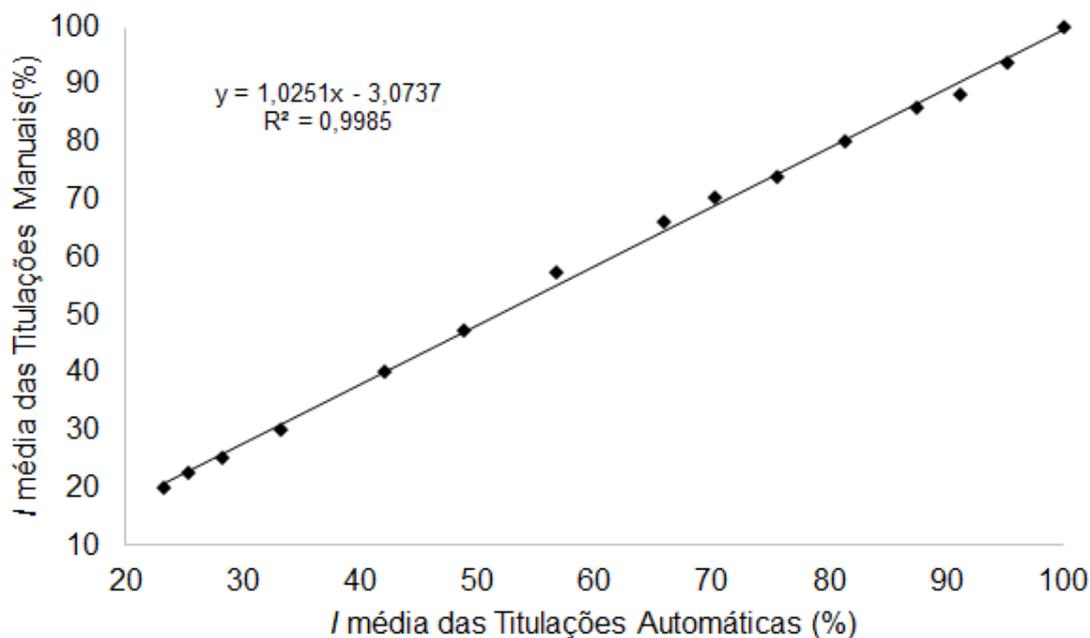


Figura 26. Comparação das intensidades de fluorescência médias para cada ponto das titulações realizadas de forma automática e manual.

Os parâmetros obtidos para as titulações automáticas (Tabela 5) e manuais (Tabela 6) não puderam ser comparados estatisticamente em virtude dos grandes desvios padrão encontrados para os valores da titulação manual. De maneira geral, dois fatores podem causar as grandes variações nos parâmetros ajustados: (1) falha do modelo em representar corretamente os fenômenos físico-químicos e (2) alta covariância entre os três parâmetros do modelo [73]. Os problemas relacionados à abordagem experimental e ao modelo matemático podem ser influenciados pela forma de obtenção do sinal de fluorescência e pela consideração de uma determinada proporção estequiométrica do complexo formado entre substância húmica e metal, como discutidos anteriormente. Vale destacar que o uso de técnicas diferentes da fluorescência de emissão e de modelos matemáticos para estequiometrias diferentes de 1:1 tornam os experimentos mais complicados, pois podem exigir o uso de espectralfluorímetros, métodos quimiométricos para análise dos dados ou algoritmos mais avançados para realizar o ajuste dos dados.

Se abordado do ponto de vista da covariância entre as variáveis, o problema pode ser contornado pela diminuição do número de parâmetros a serem ajustados. A fluorescência do ligante complexado (I_{ML}) é o valor considerado de menor importância dentre os três calculados, pois está mais relacionado à fração da matéria orgânica que não interage com o metal (do ponto de vista da supressão de fluorescência). Assim, este valor pode ser determinado antes dos outros para se diminuir a complexidade do ajuste. O valor de I_{ML} pode ser estimado visualmente pela tendência de estabilização do sinal de fluorescência, já que, de fato, o valor de I tende a I_{ML} quando a concentração do metal é muito alta. Este procedimento, obviamente, é muito impreciso, e por isso é mais confiável obter este valor de forma matemática. Uma das formas de se estimar I_{ML} independentemente consiste em sua determinação por regressão não-linear pelo modelo desenvolvido por Luster e colaboradores (Equação 5) [75].

$$\left| \frac{I}{I_0} - 1 \right| = \left| \frac{I_{ML}}{I_0} - 1 \right| (1 - e^{-\alpha C_M}) \quad 5$$

Para se obter I_{ML} com a equação de Luster, um gráfico da fluorescência relativa em função da concentração de metal é ajustado à Equação 5, em que I é a intensidade de fluorescência de cada ponto, I_0 é o valor de fluorescência inicial e α uma constante do ajuste. Esta estratégia foi, então, utilizada para se analisar os resultados experimentais obtidos de forma automática e manual, e os parâmetros calculados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Valores do modelo de Ryan e Weber obtidos após cálculo de I_{ML} pelo modelo de Luster para as titulações de ácido húmico comercial realizadas de forma automática e manual.

		CL	I _{ML}	Log K	R ²
Repetição	Automático 1	3,42 x 10 ⁻⁰⁵	19,09	5,20	0,995
	Automático 2	3,88 x 10 ⁻⁰⁵	17,52	5,14	0,997
	Automático 3	4,43 x 10 ⁻⁰⁵	14,58	5,09	0,999
Estatística	Média	3,91 x 10 ⁻⁰⁵	17,06	5,14	
	Desvio Padrão	5,02 x 10 ⁻⁰⁶	2,29	0,06	
	CV	12,83%	13,41%	1,09%	
Repetição	Manual 1	3,71 x 10 ⁻⁰⁵	21,22	5,11	0,986
	Manual 2	3,75 x 10 ⁻⁰⁵	22,89	5,16	0,995
	Manual 3	3,16 x 10 ⁻⁰⁵	23,17	5,16	0,979
Estatística	Média	3,54 x 10 ⁻⁰⁵	22,43	5,14	
	Desvio Padrão	3,32 x 10 ⁻⁰⁶	1,05	0,03	
	CV	9,38%	4,70%	0,58%	

CV: Coeficiente de variação

Com a adaptação do modelo de Luster, todos os valores obtidos pelo ajuste matemático ficaram na ordem de grandeza esperada, e os valores das triplicatas ficaram muito mais próximos um dos outros, ou seja, obteve-se um menor coeficiente de variação dentro do experimento. Conseqüentemente, os parâmetros obtidos nos experimentos realizados de forma manual e automática podem ser comparados estatisticamente, e não apresentaram diferença significativa com 95% de confiança.

Estas informações sugerem que o cálculo de I_{ML} de forma independente torna o modelo de Ryan e Weber mais robusto, permitindo a sua utilização mesmo que o ajuste direto forneça resultados incoerentes. Além disso, diferentemente da utilização de outros modelos matemáticos propostos para descrever a interação entre substâncias húmicas e metais, que exigem diferentes abordagens experimentais e/ou maior complexidade nos cálculos, a adaptação de Luster pode ser facilmente realizada com a adição de um ajuste não linear prévio dos resultados. De fato, esta opção poderia ser inserida no programa de computador desenvolvido da mesma maneira que o ajuste ao modelo original foi.

Deve-se ficar atento, no entanto, às diferenças obtidas nos parâmetros ajustados com as duas abordagens. Com a adaptação de Luster, os valores de todos os parâmetros foram maiores, o que pode ser um indício de uma tendência de que os valores são maiores do que os reais, ou, ainda, que a abordagem acaba “maquiando” a qualidade relativamente baixa dos resultados experimentais, já que os valores inconclusivos dos parâmetros foram obtidos apenas nas titulações realizadas de forma manual. Enfim, os resultados obtidos não são suficientes para se realizar uma avaliação exata da abordagem de Luster, porém indicam uma melhora aparente nos resultados.

Durante as titulações manuais de substâncias húmicas comerciais, foram coletados dados de intensidade de fluorescência para os comprimentos de onda de excitação e emissão 360/415 nm e 330/450 nm, respectivamente. O primeiro par corresponde aos filtros que foram utilizados no fluorímetro nas titulações automáticas, e o segundo par corresponde ao determinado como máximo de excitação e emissão do mesmo ácido húmico comercial, em outro estudo [65]. Considerando que o resultado da titulação pode ser dependente dos comprimentos de onda em que o sinal analítico é utilizado, é importante verificar se há influência dos filtros utilizados nos resultados obtidos. Esta comparação foi possível graças à adaptação de Luster, que possibilitou a correção dos resultados incoerentes que também foram obtidos pelo ajuste direto dos dados da titulação realizada com $\lambda_{exc}/\lambda_{em} = 330/450$ nm ao modelo original. Estes resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Comparação entre os ajustes obtidos com a adaptação de Luster dos resultados das titulações manuais para dois pares de comprimentos de onda distintos.

		CL	IML	Log K	R ²
$\lambda_{exc} = 360$ $\lambda_{em} = 415$	1	3,71E-05	21,22	5,11	0,986
	2	3,75E-05	22,89	5,16	0,995
	3	3,16E-05	23,17	5,16	0,979
Estatística	Média	3,54E-05	22,43	5,14	
	Desvio Padrão	3,32E-06	1,05	0,03	
	CV	9,38%	4,70%	0,58%	
$\lambda_{exc} = 330$ $\lambda_{em} = 450$	1	4,01E-05	12,61	5,09	0,989
	2	4,32E-05	12,64	5,11	0,998
	3	3,67E-05	14,69	5,18	0,986
Estatística	Média	4,00E-05	13,31	5,13	
	Desvio Padrão	3,29E-06	1,19	0,05	
	CV	8,22%	8,96%	0,93%	

CV: Coeficiente de variação.

Observa-se que as diferenças nos valores de CL e Log K obtidos para os pares 330/450 e 360/415 foram relativamente baixas (13% e 2%, respectivamente), mas consideráveis para IML (40%), e que as variações nos resultados entre as repetições foram similares. A maior diferença entre os valores de IML provavelmente está relacionada à menor intensidade do sinal absoluto de fluorescência obtido nas titulações observadas em 360/415, já que, ao final do experimento (região da curva onde o valor de IML é definido), a menor variação no sinal analítico pode ter influenciado na detecção da supressão de fluorescência. Apesar das diferenças, os resultados das duas abordagens de leitura não apresentaram diferença significativa com 95% de confiança.

Quando comparados aos valores obtidos pela titulação automática (CL = $3,91 \times 10^{-05}$, IML = 17,06, Log K = 5,14), verifica-se que os parâmetros calculados para o par 330/450 foram mais próximos que os calculados para o mesmo par dos filtros do fluorímetro, com exceção de Log K, que foi praticamente o mesmo em todos os experimentos. Esta observação está provavelmente relacionada ao funcionamento dos dois detectores. O espectrofluorímetro utiliza redes de difração para separar as radiações de excitação e emissão, com resolução de até 0,1 nm, enquanto o fluorímetro utiliza filtros, que possuem resolução menor

e permitem a passagem de radiação em uma banda de 20 nm em torno do valor nominal. Conseqüentemente, o sinal obtido no fluorímetro durante as titulações automáticas era proveniente da excitação e da emissão em comprimentos de onda mais próximos aos de valor máximo, tornando, assim, os resultados obtidos mais similares. Esta diferença na obtenção dos sinais de fluorescência pode ser, inclusive, o motivo da pequena separação encontrada na comparação realizada entre as titulações automáticas e manuais (Figura 25).

4.2.2 Amostras de água natural

Os resultados obtidos com o ácido húmico comercial se mostraram suficientes para demonstrar que o instrumento desenvolvido é capaz de fornecer bons resultados, comparáveis aos provenientes dos experimentos realizados de forma manual. Como última forma de avaliação, procedeu-se para a titulação de amostras de água natural, sem extração ou concentração da matéria orgânica dissolvida, para se verificar o comportamento do equipamento na situação que caracteriza uma das principais qualidades do modelo de Ryan e Weber, que é a possibilidade de se estudar amostras com pré-tratamento mínimo. Os pontos de coleta foram escolhidos com o objetivo de se estudar diferentes pontos dos corpos d'água da região ao redor de Brasília, que poderiam possuir diferentes quantidades e tipos de matéria orgânica dissolvida, sem, no entanto, uma pesquisa aprofundada da hidrografia da região. Dentre os locais de amostragem, os pontos 1 e 3 são de córregos próximos ao Lago Paranoá, os pontos 2, 4 e 6 são amostras do próprio lago, próximo à margem, e o ponto 5 referente ao ponto de deságue de uma rede de efluentes fluviais no lago.

No momento da realização da titulação automática, o pH de uma alíquota da amostra de água natural foi ajustado para 6,0, e em seguida, o experimento iniciado. Os resultados obtidos para as seis amostras são apresentados na Figura 27. Como estas amostras não tinham características já conhecidas, como o ácido húmico comercial, e as titulações foram realizadas sem a presença de um operador, foram realizadas mais adições de cobre do que nos experimentos com a SH comercial, para garantir que toda a curva fosse adquirida. Os resultados obtidos, no entanto, demonstraram que a tendência de estabilização foi alcançada em menores concentrações de Cu^{2+} , e por isso os três últimos

pontos das curvas 1 a 4 e 6 foram omitidos na imagem para melhor visualização da parte mais significativa dos resultados.

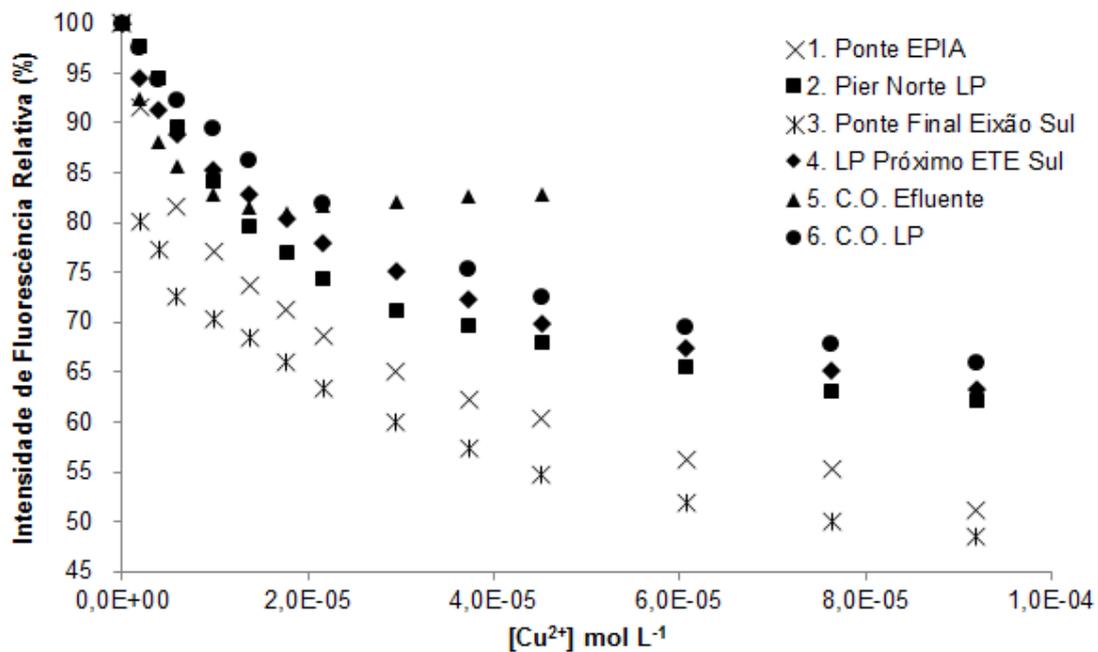


Figura 27. Resultados obtidos após as titulações das amostras de água natural.

A titulação da amostra referente ao ponto 5, do efluente fluvial, foi interrompida após a décima adição de titulante, pois era visível uma estabilização do sinal de fluorescência. Esta amostra tinha as características mais distintas, em especial quanto à coloração mais escura. Entre as outras amostras, observam-se dois grupos, o primeiro contendo as amostras dos pontos 2, 4 e 6, e o segundo contendo os pontos 3 e 5. Estes grupos são identificados pelo tipo do corpo aquático do local de amostragem, sendo o primeiro referente à água da margem do lago, e o segundo a água corrente. Observando-se os teores de carbono orgânico dissolvido para as amostras (Tabela 9), verifica-se que esses grupos não parecem ter relação com este parâmetro, logo, pode-se inferir que eles são diferenciados pelas características da matéria orgânica do local.

Tabela 9. Resultados da análise de carbono orgânico dissolvido das amostras de água natural.

	Local	Carbono Orgânico Dissolvido (mg L ⁻¹)
1	Ponte Estrada Parque Indústria e Abastecimento (EPIA)	1,164
2	Pier Norte do Lago Paranoá	0,586
3	Ponte ao final do Eixo Rodoviário Sul	0,513
4	Região da Estação de Tratamento de Água Sul (ETE Sul)	1,333
5	Centro Olímpico da Universidade de Brasília (C.O. UnB) – Efluente Fluvial	1,146
6	Centro Olímpico da Universidade de Brasília (C.O. UnB) – Lago Paranoá	0,186

As diferenças entre as quantidades de carbono orgânico dissolvido podem ser explicadas em função do acúmulo de matéria orgânica nas regiões dos pontos 1 e 4, sendo a primeira localizada no córrego abastecido pelo Lago Paranoá, que recebe aporte de matéria orgânica em toda sua extensão, e o ponto 4 pela localização próxima à estação de tratamento de esgoto. Os pontos 2 e 6 são referentes às coletas realizadas na margem do lago, em regiões pouco movimentadas e de menor acúmulo de matéria orgânica. A amostra de efluente fluvial possuía teor de matéria orgânica relativamente alto, possivelmente porque a água coletada estava mais concentrada em função da falta de chuvas nas semanas previamente à coleta.

A caracterização do tipo de matéria orgânica pode ser feita pela observação dos resultados obtidos pelo ajuste dos dados ao modelo de Ryan e Weber com a adaptação proposta por Luster (Tabela 10). Mesmo com o cálculo prévio de I_{ML} , a amostra 3 apresentou valor de C_L incoerente. Este resultado provavelmente está relacionado com a grande variação do primeiro para o segundo ponto da titulação, que pode ser observado na Figura 27 com intensidade de fluorescência de aproximadamente 80. O procedimento comum face a este problema seria a realização da titulação da amostra com menores adições no início do experimento. Esta repetição não foi realizada, no entanto, pois o objetivo principal deste trabalho era verificar o comportamento do equipamento desenvolvido, realizando todos os experimentos da mesma maneira.

Tabela 10. Valores obtidos para os ajustes das titulações de água natural ao modelo de Ryan e Weber com a adaptação de Luster.

		C_L	I_{ML}	Log K	R^2
	1	$7,60 \times 10^{-06}$	49,07	6,05	0,952
	2	$1,73 \times 10^{-05}$	59,86	5,24	0,980
Ponto de amostragem	3	$1,30 \times 10^{-15}$	50,97	5,30	0,923
	4	$1,47 \times 10^{-05}$	61,55	5,09	0,966
	5	$4,79 \times 10^{-06}$	81,88	6,44	0,981
	6	$2,64 \times 10^{-05}$	62,23	5,08	0,988

Em primeiro lugar, observa-se nos parâmetros ajustados um agrupamento similar ao verificado no gráfico, com as amostras 2, 4 e 6 possuindo valores maiores de C_L , e I_{ML} , e valores menores de Log K. O comportamento inverso é observado para as amostras 1 e 3, e a amostra 5 aparece sozinha, com destaque para os altos valores de I_{ML} e Log K.

A matéria orgânica dissolvida em águas naturais também pode ser caracterizada por meio de espectroscopia de fluorescência sincronizada, que tem como uma de suas principais características a detecção de diferentes fluoróforos em uma mesma amostra [76]. Estes fluoróforos podem, inclusive, ser divididos em categorias, como definido por Peuravuori e colaboradores, de acordo com a Figura 28 [77].

De acordo com os resultados obtidos por Peuravuori [77], o grau de humificação da matéria orgânica aumenta juntamente com o aumento dos comprimentos de onda de excitação e emissão, ou seja, na parte inicial do espectro os picos estão relacionados a matéria orgânica mais “jovem”, com moléculas de estrutura mais similares às biomoléculas que integram a matéria orgânica natural, enquanto as estruturas mais recalcitrantes, caracterizadas principalmente pela presença de vários anéis aromáticos conjugados, possuem fluoróforos que apresentam sinal a partir de $\lambda_{exc} = 340$ nm. Para se observar as diferenças relativas apenas ao tipo de matéria orgânica presente na amostra, independentemente de sua concentração, os espectros de fluorescência sincronizada são normalizados pelo teor de carbono orgânico. No presente trabalho, as amostras de água natural foram analisadas por esta abordagem, e os resultados são apresentados na Figura 29.

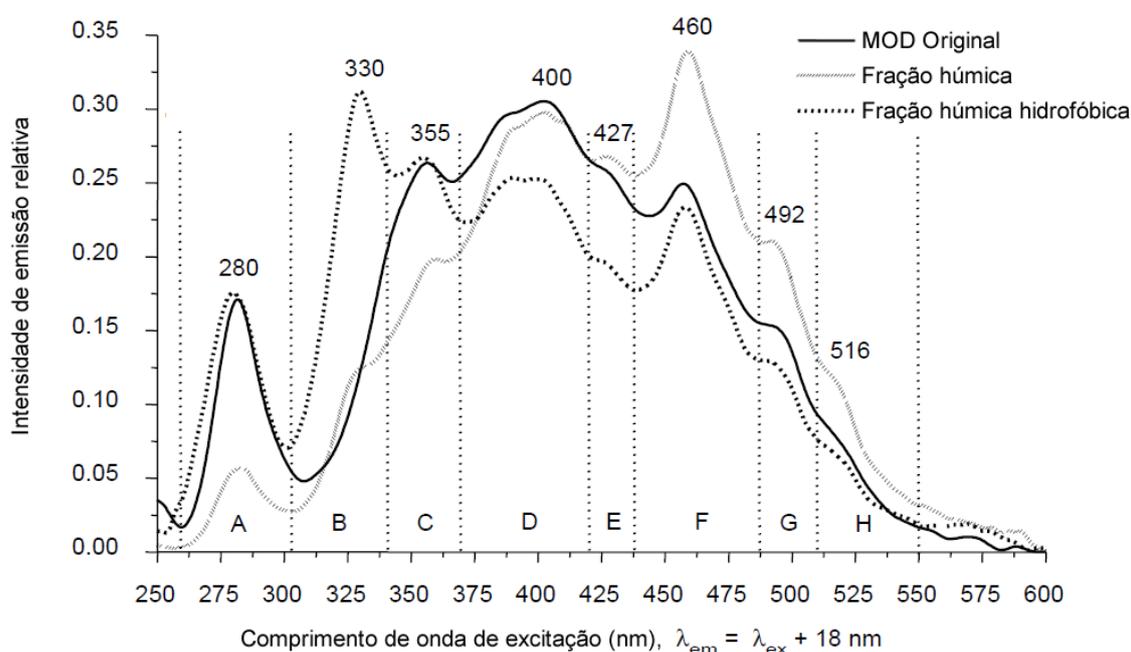


Figura 28. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para matéria orgânica dissolvida natural e para diferentes frações húmicas. ($\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$). As linhas tracejadas verticais delimitam as diferentes regiões dos espectros [77].

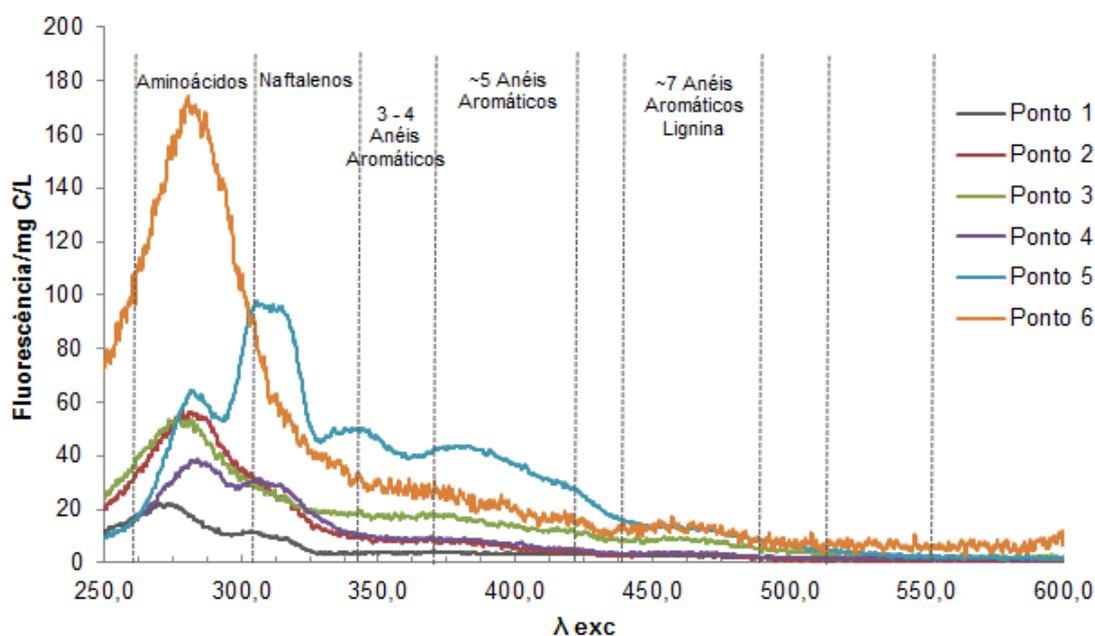


Figura 29. Espectros de fluorescência sincronizada obtidos para as amostras de água natural. ($\Delta\lambda = 18 \text{ nm}$). As linhas tracejadas verticais delimitam as diferentes regiões dos espectros [77].

Nota-se que os valores de intensidade de fluorescência normalizados para o espectro da amostra 6 são consideravelmente mais altos que os demais, o que pode ser resultado do baixo teor de carbono orgânico dissolvido determinado. Apesar disso, o comportamento apresentado é o mesmo das

amostras 1 a 4, com pico de maior intensidade em torno de 275 nm. A amostra 5, mais uma vez, apresentou resultados distintos das demais, com picos mais intensos na região de 310 nm e, também, outras bandas em 350 e 380 nm. A principal constatação desta análise, no entanto, é relativa a todas as amostras, pois em nenhuma delas foi encontrado sinal significativo na região relacionada às substâncias húmicas, logo, pode-se dizer que as moléculas fluorescentes das amostras de água natural eram, em sua grande maioria, não-humificadas.

Este resultado não invalida as análises feitas anteriormente, ao contrário, indica que os resultados de baixa qualidade obtidos em alguns casos (mais especificamente a rápida titulação da amostra 5 e o decréscimo significativo no segundo ponto da titulação da amostra 3) podem ser em virtude das pequenas concentrações de substâncias húmicas nas amostras. Além disso, verifica-se que o equipamento realizou com sucesso as titulações destas amostras, pois a maioria dos resultados encontrados foi satisfatória. A supressão de fluorescência encontrada nas amostras pode estar relacionada a outras moléculas fluorescentes presentes que também interagiram com o cobre(II). Entretanto, a maioria dos fluoróforos das amostras não sofreu supressão da fluorescência pela adição do metal, o que foi demonstrado pelos altos valores de I_{ML} das amostras de água natural (entre 50 e 80) quando comparados ao do ácido húmico comercial (menores que 20). Vale destacar que as amostras de água natural foram analisadas apenas com intuito de verificar a performance do equipamento e que não seria correto chegar a conclusões mais aprofundadas sobre as amostras ou seus locais de origem, até porque uma única coleta de um pequeno volume de água dificilmente pode ser considerada representativa de um sistema tão complexo.

5. CONCLUSÕES

O equipamento desenvolvido foi considerado eficaz na realização das titulações, realizando o experimento de forma automática, alcançando, assim, seu principal objetivo. As etapas preliminares do trabalho foram muito importantes para o estudo independente dos diferentes mecanismos envolvidos na titulação, assim como da melhor abordagem para a montagem do sistema. A eficácia do instrumento foi comprovada comparando resultados obtidos no equipamento com os do método clássico, fornecendo resultados sem diferenças significativas, e por meio de sua aplicação no estudo de amostras reais.

O custo estimado do equipamento, incluindo todos seus dispositivos, foi de aproximadamente US\$ 3500,00, valor considerado baixo levando-se em consideração o ganho de praticidade e qualidade dos resultados quando obtidos por meio da titulação automática. Vale destacar que, apesar do foco na interação entre substâncias húmicas e cobre(II), o instrumento pode ser utilizado para a caracterização das interações com outras substâncias, metais ou não, e até com outros tipos de analitos, contanto que ocorra supressão de fluorescência frente ao composto.

Foram incluídos no programa de computador desenvolvido recursos adicionais que não puderam ser amplamente testados neste trabalho, como outro algoritmo para a adição de reagente (baseado nos resultados dos pontos anteriores do próprio experimento), e outros recursos poderiam ser adicionados com certa facilidade como, por exemplo, monitoramento da fluorescência durante a titulação para se determinar o tempo de estabilização, que poderia levar a uma redução do tempo total da análise.

Além do programa de computador, o instrumento também pode ser aperfeiçoado com a adição de um sistema para troca de amostras de forma automática, que aumentaria a frequência analítica consideravelmente, com a troca dos filtros de excitação e emissão utilizados no fluorímetro, ou até mesmo com a substituição do fluorímetro por um espectrofluorímetro, que forneceria diversos recursos mais avançados (como análise por fluorescência sincronizada e obtenção de espectros), mas também tornaria o instrumento

consideravelmente mais caro. Outra possível abordagem para a modificação do sistema seria a utilização de coulometria para a geração de íons Cu^{2+} diretamente na amostra, que teria como principais vantagens a remoção da bomba de seringa e a manutenção de um volume sempre constante de solução. Devido à complexidade, no entanto, esta abordagem teria que ser cuidadosamente estudada antes de sua implantação.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Piccolo, A. The Supramolecular Structure of Humic Substances. *Soil Science*, **2001**, 116.
- [2] Schnitzer, M.; Khan, S.U. *Humic Substances in the Environment*; Marcel Dekker, INC: New York, **1972**.
- [3] International Humic Substances Society. Disponível em: <<http://www.humicsubstances.org/whatarehs.html>>, acesso em: 10 dez. 2014.
- [4] Zandonadi, D.B.; Canellas, L.P.; Façanha, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta*, **2007**, 225, 1583–1595.
- [5] Canellas, L.P.; Dobbss, L.B.; Oliveira, A.L.; Chagas, J.G.; Aguiar, N.O.; Rumjanek, V.M.; Novotny, E.H.; Olivares, F.L.; Spaccini, R.; Piccolo, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. *European Journal of Soil Science*, **2012**, 63, 315–324.
- [6] García, A.C.; Santos, L.A.; Izquierdo, F.G.; Rumjanek, V.M.; Castro, R.N.; Santos, F.S. dos; Souza, L.G.A. de; Berbara, R.L.L. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochemical Exploration*, **2014**, 136, 48–54.
- [7] Rocha, J.C.; Rosa, A.H. *Substâncias húmicas aquáticas: Interação com espécies metálicas*; Editora Unesp, **2003**.
- [8] Buffle, J. *Complexation Reactions in Aquatic Systems; Analytical Approach*; Ellis Horwood: New York, **1990**.
- [9] Stevenson, F.J. *Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, micronutrients.*; John Wiley & Sons: New York, **1985**.
- [10] Xiaoli, C.; Shimaoka, T.; Qiang, G.; Youcai, Z. Characterization of humic and fulvic acids extracted from landfill by elemental composition, ¹³C CP/MAS NMR and TMAH-Py-GC/MS. *Waste Management*, **2008**, 28, 896–903.
- [11] Rocha, J.C.; Sene, J.J. de; Burba, P.; Klockow, D. Interaction of Mercury(II) with Humic Substances from the Rio Negro (Amazonas State, Brazil) by Means of an Ion Exchange Procedure. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **1998**, 9, 79–84.
- [12] Sodr e, F.F.; Schnitzler, D.C.; Scheffer, E.W.O.; Grassi, M.T. Evaluating Copper Behavior in Urban Surface Waters Under Anthropic Influence. A Case Study from the Iguac u River, Brazil. *Aquatic Geochemistry*, **2012**, 18, 389–405.
- [13] Tang, W.-W.; Zeng, G.-M.; Liang, J.-L.G.J.; Xu, P.; Zhang, C.; Huang, B.-B. Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. *Science of the Total Environment*, **2014**, 468-469, 1014–1027.
- [14] Ryan, B.M.; Kirby, J.K.; Degryse, F.; Scheiderich, K.; McLaughlin, M.J. Copper Isotope Fractionation during Equilibration with Natural and Synthetic Ligands. *Environmental Science and Technology*, **2014**, 48, 8620–8626.
- [15] Botero, W.G.; Souza, S. de O.; Santos, O.S.; Oliveira, L.C. de; Amarante, C.B. do. Influence of Sediment Humic Substances on the Bioavailability of Metals in the Aquatic System. *Química Nova*, **2014**.

- [16] Kang, J.; Zhang, Z.; Wang, J.J. Influence of Humic Substances on Bioavailability of Cu and Zn during Sewage Sludge Composting. *Bioresource Technology*, **2011**, *102*, 8022–8026.
- [17] DePalma, S.G.S.; Ray Arnold, W.; McGeer, J.C.; George Dixon, D.; Scott Smith, D. Effects of Dissolved Organic Matter and Reduced Sulphur on Copper Bioavailability in Coastal Marine Environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **2011**, *74*, 230–237.
- [18] Slaveykova, V.I. Predicting Pb Bioavailability to Freshwater Microalgae in the Presence of Fulvic Acid: Algal Cell Density as a Variable. *Chemosphere*, **2007**, *69*, 1438–1445.
- [19] Lind, Y.; Glynn, A.W. The Influence of Humic Substances on the Absorption and Distribution of Cadmium in Mice. *Pharmacology & Toxicology*, **1999**, *84*, 267–273.
- [20] Dhillon, K.S.; Sinha, M.K.; Randhawa, N.S. Organo-metallic phosphates. *Plant and Soil*, **1975**, *43*, 317–326.
- [21] Picard, G.L.; Jr., G.T.F. The complexation of iron by marine humic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **1976**, *40*, 1347–1350.
- [22] Van den Berg, C.M.G.; Kramer, J.R. Determination of complexing capacities of ligands in natural waters and conditional stability constants of the copper complexes by means of manganese dioxide. *Analytica Chimica Acta*, **1979**, *106*, 113–120.
- [23] Ruzic, I. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Analytica Chimica Acta*, **1982**, *140*, 99–113.
- [24] Ryan, D.K.; Weber, J.H. Fluorescence Quenching Titration for Determination of Complexing Capacities and Stability Constants of Fulvic Acid. *Analytical Chemistry*, **1982**, *54*, 986–990.
- [25] Lombardi, A.T.; Jardim, W.F. Synchronous-Scan Fluorescence and the Complexation of Copper (II) Ions by Humic Substances. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **1997**, *8*, 339–342.
- [26] Plaza, C.; Brunetti, G.; Senesi, N. Fluorescence characterization of metal ion–humic acid interactions in soils amended with composted municipal solid wastes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, *386*, 2133–2140.
- [27] Ohno, T.; Amirbahman, A.; Bro, R. Parallel Factor Analysis of Excitation–Emission Matrix Fluorescence Spectra of Water Soluble Soil Organic Matter as Basis for the Determination of Conditional Metal Binding Parameters. *Environmental Science & Technology*, **2008**, *42*, 186–192.
- [28] De Oliveira, C.R.; Lombardi, A.T.; Jardim, W.F. Copper Complexation by Naturally Occurring Organic Matter: A Multiligand Model. *Chem. Speciation Bioavail.*, **1995**, *7*, 125–131.
- [29] Hays, M.D.; Ryan, D.K.; Pennell, S. A Modified Multisite Stern–Volmer Equation for the Determination of Conditional Stability Constants and Ligand Concentrations of Soil Fulvic Acid with Metal Ions. *Analytical Chemistry*, **2004**, *76*, 848–854.
- [30] Da Silva, J.; Machado, A.; Oliveira, C.J.S.; Pinto, M. Fluorescence Quenching of Anthropogenic Fulvic Acids by Cu(II), Fe(III) and UO₂²⁺. *Talanta*, **1998**, *45*, 1155–1165.

- [31] Wu, F.; Bai, Y.; Mu, Y.; Pan, B.; Xing, B.; Lin, Y. Fluorescence quenching of fulvic acids by fullerene in water. *Environmental Pollution*, **2013**, *172*, 100–107.
- [32] Sodré, F.F.; Grassi, M.T. Assessment of anthropogenic influences on copper complexation by aquatic dissolved organic matter using synchronous fluorescence. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2007**, *18*, 1136–1144.
- [33] Ventry, L.S.; Ryan, D.K.; Gilbert, T.R. A rapid fluorescence quenching method for the determination of equilibrium parameters for copper(II) complexation by humic materials. *Microchemical Journal*, **1991**, *44*, 201–214.
- [34] Peng, N.; Wang, K.; Liu, G.; Li, F.; Yao, K.; Lv, W. Quantifying interactions between propranolol and dissolved organic matter (DOM) from different sources using fluorescence spectroscopy. *Environmental Science and Pollution Research*, **2014**, *21*, 5217–5226.
- [35] Zhang, Y.; Zhang, Y.; Yu, T. Quantitative characterization of Cu binding potential of dissolved organic matter (DOM) in sediment from Taihu Lake using multiple techniques. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, **2014**, *8*, 666–674.
- [36] Nuzzo, A.; Sánchez, A.; Fontaine, B.; Piccolo, A. Conformational Changes of Dissolved Humic and Fulvic Superstructures with Progressive Iron Complexation. *Journal of Geochemical Exploration*, **2013**, *129*, 1–5.
- [37] Olsen, K. The First 110 Years of Laboratory Automation: Technologies, Applications, and the Creative Scientist. *Journal of Laboratory Automation*, **2012**, *17*, 469–480.
- [38] Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R.; Grassi, M.T. *Fundamentos de Química Analítica*; Cengage Learning: São Paulo, **2006**.
- [39] Mohammed, B.S.; Fields, D.A.; Mittendorfer, B.; Coggan, A.R.; Klein, S. Are Peristaltic Pumps as Reliable as Syringe Pumps for Metabolic Research? Assessment of Accuracy, Precision, and Metabolic Kinetics. *Metabolism*, **2004**, *53*, 875–878.
- [40] Fajardo, Y.; Avivar, J.; Ferrer, L.; Gómez, E.; Cerdà, V.; Casas, M. Automation of Radiochemical Analysis by Applying Flow Techniques to Environmental Samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, *29*, 1399–1408.
- [41] Opheim, L.-N.; Lund, W. The Use of Peristaltic Mini-Pumps in Automatic Analysis. *Analytica Chimica Acta*, **1977**, *90*, 245–247.
- [42] ADInstruments. Disponível em: <<https://www.adinstruments.com/products/reflective-drop-counter>>, acesso em: 21 dez. 2014.
- [43] Pasco. Disponível em: <http://www.pasco.com/prodCatalog/PS/PS-2117_pasport-high-accuracy-drop-counter/>, acesso em: 21 dez. 2014.
- [44] Vernier. Disponível em: <<http://www.vernier.com/files/manuals/vdc-btd.pdf>>, acesso em: 21 dez. 2014.
- [45] Sahoo, P.; Malathi, N.; Ananthanarayanan, R.; Praveen, K.; Murali, N. A Novel Approach for High Precision Rapid Potentiometric Titrations: Application to Hydrazine Assay. *Review of Scientific Instruments*, **2011**, *82*, 114102.
- [46] Sweileh, J.A.; Dasgupta, P.K. Applications of in Situ Detection with an Automated Micro Batch Analyzer. *Analytica Chimica Acta*, **1988**, *214*, 107–120.

- [47] Silva, M.B. da; Crispino, C.C.; Reis, B.F. Automatic photometric titration procedure based on multicommutation and flow-batch approaches employing a photometer based on twin LEDs. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2010**, *21*, 1854–1860.
- [48] Kozak, J.; Wójtowicz, M.; Gawenda, N.; Kościelniak, P. An Automatic System for Acidity Determination Based on Sequential Injection Titration and the Monosegmented Flow Approach. *Talanta*, **2011**, *84*, 1379–1383.
- [49] Li, Q.; Wang, F.; Wang, Z.A.; Yuan, D.; Dai, M.; Chen, J.; Dai, J.; Hoering, K.A. Automated Spectrophotometric Analyzer for Rapid Single-Point Titration of Seawater Total Alkalinity. *Environmental Science & Technology*, **2013**, *47*, 11139–11146.
- [50] Horstkotte, B.; Tovar Sánchez, A.; Duarte, C.M.; Cerdà, V. Sequential Injection Analysis for Automation of the Winkler Methodology, with Real-Time SIMPLEX Optimization and Shipboard Application. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, *658*, 147–155.
- [51] Castillo, J.; Hung, J.; Goncalves, S.; Reyes, A. Study of Asphaltenes Aggregation Process in Crude Oils Using Confocal Microscopy. *Energy & Fuels*, **2004**, *18*, 698–703.
- [52] Hoffmann, W. Computer controlled titration with piston burette or peristaltic pump—a comparison. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, **1996**, *356*, 303–305.
- [53] Ocanto, O.; Marcano, F.; Castillo, J.; Fernández, A.; Caetano, M.; Chirinos, J.; Ranaudo, M.A. Influence of Experimental Parameters on the Determination of Asphaltenes Flocculation Onset by the Titration Method. *Energy & Fuels*, **2009**, *23*, 3039–3044.
- [54] Lins, E.S. Desenvolvimento de um Sistema de Análise por Injeção em Fluxo com Fotoderivatização para Determinação de NNG em Glifosato, Universidade de Brasília: Brasília, **2013**.
- [55] Lamb, J.J.; Eaton-Rye, J.J.; Hohmann-Marriott, M.F. An LED-Based Fluorometer for Chlorophyll Quantification in the Laboratory and in the Field. *Photosynthesis Research*, **2012**, *114*, 59–68.
- [56] Almeida, C.M.N.V.; Lapa, R.A.S.; Lima, J.L.F.C.; Zagatto, E.A.G.; Araújo, M.C.U. An Automatic Titrator Based on a Multicommutated Unsegmented Flow System. *Analytica Chimica Acta*, **2000**, *407*, 213–223.
- [57] Ramirez, A. A simple differential titrator for automatic potentiometric titration at zero current, with two identical indicator electrodes. *Talanta*, **1992**, *39*, 1121–1126.
- [58] Kanyanee, T.; Fuekhd, P.; Grudpan, K. Micro Coulometric Titration in a Liquid Drop. *Talanta*, **2013**, *115*, 258–262.
- [59] Oliveira, S.C.B.; Coelho, E.C.S.; Selva, T.M.G.; Santos, F.P.; Araújo, M.C.U.; Abreu, F.C.; Nascimento, V.B. A Coulometric Flow Cell for in-Line Generation of Reagent, Titrant or Standard Solutions. *Microchemical Journal*, **2006**, *82*, 220–225.
- [60] Hădărugă, N.G.; Hădărugă, D.I.; Isengard, H.-D. “Surface Water” and “strong-Bonded Water” in Cyclodextrins: A Karl Fischer Titration Approach. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, **2013**, *75*, 297–302.
- [61] He, N.; Lindfors, T. Determination of Water Uptake of Polymeric Ion-Selective Membranes with the Coulometric Karl Fischer and FT-IR-

- Attenuated Total Reflection Techniques. *Analytical Chemistry*, **2013**, *85*, 1006–1012.
- [62] Merkh, G.; Pfaff, R.; Isengard, H.-D. Capabilities of Automated Karl Fischer Titration Combined with Gas Extraction for Water Determination in Selected Dairy Products. *Food Chemistry*, **2012**, *132*, 1736–1740.
- [63] Zagatto, E.A.G.; Jacintho, A.O.; Mortatti, J. An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. *Analytica Chimica Acta*, **1980**, *120*, 399–403.
- [64] Ivanov, V.M. The 125th Anniversary of the Griess Reagent. *Journal of Analytical Chemistry*, **2004**, *29*, 1002–1005.
- [65] Sodré, F.F. Especificação do cobre em águas naturais: Influência de fatores associados à urbanização, Universidade de Brasília: Brasília, **2005**.
- [66] Hays, M.D.; Ryan, D.K.; Pennell, S.; Milenkovic, L.V. Data Treatments for Relating Metal-Ion Binding to Fulvic Acid as Measured by Fluorescence Spectroscopy. In *Humic and Fulvic Acids*; **1996**; Vol. 651, p. 108–124.
- [67] Silva, J.C.G.E. da; Machado, A., A. S. C.; Silva, M.A.B.A. Acid-base properties of fulvic acids extracted from an untreated sewage sludge and from composted sludge. *Water Research*, **1998**, *32*, 441–449.
- [68] Nocedal, J.; Wright, S.J. *Numerical Optimization*; Springer series in operations research and financial engineering; Springer, **1999**.
- [69] Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Resolução nº 357, **2005**.
- [70] Qualiterm. Disponível em: <<http://www.qualiterm.com.br/produtos.htm>>, acesso em: 1 jun. 2015.
- [71] Lehner, F.K. On the Validity of Fick's Law for Transient Diffusion through a Porous Medium. *Chemical Engineering Science*, **1979**, *34*, 821–825.
- [72] Lombardi, A.T.; Jardim, W.F. The Complexation of Marine and Terrestrial Organic Materials with Copper (II) Ions as Determined by Fluorescence Quenching. *Chem. Speciation Bioavail.*, **1997**, *9*, 27–34.
- [73] Cabaniss, S.E.; Shuman, M.S. Combined Ion Selective Electrode and Fluorescence Quenching Detection for Copper-Dissolved Organic Matter Titrations. *Analytical Chemistry*, **1986**, *58*, 398–401.
- [74] Plaza, C.; Brunetti, G.; Senesi, N.; Polo, A. Molecular and Quantitative Analysis of Metal Ion Binding to Humic Acids from Sewage Sludge and Sludge-Amended Soils by Fluorescence Spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, **2006**, *40*, 917–923.
- [75] Luster, J.; Lloyd, T.; Sposito, G.; Fry, I.V. Multi-Wavelength Molecular Fluorescence Spectrometry for Quantitative Characterization of Copper(II) and Aluminum(III) Complexation by Dissolved Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, **1996**, *30*, 1565–1574.
- [76] Patra, D.; Mishra, A.K. Recent developments in multi-component synchronous fluorescence scan analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2002**, *21*, 787–798.
- [77] Peuravuori, J.; Koivikko, R.; Pihlaja, K. Characterization, differentiation and classification of aquatic humic matter separated with different sorbents: synchronous scanning fluorescence spectroscopy. *Water research*, **2002**, *36*, 4552–4562.