ESPECIAÇÃO DE COBRE EM SISTEMAS AQUÁTICOS

HELENA MARIA VIEIRA MONTEIRO SOARES

Dissertação para Doutoramento em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

PORTO
1995

ESPECIAÇÃO DE COBRE EM SISTEMAS AQUÁTICOS

HELENA MARIA VIEIRA MONTEIRO SOARES

Dissertação para Doutoramento em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

PORTO
1995

Ao Eduardo
Aos meus Pais.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Teresa Vasconcelos desejo exprimir o meu reconhecimento e gratidão pela orientação, incentivo, disponibilidade sempre demonstrada e pelos valiosos conhecimentos que me transmitiu, bem como todas as facilidades concedidas ao longo dos últimos cinco anos.

Ao Professor Doutor Adélio A. S. C. Machado quero expressar o meu agradecimento pelo apoio, incitamento, críticas e sugestões.

A ambos agradeço ainda a disponibilização dos meios científicos e materiais do LAQUIPAI.

Ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, através do Professor João Rui Guedes de Carvalho, Presidente do Departamento, agradeço todas as facilidades concedidas e em particular a dispensa de serviço docente para a realização da actividade científica de que o presente trabalho é tradução.

Ao Instituto de Botânica Dr. Gonçalo Sampaio da Universidade do Porto, através do Professor Doutor Roberto Salema, Director do Instituto, e ao Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, agradeço as facilidades concedidas para a realização dos estudos de interface Química/Microbiologia, em colaboração com a Professora Doutora Ana Maria Parente e Olga Lage.

À Srª Drª Maria Fernanda Cabral e ao Professor Doutor João Cabral agradeço todas as gentilezas concedidas, designadamente a disponibilização de diversos livros, artigos e revistas e a purificação do mercúrio usado nas técnicas electroquímicas.

Ao Doutor Rui Boaventura quero agradecer a gentil cedência do polarógrafo Metrohm E 506, para a realização das experiências de Potenciometria de Corrente Alternada, e do analisador de carbono total IONICS 1258, para a determinação do carbono orgânico total.

À Cidália Botelho agradeço a cedência do programa de especiação MICROQL (II), bem como todas as discussões salutares surgidas no decorrer do trabalho experimental.

Ao Sr António Júlio Teixeira de Sousa o meu agradecimento pela forma dedicada e eficaz como me apoiou na execução de trabalho laboratorial.

Agradeço a todos os colegas do LAQUIPAI o incentivo e inter-ajuda dispensados, bem como a salutar troca de opiniões. Uma palavra especial de apreço para os colegas Helena Ferreira Tavares e Paulo Alexandre Pereira da Silva (pelo apoio na utilização dos aparelhos de Espectrofotometria de Absorção Atómica) e Carlos Gomes (pela ajuda nos aspectos informáticos).

A todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuiram para a concretização deste trabalho, quero expressar o meu agradecimento.

Finalmente, a todos os amigos e familiares agradeço o apoio, o estimulo e a compreensão que incondicionalmente me dispensaram.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS i
ÍNDICE iii
RESUMO ix
ABSTRACT xiii
ABREVIATURAS xvii

PARTE 1 INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 APRESENTAÇÃO DO TEMA 3
Cobre no meio ambiente 4
Coordenação dos metais *vs.* toxicidade 5
Especiação: porquê e como? 6
Boas práticas laboratoriais 9
1.1.2 OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE 10
REFERÊNCIAS 12

PARTE 2 METODOLOGIA

CAPÍTULO 2.1 Técnicas Analíticas

2.1.1 POTENCIOMETRIA COM ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE IÕES 19
2.1.2 POLAROGRAFIA DIFERENCIAL COM IMPULSOS 20
2.1.3 TÉCNICAS DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA: VRADI E PRA 24
2.1.4 POLAROGRAFIA COM CORRENTE ALTERNADA 28
2.1.5 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA 29
2.1.6 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL 31
REFERÊNCIAS 31

CAPÍTULO 2.2 Procedimento Experimental

2.2.1 REAGENTES 35
2.2.2 SOLUÇÕES 36
2.2.2.1 Soluções de partida 36
2.2.2.2 Outras soluções 37
2.2.3 EQUIPAMENTOS 39
2.2.3.1 Potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre 39
2.2.3.2 Polarografia diferencial com impulsos e voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos 39
2.2.3.3 Potenciometria de redissolução anódica 40
2.2.3.4 Polarografia com corrente alternada 40
2.2.3.5 Sistema de digestão de amostras 41
2.2.3.6 Espectrofotometria de absorção atómica 41
2.2.3.7 Determinação do carbono orgânico total 41
2.2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 41
2.2.4.1 Determinações por potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre 42
2.2.4.2 Determinações por técnicas de redissolução anódica 42
2.2.4.3 Determinações por polarografia com corrente alternada 43
2.2.4.4 Determinações por espectrofotometria de absorção atómica 43
REFERÊNCIAS 45

CAPÍTULO 2.3 Métodos de Cálculo

2.3.1 DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE ESTABILIDADE CONDICIONAIS DE COMPLEXOS COM COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO LÁBIL 47
2.3.1.1 Cálculo de constantes de estabilidade condicionais a partir dos desvios do potencial do pico 47
2.3.1.2 Cálculo de constantes de estabilidade condicionais a partir das intensidades dos picos 50
2.3.2 CÁLCULO DE β_j' A PARTIR DE CONSTANTES DE ESTABILIDADE ESTEQUIOMÉTRICAS DA LITERATURA. 51
2.3.3 MODELOS DE RUZIC E DE SCATCHARD 53
2.3.4 FUNÇÃO DE EQUILÍBRIO DIFERENCIAL 56
2.3.5 CÁLCULO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO 58
2.3.6 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE EQUILÍBRIO QUÍMICO 58
REFERÊNCIAS 59

PARTE 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3.1 Estudo da Labilidade de Complexos de Cobre(II) com AF por PESC e PRA

3.1.1 INTRODUÇÃO 63

3.1.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 65

3.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66

3.1.3.1 Determinação dos parâmetros de complexação por PESC 66

3.1.3.2 Determinações por PRA 73

Escolha do potencial de deposição 73

Estabelecimento do equilíbrio químico dos complexos cobre-AF 74

Verificação da ocorrência de fenómenos de adsorção 75

Estudos de labilidade 76

3.1.4 CONCLUSÕES 83

REFERÊNCIAS 84

CAPÍTULO 3.2 Avaliação das Técnicas de Redissolução Anódica para Especiação de Cobre a Potenciais de Deposição Relativamente Elevados

3.2.1 INTRODUÇÃO 87

3.2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 90

3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 91

3.2.3.1 Avaliação comparativa da PRA e da VRADI para determinação de cobre com deposição a - 0,3 V 91

Potenciometria de redissolução anódica 92

Voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos 94

3.2.4 CONCLUSÕES 96

REFERÊNCIAS 96

CAPÍTULO 3.3 Aplicação da PRA à Determinação de Constantes de Formação Condicionais de Complexos de Cobre com Ligandos que Não São Adsorvidos à Superfície do Eléctrodo

3.3.1 INTRODUÇÃO 99

3.3.2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO 100

3.3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 102

3.3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 103

3.3.4.1 Verificação da ausência de fenómenos de adsorção 103

3.3.4.2 Efeitos de superfície 104

3.3.4.3 Complexação 106

3.3.5 CONCLUSÕES 111

REFERÊNCIAS 111

CAPÍTULO 3.4 Aplicação da PRA à Determinação de Constantes de Formação Condicionais de Complexos de Cobre com Ligandos que São Adsorvidos à Superfície do Eléctrodo

3.4.1 INTRODUÇÃO 115

3.4.2 DIFICULDADES NA INTERPRETAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPLEXAÇÃO METAL-AH OBTIDOS POR TÉCNICAS DE VARRIMENTO 117

3.4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 118

3.4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 119

3.4.4.1 Determinação da capacidade de complexação dos AH por PESC 119

3.4.4.2 Verificação da ocorrência de fenómenos de adsorção 120

3.4.4.3 Determinações por PESC/PDI 123

3.4.4.4 Influência da adsorção nos parâmetros electroquímicos obtidos por PRA e VRADI 125

Variação da intensidade do sinal e de ΔEp em função do tempo de deposição 125

Influência da concentração de AH na ΔEp 129

3.4.4.5 Determinação de parâmetros de complexação 132

3.4.5 CONCLUSÕES 135

REFERÊNCIAS 136

CAPÍTULO 3.5 Especiação de Cobre em Meios de Cultura da Microalga Marinha Amphidinium carterae e Sua Influência na Toxicidade do Metal

3.5.1 INTRODUÇÃO 139

3.5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 142

3.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 144

3.5.3.1 Optimização do método para determinação de cobre por EAA-AE em microalgas marinhas 144

Optimização do programa de temperaturas do atomizador electrotérmico 144

Influência da concentração do ácido nítrico no sinal analítico do cobre 146

Verificação da ausência de outras interferências químicas 146

3.5.3.2 Estudo da influência da especiação do cobre(II) na sua toxicidade para *Amphidinium carterae* 147

Resultados dos estudos biológicos 148

Interpretação dos resultados com base na especiação química do metal calculada 149

Estudos de labilidade electroquímica 154

Níveis de cobre nas células 156

Níveis de zinco nas células 159

3.5.4 CONCLUSÕES 160

REFERÊNCIAS 160

PARTE 4 CONCLUSÕES

CONCLUSÕES 165

APÊNDICES

APÊNDICE 1 Verificação da Ausência de Complexação Cu(II)-PIPES a pH 6,5 171

APÊNDICE 2 *Verificação da Ausência de Complexação Cu(II)-HEPES a pH 6,5* 173

APÊNDICE 3 *Matriz de Dados Estequiométricos de Equilíbrio Químico e Resultados Obtidos na Especiação de uma Solução 150 mg/L emAF e 3,15 µmol/L em Cobre(II)* 175

APÊNDICE 4 *Matriz de Dados Estequiométricos de Equilíbrio Químico e Resultados Obtidos na Especiação de EDTA 14,9 µmol/L e 13,4 µmol/L de Cobre(II)* 179

RESUMO

A potenciometria de redissolução anódica (PRA) foi aplicada a estudos de especiação de cobre. Na maior parte dos trabalhos realizados usou-se, em paralelo, a voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos (VRADI) para comparação dos resultados. A potenciometria com eléctrodo selectivo a catião cobre(II) (PESC) e a polarografia diferencial com impulsos (PDI) foram também usadas, em alguns casos, para obter algumas informações complementares.

Em termos gerais, verificou-se que a PRA tem potencialidades quer para estudos de labilidade electroquímica de complexos quer para determinação das respectivas constantes de formação condicionais. Em meios de salinidade elevada, como por exemplo soluções ricas em anião cloreto e/ou na presença de espécies surfactantes que sejam adsorvidas à superfície do eléctrodo de mercúrio (eléctrodo de trabalho usado neste caso), a PRA revelou ser vantajosa relativamente à VRADI. A PRA permitiu fazer determinações de cobre em meio sintético a um potencial de deposição menos negativo (-0,3 V) do que o exigido para VRADI (-0,4 V), embora o limite de detecção fosse relativamente elevado (0,28 μmol/L; t_d = 3 minutos). Por outro lado, o efeito da presença de substâncias adsorvíveis à superfície do eléctrodo (ácidos húmicos, AH, neste caso) nas características do sinal em PRA só se manifestou para concentrações de AH superiores a 0,1 mmol/L, marcadamente mais elevadas do que aquelas em que interferiu em VRADI.

Mais concretamente, a PRA foi aplicada aos seguintes estudos:

(i) Constantes condicionais de formação de complexos de cobre(II) com glicina, (um sistema já bem estudado cujo ligando não é adsorvido à superfície do eléctrodo). Os resultados obtidos por PRA foram praticamente coincidentes com os obtidos por VRADI e com dados da literatura. Este estudo permitiu concluir que a PRA pode ser aplicada à determinação de parâmetros de complexação de ligandos simples na ausência de fenómenos de adsorção.

(ii) Função de equilíbrio diferencial (K_{fed}) dos complexos de cobre(II) com AH comerciais no intervalo de razões molares de $[AH]_t/[Cu]_t$ entre 131 e 38. Para concentrações de AH entre 23 e 100 μmol/L (expressas em termos de capacidade de complexação determinadas por PESC) a adsorção de AH à superfície do eléctrodo de mercúrio (verificada experimentalmente) não afectou, notoriamente, os resultados obtidos por PRA mas afectou os obtidos por VRADI. Observaram-se valores de K_{fed} entre 9,8, para $\theta = 8 \times 10^{-3}$, e 8,4, para $\theta = 2 \times 10^{-2}$, sendo θ o grau de ocupação dos locais de fixação do metal.

(iii) Labilidade de complexos de cobre(II) com ácidos fúlvicos (AF) de origem pedogénica no intervalo de razões molares $[AF]_t/[Cu]_t$ entre 89 e 1,6. O sistema foi estudado em meios de perclorato de sódio 0,5 mol/L e em água do mar sintética. Não foram observados fenómenos de adsorção à superfície do eléctrodo de mercúrio. Os parâmetros de complexação em situação de equilíbrio, necessários à interpretação dos resultados, foram obtidos por PESC: capacidade de complexação, 1,8 mmol/g AF, constante no intervalo entre 1 e 150 AF/L e constantes de formação condicionais, $\log K_1' = 5,77 \pm 0,09$, $\log K_2' = 4,2 \pm 0,1$ (P = 0,05), a pH = 6,5, t = 20 °C e 100 mg/L de AF. Verificou-se que a labilidade dos complexos aumentava à medida que diminuia a razão molar $[AF]_t/[Cu]_t$ entre 89 (8 %) e 6 (64 %), tendo-se verificado um ligeiro decréscimo para razões inferiores;

(iv) Especiação de cobre em meios de cultura da microalga marinha Amphidinium carterae e sua influência na toxicidade do metal. A

biodisponibilidade do cobre foi estudada através dos seguintes parâmetros químicos: (a) labilidade electroquímica determinada por PRA; (b) especiação computacional com base nos valores das constantes de equilíbrio para as espécies químicas previsíveis na água do mar sintética usada na preparação dos meios de cultura; (c) quantidade de metal fixado às células (medido por espectrofotometria de absorção atómica). A discussão dos resultados foi baseada no crescimento das culturas na presença de cobre(II) (parâmetro biológico). Verificou-se que o efeito tóxico do cobre não foi devido apenas ao metal livre tendo implicado a dissociação de complexos inorgânicos mas não de complexos de EDTA.

ABSTRACT

Potentiometer Stripping Analysis (PSA) was applied to studies of copper(II) speciation. In the majority of the works performed, Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) was also used, in parallel, for results comparison. Cation copper(II) Ion Selective Electrode Potentiometry (ISEP) and Differential Pulse Polarography (DPP) were also used, in some cases, pursuing the acquirement of some complementary informations.

In general terms, it was verified that PSA has potentialities either for electrochemical lability of complexes studies and for the determination of the respective conditional formation constants. In high salinity media, for example, in solutions rich in chloride anion, and/or in the presence of surfactant species that are adsorbed at the surface of the mercury electrode (working electrode used in this case), PSA revealed to be advantageous relatively to DPASV. PSA allowed the determination of copper in synthetic medium at a deposition potential of -0.3 V, less negative than the required by DPASV, -0.4 V. On the other hand, the presence of species adsorbable at the surface of the electrode (humic acids, HA, in this case) interfered in the characteristics of the analytical signal only at higher concentrations (HA > 0,1 mmol/L) than those at which it interfered in DPASV.

Concretely, PSA was applied to the following studies:

(i) Conditional formation constants of the copper(II) complexes with glycine (a system well studied whose ligand is not adsorbed at the surface of mercury electrode). The results obtained by PSA were practically coincident with those obtained by DPASV and those found in the literature. This study allowed to conclude that PSA can be applied to the determination of

complexation parameters of simple ligands in the absence of adsorption phenomena.

(ii) Differential equilibrium function (K_{def}) of the copper(II) complexes with commercial HA in the interval of molar ratios $[AH]_t/[Cu]_t$ between 131 and 38. For concentrations of HA between 23 and 100 µmol/L (expressed in terms of the complexation capacity determined by ISEP) the adsorption of HA at the surface of the electrode (experimentally verified occurrence) did not affect, notoriously, the results obtained by PSA but affected those obtained by DPASV. The values of log K_{def} between 9.8 for $\theta = 8 \times 10^{-3}$ and 8.4 for $\theta = 2 \times 10^{-2}$ (θ is the fraction of all sites occupied by the metal) were obtained.

(iii) Lability of copper(II) complexes with fulvic acids (FA), with pedogenic origin, in the interval of molar ratios $[AF]_t/[Cu]_t$ ranging from 89 to 1.6. The system was studied in 0.5 mol/L sodium perchlorate and synthetic seawater media. It were not observed interferences by adsorption phenomena at the surface of mercury electrode. The complexation parameters in situation of equilibrium, necessary to the interpretation of the results, were obtained by ISEP: complexation capacity of 1.8 mmol/g AF, constant in the interval 1-150 mg AF/L, and conditional formation constants, log $K_1' = 5.77 \pm 0.09$ and log $K_2' = 4.2 \pm 0.1$ (P = 0.05), at pH=6.5 and t=20 °C and 100 mg/L FA concentration. It was verified that the lability of the complexes increased with the decrease of the ratio $[AF]_t/[Cu]_t$ between 89 (8 %) and 6 (64%) and for a lower ratio it was observed a slight decrease.

(iv) Speciation of copper in the marine microalgae Amphidinium carterae culture media and its influence in the toxicity of the metal. The bioavailability of copper was studied by the following chemical parameters: (a) electrochemical lability determined by PSA; (b) computational speciation, based on the values of the equilibrium constants for the chemical species expected on the synthetic seawater, used in the preparation of the culture media; (c) amount of metal fixed to the cells (measured by atomic absorption spectroscopy). The discussion of the results was based on culture growth in the presence of

copper(II) (biological parameter). It was verified that the toxic effect of the metal was not only due to the respective free concentration, having the dissociation of inorganic complexes, but not the complexes of EDTA, been implied.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abreviatura ou símbolo	**Designação completa**
A	Área do eléctrodo
α	Razão entre a concentração total e livre do metal ($[M]_t/[M]$)
AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
β_j	Constante de estabilidade estequiométrica global do complexo ML_j
β'_j	Constante condicional de estabilidade global do complexo ML_j
a_{X^n}	Actividade da espécie activa X^n
CC	Capacidade de complexação
COT	Carbono orgânico total
$[C_z]$	Concentração dos locais de coordenação do tipo z não complexados
$[C_z]_t$	Concentração total dos locais de coordenação do tipo z
$\bar{D}$	Coeficiente de difusão médio das espécies que contém o ião metálico
D_M	Coeficiente de difusão do ião metálico livre
$D_{M_{lig}}$	Coeficiente de difusão de complexos do ião metálico
E	Força electromotriz da célula electroquímica
$E_{1/2}$	Potencial de meia onda
EAA	Espectrofotometria de absorção atómica

Abreviatura ou símbolo	Designação completa
EAA-AE	Espectrofotometria de absorção atómica com atomização electrotérmica
EAA-C	Espectrofotometria de absorção atómica com atomização por chama
ECFM	Eléctrodo de carbono vítreo com filme de mercúrio
$^4EC_{50}$	Concentração total de cobre(II) necessária para reduzir o crescimento a 50% do observado no controlo ao fim de 4 dias
E_d	Potencial de deposição nas técnicas electroquímicas de redissolução anódica
EDTA	Ácido etilenodiamino-N,N,N´,N´-tetraacético
EGM	Eléctrodo gotejante de mercúrio
E^o_{ind}	Potencial normal do eléctrodo indicador
E_j	Potencial de junção líquida
EMGS	Eléctrodo de mercúrio de gota suspensa
E_p	Potencial do pico
$E_p{}^a$	Potencial do pico na ausência de ligando
$E_p{}^p$	Potencial do pico na presença de ligando
E_{ref}	Potencial do eléctrodo de referência
ΔE	Amplitude do impulso
ΔE_p	Desvio do potencial do pico
h	Horas
HEPES	Ácido N-2-hidroxietil piperazina-N´-etanosulfónico
i_c	Intensidade da corrente capacitiva
i_f	Intensidade da corrente farádica
i_p	Intensidade da corrente do pico
$i_p{}^a$	Intensidade da corrente do pico na ausência de ligando
$i_p{}^p$	Intensidade da corrente do pico na presença de ligando

Abreviatura ou símbolo	Designação completa
i_t	Intensidade da corrente total
Ka_m	Constante de protólise de $H_{m-(m-1)}L$
K_{fed}	Função de equilíbrio diferencial
K'_z	Constante condicional de estabilidade média de complexos MC_z
[L]	Concentração de ligando livre na solução
$[L]_t$	Concentração total de ligando na solução
$[^jL]_t$	Concentração total das posições de coordenação do tipo j
$[^jL]'$	Concentração das posições de coordenação do tipo j não complexadas
$[L]_t^o$	Concentração total de ligando à superfície do eléctrodo
[M]	Concentração de catião metálico livre (aquocomplexo) na solução
[M]	Concentração de metal lábil
$[M^jL]$	Concentração das posições de coordenação do tipo j ocupadas
$[M]_{lig}$	Concentração de metal sob a forma de complexos
$[M^o]^o$	Concentração de metal reduzido no eléctrodo de trabalho
$[M^n]^o$	Concentração de catião metálico de carga +n à superfície do eléctrodo de trabalho
$[M]_t$	Concentração total de metal na solução
$[M]_t^o$	Concentração total de metal à superfície do eléctrodo de trabalho
PCA	Polarografia com corrente alternada
pCu	log (1/[Cu])
PDI	Polarografia diferencial com impulsos

Abreviatura ou símbolo	Designação completa
PESC	Potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre(II)
PESI	Potenciometria com eléctrodos selectivos de iões
pH	log (1/[H^+])
PIPES	Ácido piperazina-N,N-bis(2-etano)sulfónico
PRA	Potenciometria de redissolução anódica
r	Raio da gota de mercúrio
τ	Tempo de reoxidação do metal em potenciometria de redissolução anódica
θ	Grau de ocupação dos locais de fixação pelo ião metálico
t_d	Intervalo de tempo da electrólise
v	Velocidade de agitação
VRA	Voltametria de redissolução anódica
VRADI	Voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos
y_{X^n}	Factor de actividade da espécie activa X^n

PARTE 1

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

1.1.1 APRESENTAÇÃO DO TEMA
1.1.2 OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

1.1.1 APRESENTAÇÃO DO TEMA

Durante muito tempo, os recursos naturais existentes no planeta eram considerados inesgotáveis. O principal objectivo do Homem consistia em encontrar processos eficientes e rentáveis de prospecção e isolamento desses recursos. Com o advento da Revolução Industrial e, particularmente nos últimos quarenta a cinquenta anos, a actividade industrial tornou-se uma força poderosa, arrastando atrás de si alterações e desiquilíbrios profundos do meio ambiente. Com o desenvolvimento da moderna tecnologia, o consumo de metais e semi-metais aumentou rapidamente. Por consequência, o lançamento destas substâncias no meio ambiente aumentou bastante correspondendo, actualmente, a um problema ambiental preocupante.

Os metais desempenham um papel muito importante no meio ambiente, podendo apresentar um papel positivo ou negativo nos processos metabólicos dos seres vivos. O potássio e o magnésio são os principais iões intracelulares, mas o sódio, o cálcio, alguns metais de transição e o zinco, são também metais essenciais ao desenvolvimento dos organismos a níveis de concentrações relativamente baixos, por vezes vestigiais ou mesmo ultra-vestigiais[1]. Estes catiões desempenham, nos seres vivos, uma multiplicidade de funções, que em termos genéricos, se podem agrupar em funções

estruturais e enzimáticas (como activadores ou como centros de catálise de importantes processos bioquímicos)[1]. Porém, muitos metais, mesmo sendo essenciais, apresentam efeitos tóxicos para os seres vivos em concentrações relativamente elevadas.

Um estudo recente[2] mostrou que a toxicidade global anual dos metais mobilizados pela actividade antropogénica excede a toxicidade resultante dos desperdícios orgânicos e radioactivos. Portanto, a poluição por metais constitui, actualmente, uma ameaça para o meio ambiente, podendo o provimento de água própria para consumos doméstico, agrícola e industrial tornar-se um factor limitante no crescimento populacional e industrial de muitos países no final deste século. A reciclagem e purificação da água assumirá então uma enorme importância. Neste contexto, torna-se importante um conhecimento mais detalhado da composição da água, mesmo em determinações de rotina.

Cobre no meio ambiente

O cobre foi o metal sobre o qual incidiu o trabalho desta Tese. Trata-se de um metal que se encontra largamente distribuído na natureza, especialmente sob a forma de depósitos de sulfuretos, cloretos e carbonatos[3].

O consumo elevado de compostos de cobre na indústria, agricultura e em usos domésticos faz com que o cobre seja um dos poluentes mais comuns[3,4].

O cobre é um metal de transição que pode ocorrer em três estados de oxidação (0,+1 e +2). Por ser um ácido de Lewis intermédio, o cobre forma complexos estáveis com ligandos orgânicos contendo oxigénio, azoto ou enxofre como átomos doadores de electrões. Nas águas naturais, o cobre encontra-se ligado preferencialmente a ligandos orgânicos, porque estes originam espécies mais estáveis e solúveis do que os ligandos inorgânicos. Exemplos de ligandos orgânicos relevantes são as substâncias húmicas, ácidos orgânicos, polipeptídos e polissacáridos. Mas o cobre forma também complexos com vários

ligandos inorgânicos: hidróxidos, cloretos, carbonatos, sulfatos e fosfatos. Nos ambientes marinhos, o cobre encontra-se sob várias formas orgânicas e inorgânicas (livre ou complexado). Uma análise dos resultados descritos na literatura mostra que a fracção de cobre ligado a compostos orgânicos varia entre 3 e 99,9 % do cobre total dissolvido[3]. O cobre forma também muitos complexos inorgânicos, nomeadamente com cloretos, sulfatos e carbonatos devido às elevadas concentrações destes ligandos presentes na água do mar[3].

Em sedimentos, são frequentes os compostos inorgânicos de cobre seguintes: hidróxido de cobre(II), óxido de cobre(II), malaquite e azurite.

O cobre é um elemento essencial para os organismos vivos, apresentando um papel essencial em muitas enzimas[1,5,6]. É, porém, tóxico para diversos tipos de microrganismos a níveis de concentração relativamente elevados, sendo por isso dada grande importância em estudos de interface ambiente/microbiologia.

Coordenação dos metais vs. toxicidade [7,8]

A poluição por metais introduz quantidades elevadas de ácidos de Lewis nos ecossistemas. Os efeitos biológicos desta poluição estão dependentes da especiação química, a qual, por sua vez, depende de vários parâmetros, entre os quais da quantidade de bases de Lewis presentes no ambiente. A presença de uma enorme variedade de ligandos orgânicos e inorgânicos no meio ambiente susceptíveis de coordenarem os vários metais pode condicionar o efeito tóxico desses metais (ver adiante Especiação).

Os metais e os ligandos podem ser classificados em duas categorias, duros e macios, de acordo com a estabilidade dos complexos formados entre eles.

Os catiões de elementos, como sejam, os metais alcalinos, alcalino-terrosos e alumínio, apresentam uma configuração electrónica de gás nobre e fraca polarização, formando ligações com carácter

predominantemente iónico. Estes catiões, também designados de ácidos duros ou catiões do tipo A, interagem fracamente com os ligandos, apresentando, no entanto, preferência por aqueles que contém átomos duros (oxigénio e fluoreto) como coordenadores.

Por outro lado, os catiões de metais de transição têm em muitos casos nuvens electrónicas com dimensões relativamente grandes e que são facilmente polarizáveis por acção do campo eléctrico criado pelos electrões do átomo doador do ligando. Portanto, estes catiões, também designados de ácidos macios ou do tipo B, tendem a formar ligações covalentes com bases macias. Estes catiões coordenam preferencialmente com bases contendo, por exemplo, iodo ou enxofre como átomos coordenadores.

Na biota, as bases de Lewis incluem ligandos contendo oxigénio (por exemplo, hidróxido), azoto (por exemplo, aminas e grupos imidazólicos), enxofre (por exemplo, sulfidrilo) como átomos doadores de electrões. Estes átomos encontram-se, habitualmente, coordenados a metais essenciais, como o magnésio, manganês, ferro, cobalto e zinco.

Os efeitos tóxicos dos metais resultam, em geral, duma coordenação forte a constituintes das células e dos tecidos. Estes efeitos podem ser exercidos de várias formas, nomeadamente, remoção e/ou substituição dos metais essenciais do seu local habitual de coordenação; ligação a proteínas e ácidos nucleícos provocando alterações da sua conformação e alteração da integridade das membranas celulares[9].

Especiação: porquê e como?

Nas águas naturais, os metais encontram-se distribuídos em várias formas químicas as quais, por sua vez, se distribuem entre as formas dissolvida, coloidal e particulada[10-12]. O estudo da distribuição de um dado elemento pelas várias formas físico-químicas, cujo somatório corresponde à concentração total do elemento presente na amostra designa-se de especiação química[4,11].

Actualmente, é unanimemente aceite de que a informação obtida através da determinação da concentração total de um dado elemento é insuficiente do ponto de vista ambiental, por não traduzir a biodisponibilidade desse elemento[4,11,12-14]. Certos metais, como por exemplo o cobre, o cádmio e o alumínio, apresentam frequentemente maior toxicidade para certos organismos na forma livre do que na forma complexada[13,15-19]. Por outro lado, os compostos organometálicos são, frequentemente, mais tóxicos do que as formas inorgânicas dos elementos correspondentes por serem lipossolúveis e, consequentemente, acumuláveis nos tecidos gordos[13,20]. O chumbo, o estanho e o mercúrio obedecem a esta regra, enquanto que o arsénio é excepção[20].

A relação entre especiação química e toxicidade estão longe de ser bem conhecidas. Os estudos interdisciplinares envolvendo a Química e a Biologia (ou a Medicina) revestem-se de uma enorme importância na medida em que permitem aprofundar os conhecimentos nesta área. No entanto, a especiação completa de metais num dado meio é difícil e constitui ainda um tema de investigação em aberto, em grande parte devido a limitações das técnicas analíticas actualmente existentes.

No entanto, nos últimos anos tem-se procurado desenvolver técnicas analíticas fiáveis e sensíveis que permitam conhecer a composição química do sistema em estudo. Embora uma grande variedade de técnicas analíticas tenha vindo a ser utilizada em estudos de especiação, em geral elas apenas permitem correlacionar a resposta analítica com um grupo específico de formas físico-químicas[11]. Apenas em alguns casos muito particulares de compostos é possível identificar e quantificar as várias formas químicas do elemento na amostra.

As várias técnicas físico-químicas usadas em estudos de especiação podem ser classificadas em separações físicas, transformações químicas, técnicas espectroscópicas e técnicas de superfície[11]. As primeiras englobam a filtração, a ultrafiltração, a centrifugação, equilíbrios de diálise e a cromatografia de filtração em gel. Estas técnicas baseiam-se na separação por tamanhos das partículas ou espécies moleculares presentes. No entanto, estas técnicas não têm

especificidade química directa, não podendo, por si só, correlacionar-se com a disponibilidade biológica; têm, no entanto, interesse quando combinadas com outras técnicas em protocolos de especiação[11,21].

O grupo de técnicas em que se verificam transformações químicas e, consequentemente, introdução de uma perturbação no sistema em estudo, engloba um conjunto heterogéneo de processos químicos com especificidade variável. Merecem destaque os métodos de extracção sequencial, aplicados na especiação de sedimentos, e os métodos de derivatização, usados para converter as espécies químicas a medir noutras formas facilmente determináveis com os meios disponíveis[11,22,23].

Técnicas espectroscópicas, como por exemplo, a espectroscopia de fluorescência e a espectrofotometria atómica têm também sido usadas em estudos de especiação. A primeira pode ser usada isoladamente com o objectivo, por exemplo, de determinar parâmetros de complexação de certos metais com matéria orgânica natural[24,25], enquanto que as técnicas de espectrofotometria atómica têm sido usadas acopladas a técnicas de separação prévias[26-28].

As técnicas de superfície englobam um outro vasto grupo de técnicas, cujo resultado analítico depende do contacto entre a amostra e uma superfície sólida especifica e selectiva. Esta classe engloba as técnicas electroquímicas e cromatográficas.

As técnicas cromatográficas, designadamente a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência, acopladas a uma variedade de técnicas de detecção (espectroscopia molecular, atómica e espectrometria de massa) têm-se mostrado extremamente poderosas na especiação de determinados metais, semi-metais e compostos organometálicos e permitiu um progresso importante, na última década, na especiação de organometálicos[27,28].

A electroanálise tem sido largamente aplicada a estudos de especiação[29-42]. A voltametria de redissolução anódica (VRA) é a técnica de redissolução mais antiga e apresenta grande vantagem sobre as técnicas polarográficas pois é muito mais sensível (no capítulo 2.1. é

feita uma descrição dos fundamentos teóricos desta técnica). Além disso, actualmente são comercializados aparelhos a baixo custo que permitem a aplicação de vários tipos de aquisição do sinal[43]. Os vários modos de VRA são, por isso, adequados a estudos de especiação não só devido aos baixos limites de detecção apresentados mas também por serem sensíveis às formas químicas em que o metal se pode apresentar[44]. A adsorção de compostos orgânicos surfactantes no eléctrodo de mercúrio constitui um dos principais inconvenientes da técnica.

A voltametria de redissolução catódica corresponde a uma outra versão das técnicas de redissolução que tem também sido usada em estudos de especiação[34,45,46].

A potenciometria de redissolução anódica que será amplamente utilizada neste trabalho, assemelha-se em vários aspectos à VRA conforme se discutirá adiante no capítulo 2.1. Esta técnica é menos afectada pelos fenómenos de adsorção de compostos orgânicos surfactantes e pelos compostos electroactivos diferentes do analito que, por vezes estão presentes nas amostras[47]. Porém, tanto quanto se sabe, não foi até agora muito utilizada em estudos de especiação.

Boas prática laboratoriais [4, 48]

Os estudos de especiação em amostras naturais, têm de ser, em geral, realizados ao nível das concentrações vestigiais e ultravestigiais. A execução de trabalho experimental a estes níveis exige cuidados especiais em todos os passos do processo analítico, desde a amostragem e conservação das amostras até à detecção.

O problema das contaminações constitui uma das grandes dificuldades nas determinações a níveis vestigiais e ultravestigiais. O tipo e a extensão da contaminação depende da quantidade de determinando presente na amostra, da metodologia adoptada e da ubiquidade do determinando nas fontes potenciais de contaminação. Constituem medidas importantes tendentes a minimizar as contaminações, as seguintes: manutenção de laboratórios

escrupulosamente limpos, utilização de vários brancos em todos os lotes de análises, descontaminação de todo o material a ser usado, utilização de reagentes de pureza elevada, redução ao mínimo estritamente necessário do número de reagentes e das etapas de manuseamento.

A implementação de controlo de qualidade deve também fazer parte integrante do programa analítico. Constituem medidas de controlo de qualidade importantes e que por isso devem fazer parte do quotidiano de um laboratório de vestígios, as seguintes: (i) acompanhar as determinações do analito de análises de vários tipos de brancos (brancos laboratoriais, brancos instrumentais, brancos de calibração); (ii) replicação das determinações; (iii) utilização de amostras dopadas (adição de padrão); (iv) e a execução de programas de calibração intra e inter-laboratorial.

No caso do estudo envolver trabalho de campo, um outro aspecto importante diz respeito à impossibilidade prática de, na maior parte das situações, analisar as amostras "*in situ*". Este facto acarreta deterioração da amostra já que não existe nenhum protocolo de armazenagem suficientemente eficaz que preserve a integridade da amostra. O mesmo acontece com a preservação das amostras sintéticas. Efectivamente, a precipitação dos metais e sua adsorção aos recipientes que contêm as amostras são factores importantes que contribuem para a perda de metais em amostras que não podem ser acidificadas, como em geral acontece quando se pretende realizar especiação química. A adsorção aos recipientes que pode ser minimizada recobrindo interiormente o material de vidro com uma camada de quartzo, ou melhor, mas muito mais dispendioso, utilizando material de quartzo.

1.1.2 OBJECTIVOS E ORGANIZAÇÃO GERAL DA TESE

O principal objectivo desta dissertação foi a avaliação das capacidades da potenciometria de redissolução anódica,PRA, para estudos de especiação de metais em águas, com vista à sua aplicação a estudos com interesse ambiental. O metal seleccionado foi o cobre, por

estarem em curso projectos que visam estudar a influência da especiação de cobre na respectiva toxicidade para microrganismos. Como até agora a PRA foi basicamente aplicada apenas à determinação de concentrações totais de metais pesados, considerou-se importante comparar/complementar os resultados de especiação obtidos por esta com os fornecidos por outras técnicas electroquímicas (potenciometria com eléctrodos selectivos de iões, voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos e polarografia diferencial com impulsos) e espectrofotometria de absorção atómica.

A dissertação está estruturada do modo seguinte. Na primeira parte, constituída por um só capítulo (que inclui a presente secção) faz-se uma introdução geral ao tema tratado, focando a importância ambiental de se conhecer as formas e respectivas concentrações em que os metais pesados se encontram e referindo as metodologias que têm sido usadas para esse fim.

A segunda parte é constituída por três capítulos. No capítulo 2.1 referem-se, resumidamente, os aspectos teóricos inerentes a cada uma das técnicas utilizadas, considerados relevantes para o trabalho. No capítulo 2.2 descrevem-se os reagentes, materiais e procedimentos experimentais gerais e no capítulo 2.3 os métodos de cálculo utilizados.

Na terceira parte apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos nos diversos estudos realizados que foram, designadamente, os seguintes: estudo da labilidade de complexos de cobre(II) com AF por PESC e PRA (capítulo 3.1); avaliação das técnicas de redissolução anódica para especiação de cobre a potenciais de deposição relativamente elevados (capítulo 3.2); aplicação da PRA à determinação de constantes de formação condicionais de complexos de cobre com ligandos que não são adsorvidos à superfície do eléctrodo (capítulo 3.3); aplicação da PRA à determinação de constantes de formação condicionais de complexos de cobre com ligandos que são adsorvidos à superfície do eléctrodo (capítulo 3.4); e especiação de cobre em meios de cultura da microalga marinha *Amphidinium carterae* e sua influência na toxicidade do metal (capítulo 3.5).

As conclusões finais são o objecto da quarta e última parte da dissertação.

A bibliografia está organizada por capítulos e referida no fim de cada um deles.

REFERÊNCIAS:

1- M.N. Hughes e R.K. Poole, "Metals and micro-organisms", Chapman and Hall Ltd, London, 1989, cap 1.

2- J.O. Ngriagu e J.M. Pacyna, *Nature*, **333**, 134 (1988).

3- M. Sadiq, "Toxic metal chemistry in marine sediments", Marcel Dekker, New York, 1992, cap. 7.

4- T.M. Florence e G.E. Batley, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **9**, 219 (1980).

5- C.A. Flemming e J.F. Trevors, *Water Air Soil Poll.*, **44**, 143 (1989).

6- J.J. Fraústo da Silva e R.J. Williams, "The biological chemistry of the elements", Clarendon, Oxford, 1993, cap. 15.

7- J.J. Morgan e W. Stumm, *em* "Metal and their compounds in the environment", E. Merian, Ed., VCH, New York, 1991, pp. 67.

8- B. Raspor, *em* "Metal and their compounds in the environment", E. Merian, Ed., VCH, New York, 1991, pp. 233.

9- G.M. Gadd, *FEMS Microb. Lett.*, **100**, 197 (1992).

10- G.M.P. Morrison, G.E. Batley e T.M. Florence, *Chem. Brit.*, **25**, 791 (1989).

11- D.R. Turner, *em* "Metal ions in biological systems", vol. 18, H. Siegel, Ed., Marcel Dekker, New York, 1984, cap. 5.

12- G.M.P. Morrison, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 2.

13- W. Lund, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **337**, 557 (1990).

14- T.M. Florence, G.M. Morrison e J.L. Stauber, *Sci. Total Environ.*, **125**, 1 (1992).

15- W.G. Sunda e R.R.L. Guillard, *J. Mar. Res.*, **34**, 511 (1976).

16- W.G. Sunda e J.A.M. Lewis, *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 870 (1978).

17- W.G. Sunda e P.A. Gillespie, *J. Mar. Res.*, **37**, 761 (1979).

18- N.G. Zorkin, E.V. Grill e E.G. Lewis, *Anal. Chim. Acta*, **183**, 163 (1983).

19- W. Verweij, R. Glazewski e H. De Haan, *Chem. Speciation Bioavailability*, **4**, 43 (1992).

20- P.J. Craig, "Organometallic compounds in the environment. Principles and reactions", Longman, Harlow, 1986, cap. 1.

21- G.E. Batley, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 3.

22- U. Förstner, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **51**, 5 (1993).

23- M. Kersten e U. Förstner, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 8.

24- G.G. Guilbault, *em* "Compreensive analytical chemistry", vol. 8, G. Svehla, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1977, cap. 2.

25- A.A.S.C. Machado, J.C.G. Esteves da Silva e J.A.C. Maia, *Anal. Chim. Acta*, **292**, 121 (1994).

26- J.C. van Loon e R.R. Barefoot, *Analyst*, **117**, 563 (1992).

27- Y.K. Chau, *Analyst*, **117**, 571 (1992).

28- O.F.X. Donard e F.M. Martin, *Trac.Trend. Anal. Chem.*, **11**, 17 (1992).

29- B. Raspor, P. Valenta, H. Nürenberg e M. Branica, *Sci. Total Environ.*, **9**, 87 (1977).

30- M.L.S. Gonçalves, L. Sigg e W. Stumm, *Environ Sci Technol.* **19**, 141 (1985).

31- M.L.S. Simões Gonçalves e A.C. Lopes da Conceição, *Sci. Total Environ.*, **103**, 185 (1991).

32- C.M.S. Botelho, R.A.R. Boaventura e M.L.S.S. Gonçalves, *Sci. Total Environ.*, **149**, 69 (1994).

33- H.B. Xue e L. Sigg, *Water Res.*, **24**, 1129 (1990).

34- H.B. Xue e L. Sigg, *Limnol. Oceanogr.*, **38**, 1200 (1993).

35- H.B. Xue e L. Sigg, *Anal. Chim. Acta*, **284**, 505 (1994).

36- G.M.P. Morrison e T. M. Florence, *Electroanal.*, **1**, 485 (1989).

37- C.M.G. van den Berg, *Anal. Chim. Acta*, **250**, 265 (1991).

38- M. Esteban e J. M. Díaz-Cruz, *Anal. Chim. Acta*, **281**, 271 (1993).

39- M. Esteban, C. Ariño, I. Ruisánchez, M.S. Larrechi e F. X. Rius, *Anal. Chim. Acta*, **285**, 193 (1994).

40- J.S. Feinberg e W.J. Bowyer, *Microchem. J.*, **47**, 72 (1993).

41- K. Wikiel, M.M. dos Santos e J. Osteryoung, *Electrochim. Acta*, **38**, 1555 (1993).

42- M.L. Tercier e J. Buffle, *Electroanal.*, **5**, 187 (1993).

43- M.Esteban e E. Casassas, *Trac. Trend. Anal. Chem.*, **13**, 110 (1994).

44- R.M. Town, M.L. Tercier, N. Parthasarathy, F. Bujard, S. Rodak, C. Bernard e J. Buffle, *Anal. Chim. Acta*, **302**, 1 (1995).

45- J.J. Hernández-Brito, J. Pérez-Peña, M.D. Gelado-Caballero e C. Collado-Sánchez, *Anal. Chim. Acta*, **284**, 405 (1993).

46- M.L.A.M. Campos e C.M.C. van den Berg, *Anal. Chim. Acta*, **284**, 481 (1994).

47- D. Jagner, *Analyst*, **107**, 593 (1982).

48- A.G. Howard e P.J. Statham, "Inorganic trace analysis, philosophy and practice", Wiley, New York, 1993, cap. 2.

PARTE 2

METODOLOGIA

CAPÍTULO 2.1

Técnicas Analíticas

2.1.1 POTENCIOMETRIA COM ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE IÕES

2.1.2 POLAROGRAFIA DIFERENCIAL COM IMPULSOS

2.1.3 TÉCNICAS DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA: VRADI E PRA

2.1.4 POLAROGRAFIA COM CORRENTE ALTERNADA

2.1.5 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

2.1.6 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL

Neste capítulo, descrevem-se de uma forma muito sumária os fundamentos das técnicas que foram usadas no trabalho experimental.

2.1.1 POTENCIOMETRIA COM ELÉCTRODOS SELECTIVOS DE IÕES (PESI)[1-3]

A potenciometria permite obter informações acerca da composição da solução através da medição das diferenças de potencial entre o eléctrodo indicador, selectivo a um número muito limitado de espécies da solução e idealmente apenas a uma, e o eléctrodo de referência, a corrente praticamente nula.

A força electromotriz da célula electroquímica que contém os dois eléctrodos referidos está relacionada com a(s) actividade(s) da(s) espécie(s) activa(s) através da equação de Nernst:

$$E = \underbrace{E^{o}_{ind} - E_{ref} + E_j}_{\text{constante}} + s \log a_{x^n} \qquad [1]$$

em que E é a força electromotriz da célula, E^{o}_{ind} o potencial normal do eléctrodo indicador, E_{ref} é o potencial do eléctrodo de referência, E_j é o potencial de junção líquida, s é igual ou próximo de (RT ln10/nF) quando o eléctrodo indicador apresenta comportamento próximo do teórico e $a_x{}^n$ é a actividade da espécie activa x^n; R,T e F têm o significado habitual e n é a carga eléctrica de x, incluindo o sinal. Na prática, é muitas vezes impossível conhecer, de forma independente, a actividade de uma espécie existente em solução. Daí que, os estudos de equilíbrio químico sejam normalmente efectuados a força iónica constante. Nestas condições e uma vez que a actividade da espécie activa está relacionada com a respectiva concentração através do factor de actividade (y_x) ($a_x = y_x \cdot c_x$) e o factor de actividade pode considerar-se praticamente constante se a força iónica for constante [$y_x = f(I)^4$], a equação [1] transforma-se na seguinte:

$$E = \underbrace{E^{o}_{ind} - E_{ref} + E_j + s \log y_x{}^n}_{\text{constante}} + s \log c_x{}^n \qquad [2]$$

A quantificação da concentração da espécie activa nas soluções problema em potenciometria directa é obtida por intermédio do traçado da curva de calibração efectuada no mesmo intervalo de concentrações da espécie activa, após se verificar que não existem interferentes.

Os elevados limites de detecção da técnica (em geral pertencentes ao intervalo 10^{-5} a 10^{-7} mol/L) e o facto de não existirem eléctrodos selectivos de iões de numerosos metais pesados constituem as principais limitações da utilização dos eléctrodos selectivos de iões em estudos de especiação.

2.1.2 POLAROGRAFIA DIFERENCIAL COM IMPULSOS (PDI)[5-10]

Os métodos polarográficos com impulsos foram desenvolvidos tendo como objectivo a diminuição do limite de detecção,

relativamente à polarografia clássica, com base na eliminação da corrente capacitiva. No entanto, uma vez que estas técnicas e a polarografia clássica apresentam conceitos comuns impõe-se uma breve descrição desta última.

A polarografia clássica baseia-se na medição e interpretação de curvas de corrente *vs.* potencial (i *vs.* E) durante a electrólise de uma solução não agitada num eléctrodo gotejante de mercúrio (EGM). A variação contínua da corrente com a alteração do potencial pode ser medida instrumentalmente e dá origem a um polarograma clássico (Figura 2.1.1.A). Os limites de detecção são, em geral, da ordem de 10^{-5} mol/L[9]. Estes valores são bastante elevados devido à existência de uma

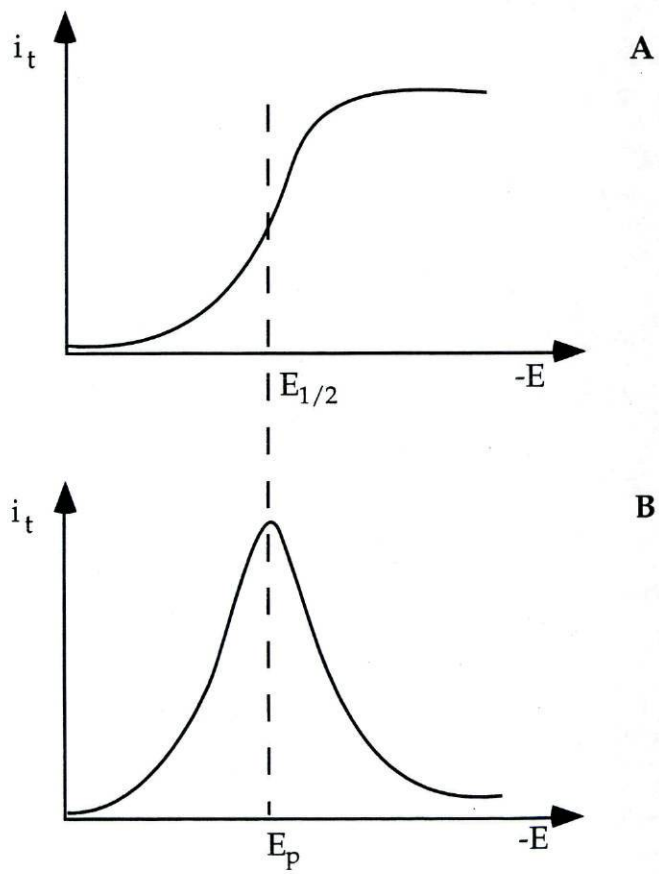


Figura 2.1.1. Polarogramas obtidos por polarografia clássica (**A**) e por polarografia diferencial com impulsos (**B**). Adaptado da referência[11].

corrente capacitiva (i_c) apreciável que mascara a corrente farádica (i_f), devida à espécie electroactiva e resultante da transferência de carga no eléctrodo. A corrente total (i_t) medida é a soma algébrica de ambas ($i_t = i_c + i_f$)[8]. Uma vez que apenas a i_f é proporcional à concentração da substância electroactiva presente em solução, o aumento da sensibilidade da técnica depende de se conseguir minimizar i_c de modo que $i_t \cong i_f$. Esta situação ($i_c << i_f$) é conseguida à custa da medição da intensidade da corrente durante um intervalo de tempo muito curto na fase final do tempo de vida da gota (polarografia por amostragem) ou ainda de uma forma mais eficaz, através da aplicação de impulsos e medição de i_t na fase final do impulso, quando i_c é praticamente desprezável.

A PDI consiste na polarização do eléctrodo, não só pela rampa de potencial contínuo, descrita para a polarografia clássica, mas também pela sobreposição à rampa de potencial, de impulsos sincronizados de forma a serem aplicados na fase final do tempo de vida da gota de mercúrio. Os impulsos aplicados têm uma duração de cerca de 60 ms e uma amplitude de potencial constante durante o polarograma, que pode variar entre 10 a 100 mV. A corrente medida resulta da diferença das intensidades de correntes medidas na fase final do impulso (por exemplo durante os últimos 15 ms) e num dado instante (por exemplo 15 ms) antes do início do impulso (Figura 2.1.2.). Neste caso, a curva de i *vs*. E tem a forma de um pico, em resultado de se registar uma diferença de valores de corrente por impulso (Figura 2.1.1.B). A intensidade da corrente de pico (i_p), para processos reversíveis e controlados por difusão, é dada pela equação seguinte[10]:

$$i_p = \{(n^2 F^2 A [M]')/(4RT)\} (D_M/\pi t)^{1/2} \Delta E \qquad [3]$$

em que ΔE representa a amplitude do impulso, D_M é o coeficiente de difusão da espécie que se reduz, A é a área do eléctrodo, [M]' é a concentração da espécie electroactiva na solução e t o intervalo de tempo em que a corrente é medida. R,T, n e F têm o significado habitual. A equação [3] é válida para pequenos valores de amplitude do

impulso[10]; para valores elevados de amplitude do impulso, a relação i_p *vs* ΔE desvia-se da linearidade.

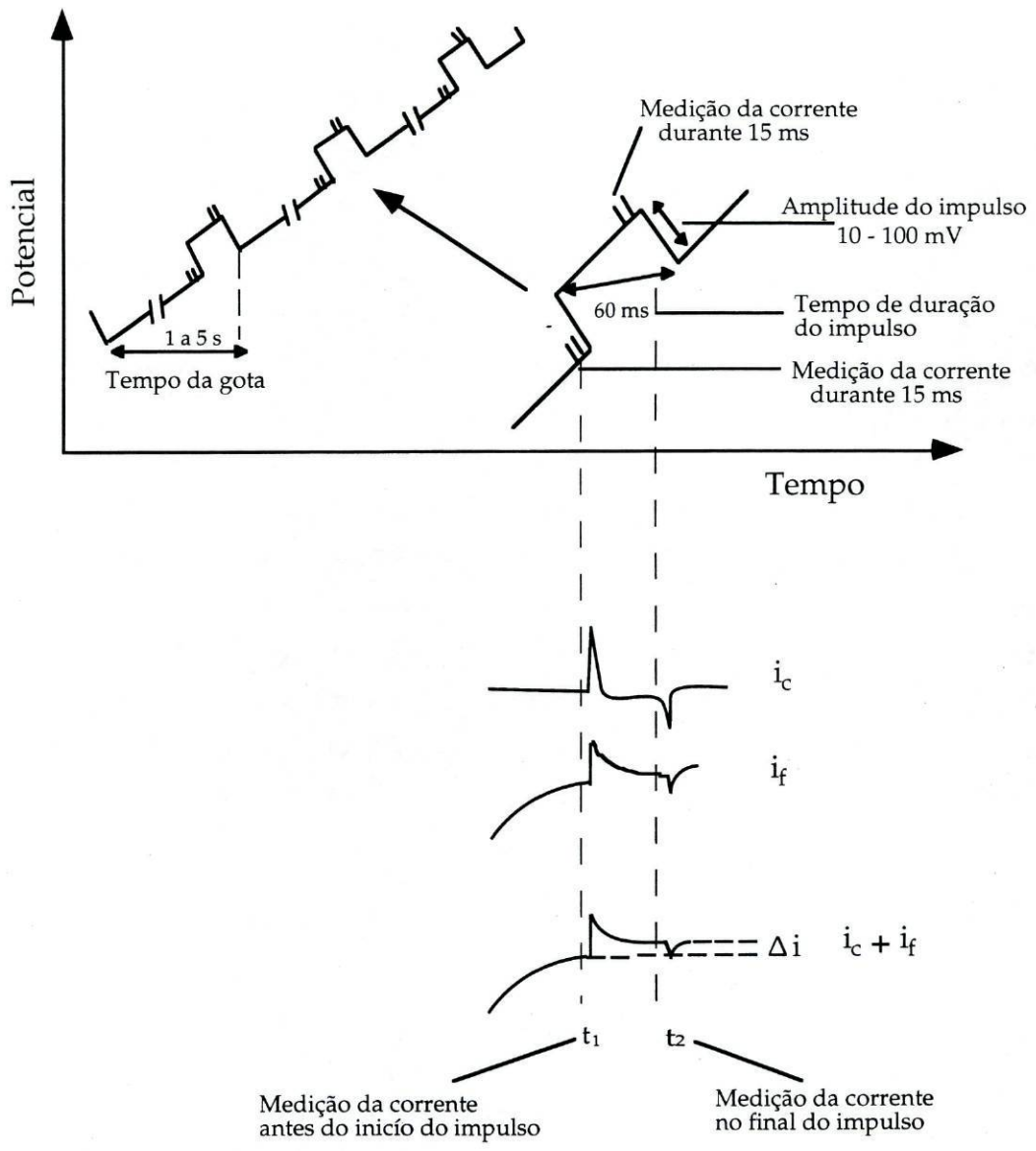


Figura 2.1.2. Procedimento da medição da corrente em PDI. Adaptado das referências[9,10].

O potencial do pico (E_p) relaciona-se com o potencial de meia onda ($E_{1/2}$) obtido na polarografia clássica através da relação seguinte[10]:

$$E_p = E_{1/2} - \Delta E/2 \qquad [4]$$

A equação [4] evidência que para impulsos muito pequenos, o E_p coincide com o $E_{1/2}$ e desloca-se para valores mais positivos à medida que aumenta a amplitude do impulso.

Os valores de i_p e de E_p fornecem informações quantitativas da concentração da espécie em solução e qualitativas da identidade do ião metálico, respectivamente.

A eficácia da eliminação da corrente capacitiva em PDI deve-se, por um lado, à aplicação do impulso na fase final do tempo de vida da gota (quando i_c resultante do crescimento da gota é desprezável porque o aumento da superfície do eléctrodo por unidade de tempo é muito pequeno) e, por outro lado, à medição da intensidade da corrente na fase final do impulso quando i_c é quase nula (i_f e i_c aumentam rapidamente no momento da aplicação do impulso mas posteriormente, durante o impulso a i_c decai exponencialmente com o tempo ao passo que a diminuição de i_f é proporcional à raiz quadrada do tempo[8]). Deste modo, i_t medida é aproximadamente igual a i_f, uma vez que os valores de i_c medidos nos pontos de amostragem (antes da aplicação e na fase final do impulso) (ver Figura 2.1.2) são sensivelmente iguais.

Os limites de detecção típicos em PDI variam, normalmente, entre 10^{-7} e 10^{-8} mol/L[9].

2.1.3 TÉCNICAS DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA: VOLTAMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA DIFERENCIAL COM IMPULSOS (VRADI) E POTENCIOMETRIA DE REDISSOLUÇÃO ANÓDICA (PRA)[12-19]

As técnicas de redissolução anódica têm em comum uma fase de preconcentração electrolítica no eléctrodo de trabalho, do analito

presente na solução, distinguindo-se as diferentes técnicas no modo como é feita a redissolução do metal. Mais concretamente, por aplicação de um potencial de electrólise controlado, durante um período de tempo definido e sob condições reprodutíveis, o(s) ião (iões) metálico(s) a determinar são reduzido(s) à forma metálica e concentrado(s) no eléctrodo de trabalho. A preconcentração faz com que as técnicas de redissolução sejam muito mais sensíveis do que as técnicas polarográficas, uma vez que a concentração de metal no eléctrodo de trabalho pode atingir valores 100 a 1000 vezes superiores à respectiva concentração em solução. O eléctrodo de trabalho pode ser de mercúrio [eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (EMGS) ou eléctrodo de carbono com filme de mercúrio (ECFM)], formando os metais reduzidos uma amálgama [($M^n + ne^- \rightarrow M(Hg)$], ou eléctrodos sólidos. Neste caso, os metais reduzidos formam um filme metálico à superfície do eléctrodo ($M^n + ne^- \rightarrow M$).

Nas técnicas voltamétricas, os metais em estudo são reoxidados através da aplicação de potenciais crescentes (varrimento linear ou não), produzindo-se uma corrente de pico quando o sistema atinge o potencial de oxidação de cada metal (Figura 2.1.3.). No caso da VRADI (técnica usada neste trabalho), o varrimento do potencial é feito de uma forma análoga ao utilizado em PDI, mas no sentido de potenciais crescentes. Este tipo de varrimento faz com que os limites de detecção da técnica sejam ainda menores do que nas técnicas com varrimento linear, devido à diminuição de i_c. Além disso, no intervalo de tempo entre os impulsos e enquanto o potencial for suficientemente negativo para reduzir o metal, parte do metal é novamente reduzido, o que contribui para aumentar a sensibilidade.

Os valores de i_p e E_p para a VRADI com EGMS podem ser obtidos através das equações [5] e [6], respectivamente[18]:

$$i_p = K\, n^2\, r\, \Delta E\, v^{1/2}\, t_d\, [M]' \qquad [5]$$

$$E_p = E_{1/2} - 1{,}1\,(RT/nF) - \Delta E/2 \qquad [6]$$

em que r representa o raio da gota de mercúrio, v a velocidade de agitação, t_d o intervalo de tempo em que se dá a deposição e K é uma

constante. Pelos motivos anteriormente apresentados (ver secção 2.1.2), a equação [5] só é válida para pequenos valores de amplitude do impulso.

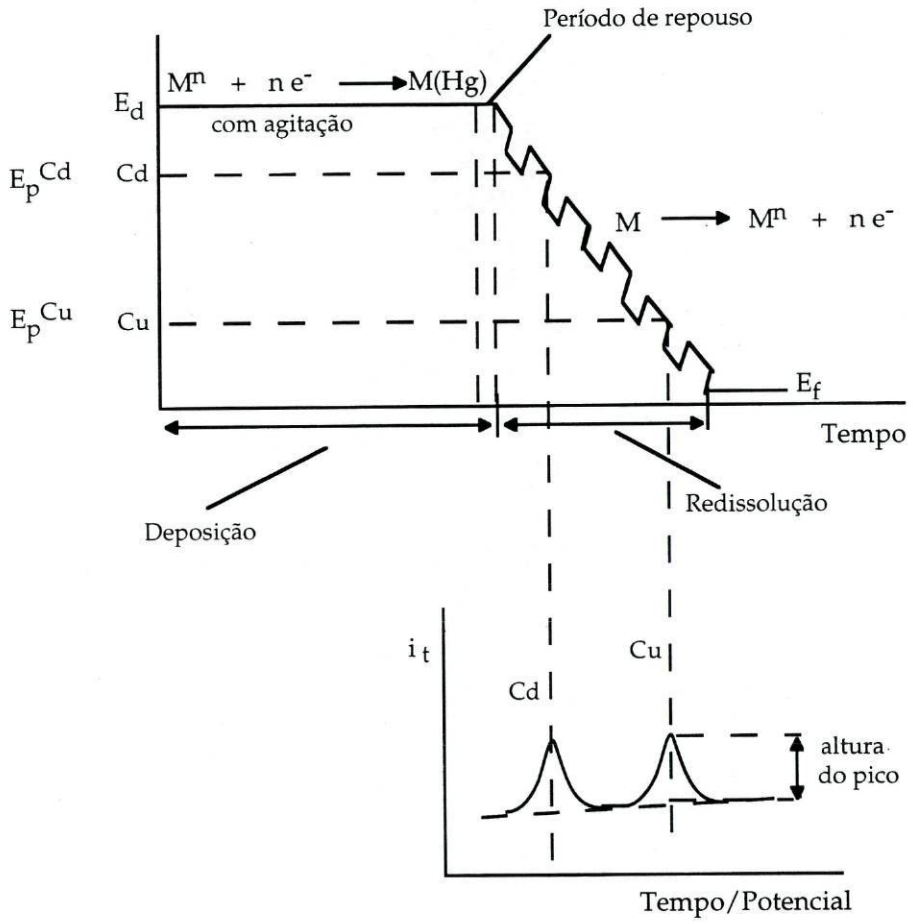


Figura 2.1.3. Procedimento da medição da corrente e do potencial do pico em VRADI. Adaptado das referências[8,18].

Na potenciometria de redissolução anódica, após a fase de preconcentração, o potenciostato é desligado, não havendo passagem de corrente na célula electroquímica. Os metais amalgamados são reoxidados por acção de um agente químico oxidante, como por exemplo, o mercúrio(II). Durante a redissolução, a variação do potencial do eléctrodo de trabalho é monitorizada em função do tempo

(E *vs.* t), obtendo-se um registo do tipo do apresentado na Figura 2.1.4.A. A partir destes resultados é possível calcular a primeira derivada do potenciograma (Figura 2.1.4B) que corresponde a uma curva em forma de pico semelhante aos voltamogramas.

À semelhança do que acontece com a VRADI, a PRA fornece informações quantitativas e qualitativas sobre o(s) metal (metais) através da medição do tempo necessário para a reoxidação do metal, τ, e do potencial de reoxidação baseado na equação de Nernst. Para uma dada concentração de oxidante e velocidade de agitação constante, τ é proporcional à concentração de metal presente em solução e ao intervalo de tempo usado na electrodeposição.

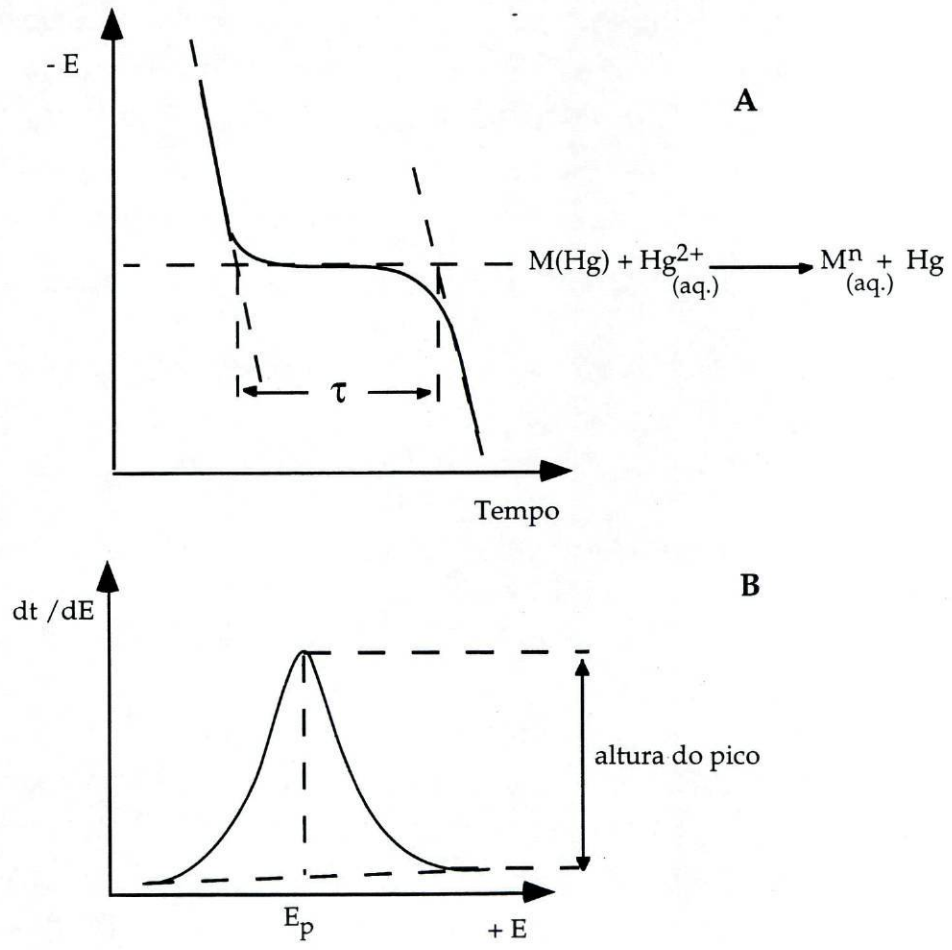


Figura 2.1.4. Potenciogramas típicos na forma directa (**A**) e na forma da primeira derivada (**B**). Adaptado da referência[26].

A sensibilidade das técnicas de redissolução anódica depende da quantidade de metal depositado no eléctrodo de trabalho, a qual é influenciada por vários parâmetros tais como, por exemplo, potencial do eléctrodo na fase de electrólise, tempo de deposição, condições hidrodinâmicas utilizadas, coeficiente de difusão da espécie que sofre redução e do processo de redissolução anódica utilizado, como já foi exemplificado acima. Os limites de detecção típicos em VRADI com EMGS são normalmente variáveis entre 10^{-9} e 10^{-11} mol/L[12,13], sendo muitas vezes limitados pela pureza dos reagentes. A utilização de um ECFM permite obter uma maior sensibilidade do que com o EMGS, como consequência da razão área/volume ser maior no ECFM[20,21]. Por consequência, os limites de detecção obtidos por VRA com varrimento linear e ECFM são comparáveis aos obtidos por VRADI com EMGS[12]. Adicionalmente, a utilização do ECFM, em VRADI, pode aumentar a sensibilidade e diminuir os limites de detecção em determinadas condições[22]. No caso da PRA, limites de detecção entre 10^{-9} e 10^{-12} mol/L têm sido descritos recentemente[23-25].

2.1.4 POLAROGRAFIA COM CORRENTE ALTERNADA (PCA)[5,27-30]

A PCA consiste na sobreposição de um potencial alternado, por exemplo sinusoidal, de frequência fixa e de pequena amplitude à rampa de potencial contínuo usada na polarografia clássica.

A corrente alternada resultante, cuja frequência é a mesma do potencial aplicado, é medida em função da variação do potencial contínuo. Esta corrente apresenta uma componente farádica, devido à ocorrência de reacções redox no eléctrodo, e outra capacitiva devida à dupla camada eléctrica existente na interface eléctrodo-solução, respectivamente. Genericamente, a interface eléctrodo-solução quando sujeita a um potencial alternado, pode ser comparada a um circuito electrónico constituído por uma resistência (i_f) e por um condensador (i_c). A aplicação de um potencial alternado ao circuito produz uma corrente que sofre uma perturbação devido à existência de uma resistência e de um condensador no circuito. A medição da corrente desfasada do potencial de 90° reflecte a perturbação devido ao

condensador (i_c) e em fase reflecte a perturbação devido à resistência (i_f).

2.1.5 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA (EAA)[31-35]

A EAA é um método de análise elementar baseado na absorção de radiações monocromáticas, na zona do visível ou do ultra-violeta, por átomos livres gasosos no estado fundamental de energia.

As determinações analíticas por EAA são, em geral, efectuadas em unidade de absorvância, normalmente na zona de resposta em que se verifica uma relação do tipo da que é dada pela lei de Lambert-Beer:

$$A = \log (I_o/I_f) = a\ b\ c \qquad [7]$$

em que I_o e I_f são as intensidades das radiações incidente e emergente, respectivamente, a é a absortividade específica, b é o percurso óptico e c é a concentração (ou o número de átomos livres gasosos) do analito.

A produção de átomos livres gasosos pode ser obtida recorrendo a sistemas de atomização com ou sem chama.

A espectrofotometria de absorção atómica por chama, EAA-C, consiste na aspiração para a chama (frequentemente, ar-acetileno ou protóxido de azoto-acetileno) de amostras líquidas misturadas com os gases oxidante e combustível através de um nebulizador que provoca a dispersão da solução a analisar (formação de aerossóis).

A EAA-C é uma técnica expedita mas apresenta algumas limitações, como seja, baixa sensibilidade, a necessidade de volumes apreciáveis de amostra (cerca de 1 mL, no mínimo) e necessidade de solubilização das amostras. Os limites de detecção da técnica são da ordem de mg/L.

Com o objectivo de ultrapassar estas limitações, desenvolveram-se outros tipos de atomização dos quais, a EAA com atomização electrotérmica (EAA-AE) é uma das técnicas de utilização mais

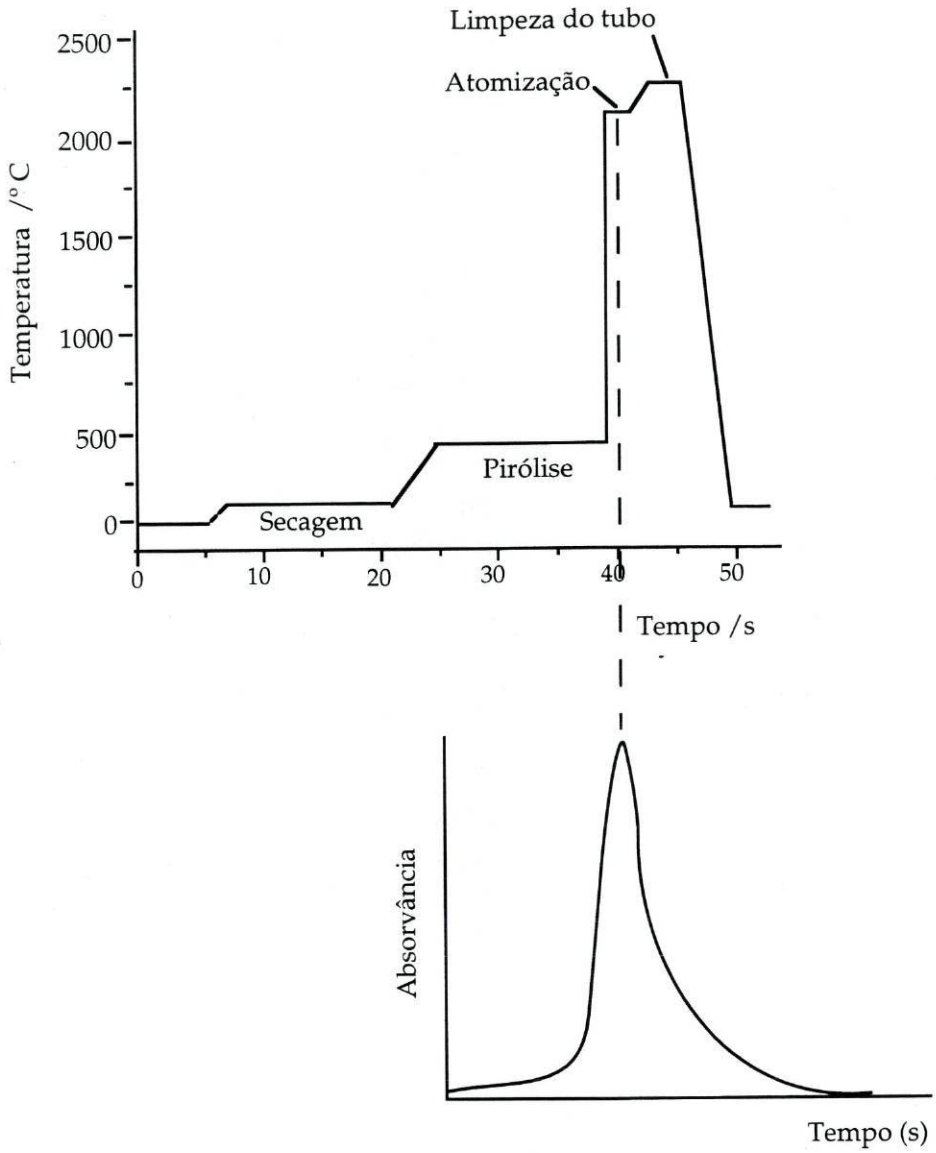


Figura 2.1.5. Exemplo de um programa de atomização electrotérmica e de um registo de sinal. Adaptado das referências [32,36].

generalizada. Esta técnica apresenta limites de detecção cerca de 100 a 1000 vezes menores do que os da EAA-C, utiliza pequenas quantidades de amostra em fase líquida (volumes entre 10 e 50 μL), na forma de suspensões ou mesmo sólida. A EAA-AE consiste no aquecimento progressivo, previamente programado, de um forno de grafite contendo a amostra. O aumento de temperatura do forno deve-se ao calor desenvolvido, por efeito de Joule, resultante da aplicação de uma diferença de potencial aos extremos da câmara ou à sua secção

transversal. O programa de temperaturas varia com o elemento a analisar e com a composição da amostra, mas compreende, normalmente, as quatro etapas seguintes (Figura 2.1.5.): (1) secagem, para eliminação do solvente; (2) pirólise, para destruição da matéria orgânica; (3) atomização do elemento e, finalmente (4) limpeza da câmara para remoção de resíduos. A elevada sensibilidade da EAA-AE deve-se ao facto dos átomos permanecerem na zona de observação óptica por um período de tempo relativamente longo ($\leq$ 1s) e a níveis reduzidos de absorção de fundo, em consequência da matriz da amostra ter sido eliminada previamente.

2.1.6 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL

A quantificação do carbono orgânico total (COT) numa amostra líquida baseia-se na conversão catalítica do carbono orgânico dissolvido a dióxido de carbono e medição subsequente do teor deste gás por espectrofotometria de infra-vermelho após remoção prévia do carbono inorgânico por acidificação e borbulhamento de azoto[37].

REFERÊNCIAS

1- B. H. Vassos e G. W. Ewing, "Electroanalytical chemistry", John Wiley and Sons, New York, 1983, cap.3.

2- M.T.S.D. Vasconcelos, "Determinação potenciométrica (pH e pM) de constantes de formação de complexos", Dissertação para doutoramento, Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 1983, cap. 3.1.

3- J. Buffle, *em* "The determination of trace metals in natural waters", T.S. West e H. W. Nürnberg, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, cap. 6.

4- J. O' Bockris e A.K.N. Reddy, "Modern electrochemistry", vol. 1, Plenum Press, New York, 1970, cap. 3.

5- M.L.S.S. Gonçalves, "Métodos instrumentais para análise de soluções, análise quantitativa", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983, cap. 9.

6- A. M. Bond, "Modern polarographic methods in analytical chemistry", Marcel Dekker, New York, 1980, cap. 6.

7- J. Buffle, F.L. Greter, G. Nembrini, J. Paul e W. Haerdi, *Z.Anal. Chem.*, **282**, 339 (1976).

8- H.W. Nürnberg, *Pure Appl. Chem.*, **54**, 853 (1982).

9- T.Riley, A. Watson *em* "Polarography and other voltammetric methods, analytical chemistry by open learning", A. M. James, Ed., John Wiley and Sons, New York,1987, cap. 3.

10- E.P. Parry e R.A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **37**, 1634 (1965).

11- B. H. Vassos e G. W. Ewing, "Electroanalytical chemistry", John Wiley and Sons, New York, 1983, cap.5.

12- A. M. Bond, "Modern polarographic methods in analytical chemistry", Marcel Dekker, New York, 1980, cap. 9.

13- T.Riley, A. Watson *em* "Polarography and other voltammetric methods, analytical chemistry by open learning", A. M. James, Ed., John Wiley and Sons, New York,1987, cap. 4.

14- E. Barendrecht, *em* "Electroanalytical Chemistry", vol. 2, A.J. Bard, Ed., Marcel Dekker, New York, 1967, pp. 53.

15- P. Hansen, *Int. Lab.*, **21**, 18 (1991).

16- D. Jagner, *Analyst*, **107**, 593 (1982).

17- T.R. Copeland e R.K. Skogerboe, *Anal. Chem.*, **46** 1257A (1974).

18- J. Wang, "Stripping analysis, principles, instrumentation and applications", VCH Publishers, Florida,1985, cap. 2.

19- M.L.S.S. Gonçalves, "Métodos instrumentais para análise de soluções, análise quantitativa", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983, cap. 10.

20- R.A. Osteryoung e J.H. Christie, *Anal. Chem.*, **46**, 351 (1974).

21- G.E. Batley e T.M. Florence, *J. Electroanal. Chem.*, **55**, 23 (1974).

22- W. Lund e D. Onshus, *Anal. Chim. Acta*, **86**, 109 (1976).

23- D. Jagner, E. Sahlin e L. Renman, *Talanta*, **41**, 515 (1994).

24- R. Cleven e L. Fokkert, *Anal. Chim. Acta*, **289**, 215 (1994).

25- S.B. Adeloju e T. M. Young, *Anal. Chim. Acta*, **302**, 225 (1995).

26- B. H. Vassos e G. W. Ewing, "Electroanalytical chemistry", John Wiley and Sons, New York, 1983, cap.9.

27- B. H. Vassos e G. W. Ewing, "Electroanalytical chemistry", John Wiley and Sons, New York, 1983, cap.6.

28- A. M. Bond, "Modern polarographic methods in analytical chemistry", Marcel Dekker, New York, 1980, cap. 7.

29- A.J. Bard e L.R. Faulkner, "Electrochemical methods, fundamentals and applications", John Wiley and Sons, New York, 1980, cap. 9.

30- A. C. Lopes da Conceição, "Interacções de metais pesados com organismos biológicos e proteínas", Dissertação para doutoramento, Departamento de Engenharia Química do Instituto Superior Técnico, Lisboa, 1991, cap. VI.

31- A.A.S.C. Machado, "Espectroscopia de absorção atómica, desenvolvimento e fundamentos", C.I.Q.(U.P.), Porto, 1983.

32- M.T. Vasconcelos, "Espectroscopia de absorção atómica com atomização electrotérmica, fundamentos e tendências actuais", Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 1991/92.

33- D.L. Tsalev e Z. K. Zaprianov, "Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice", vol.1, CRC Press, Florida, 1983, cap. 1.

34- M.L.S.S. Gonçalves, "Métodos instrumentais para análise de soluções, análise quantitativa", Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983, cap. 3.

35- H.M.V.M. Soares, "Doseamento do mercúrio em sedimentos. Estudo da interferência da matriz". Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica, Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia do Porto, Porto, 1990.

36- "User´s manual- model 4100 ZL atomic absorption spectrometer", Perkin-Elmer, Ueberlingen, 1992.

37- "Instruction manual-model 1254 total carbon analyzer and model 1258 total carbon analyzer", Ionics, 1979.

CAPÍTULO 2.2

Procedimento Experimental

2.2.1 REAGENTES

2.2.2 SOLUÇÕES

2.2.2.1 Soluções de partida

2.2.2.2 Outras soluções

2.2.3 EQUIPAMENTOS

2.2.3.1 Potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre

2.2.3.2 Polarografia diferencial com impulsos e voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos

2.2.3.3 Potenciometria de redissolução anódica

2.2.3.4 Polarografia com corrente alternada

2.2.3.5 Sistema de digestão de amostras

2.2.3.6 Espectrofotometria de absorção atómica

2.2.3.7 Determinação do carbono orgânico total

2.2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.2.4.1 Determinações por potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre

2.2.4.2 Determinações por técnicas de redissolução anódica

2.2.4.3 Determinações por polarografia com corrente alternada

2.2.4.4 Determinações por espectrofotometria de absorção atómica

2.2.1 REAGENTES

Todos os reagentes, excepto os que se referem a seguir, foram de qualidade p.a. ou equivalente e foram usados sem terem sido submetidos a qualquer purificação adicional.

O mercúrio usado no eléctrodo de trabalho foi, por gentileza da Senhora Drª Maria Fernanda Cabral, purificado por lavagem com ácido nítrico a 10% e destilado duas vezes a pressão reduzida.

Os AF foram, por gentileza do Senhor António José Teixeira de Sousa, isolados a partir de um solo florestal de Ermesinde (Ardegães) em 1990, e extraídos pelo método padrão recomendado pela IHSS[1].

Usou-se glicina da Sigma, ref. G-7126, e AH da Fluka, ref. 53680.

Usaram-se o ácido piperazina-N,N´-bis(2-etano)sulfónico (PIPES), ref. P-6757, e o ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-etanosulfónico (HEPES), ref. H-0891, da marca Sigma.

2.2.2 SOLUÇÕES

Na preparação das soluções usou-se material de vidro da classe A e água desionizada com uma resistividade > 14 MΩcm.

Todo o material de vidro e de plástico foi previamente descontaminado numa solução de ácido nítrico a 18 % (m/v) durante 24 horas e em seguida lavado abundantemente com água desionizada.

2.2.2.1 Soluções de partida

Nas experiências por potenciometria com eléctrodo selectivo a catião cobre(II) (PESC), as soluções padrão de cobre(II) utilizadas foram preparadas a partir de uma solução de partida de nitrato de cobre(II) 0,1000 mol/L da Radiometer.

Nas experiências por VRADI e por PRA usaram-se soluções padrão de cobre(II) preparadas a partir de uma solução de cloreto de cobre(II) 15,75 mmol/L Titrisol da Merck. A partir desta preparava-se, na altura de utilizar, uma solução intermédia de 0,787 mmol/L no sal por diluição com água desionizada.

Na preparação da solução de agente oxidante usada nas experiências por PRA partiu-se de solução de cloreto de mercúrio(II)

5 mmol/L Titrisol da Merck, tendo-se preparado, por diluição com água desionizada, outra solução 2 mmol/L no sal.

Prepararam-se também duas soluções de glicina 0,01 e 1 mol/L por pesagem devidamente seco seguida de diluição rigorosa em água desionizada.

Na preparação dos padrões para as determinações por EAA, partiu-se de soluções de nitrato de cobre(II) 15,75 mmol/L e de nitrato de zinco(II) 15,30 mmol/L ambos Spectrosol da BDH. A partir da solução de cobre, prepararam-se soluções diluídas dez e mil vezes em ácido nítrico a 3 % (m/v). A solução de zinco foi apenas diluída dez vezes e acidulada a 3 % (m/v).

2.2.2.2 Outras soluções

As soluções de AF foram preparadas por pesagem dos AF, condicionados em excicador com gel de sílica, seguida de dissolução do sólido e diluição rigorosa com uma solução de perclorato de sódio 0,5 mol/L a pH 6,5, tamponado com PIPES 10 mmol/L.

As soluções de AH foram preparadas do seguinte modo: uma determinada quantidade de AH foi solubilizada num dado volume de água desionizada com agitação durante um dia; a suspensão resultante foi filtrada através de um filtro Millipore com 0,45 µm de porosidade. Posteriormente, com o objectivo de tamponar a solução (pH 6,5) e ajustar a força iónica adicionou-se aquelas soluções PIPES e nitrato de potássio, ambos numa concentração de 10 mmol/L, após se ter ajustado o volume final.

Para a preparação de cada uma das soluções de glicina, pipetou-se um volume rigoroso de uma das soluções de partida e diluiu-se a 20 mL com uma solução 10 mmol/L em nitrato de potássio e 10 mmol/L em PIPES com pH ajustado previamente a 6,0 ou a 6,5.

Para preparar as soluções tampão, dissolveram-se por litro de solução, 3,204 ou 5,958 g de PIPES ou HEPES juntamente com o

electrólito de suporte correspondente, respectivamente, num volume de líquido próximo do volume pretendido. Colocou-se a solução numa célula electroquímica munida de um eléctrodo combinado de pH e adicionou-se lentamente solução concentrada de hidróxido de sódio, até se dissolver o sólido e atingir o valor de pH pretendido. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico e perfez-se o volume.

A água do mar sintética foi preparada de acordo com Harrison *et al.*[2] (Tabela 2.2.1), tendo, no entanto, sido ainda acrescentado à solução PIPES 10 mmol/L a pH 6,5 ou 7,5 (ver secção 3.1.2) ou HEPES 25 mmol/L para tamponar o meio a pH 8,0 (ver secção 3.5.2).

Tabela 2.2.1. Composição da água do mar sintética[2].

Macrocomponentes (mmol/L)		**Microcomponentes (µmol/L)**[a]	
NaCl	363	$NaNO_3$	549
$MgCl_2$	47,2	$NaglicerоPO_4$	21,8
Na_2SO_4	25,0	$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$	5,97
$CaCl_2$	9,14	$MnSO_4$	2,42
KCl	8,04	$FeCl_3$	$5,92 \times 10^{-1}$
$NaHCO_3$	2,07	$ZnSO_4$	$2,54 \times 10^{-1}$
KBr	$7,25 \times 10^{-1}$	$CoSO_4$	$5,69 \times 10^{-2}$
H_3BO_3	$4,34 \times 10^{-1}$	Tiamina HCl	$2,97 \times 10^{-1}$
$SrCl_2$	$8,20 \times 10^{-2}$	Vitamina B_{12}	$1,47 \times 10^{-3}$
NaF	$6,57 \times 10^{-2}$	Biotina	$4,09 \times 10^{-3}$

a- a solução original continha também 14,9 µmol/l de EDTA.

2.2.3 EQUIPAMENTOS

2.2.3.1 Potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre

As titulações foram realizadas com um decimilivoltímetro da marca Sargent-Welch 6050 acoplado a um comutador de eléctrodos da marca Fischer.

Como eléctrodo de referência, usou-se um eléctrodo de dupla junção da marca Orion 90-02-00 em que o compartimento exterior foi preenchido com perclorato de sódio 0,5 mol/L ou nitrato de potássio 10 mmol/L, consoante foram efectuadas titulações com AF ou com AH. Como eléctrodos de trabalho, usaram-se um eléctrodo de vidro Philips GAH110, nas medições de pH, e dois eléctrodos da Radiometer 3012 activados com um sensor de Ag_2S/CuS preparados de acordo com a metodologia descrita por Lima e Machado[3], nas medições de pCu.

As titulações foram efectuadas com uma célula de vidro de dupla parede da marca Metrohm EA 880T.

2.2.3.2 Polarografia diferencial com impulsos e voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos

As experiências por PDI e por VRADI foram efectuadas com um polarógrafo Eco Chemie com um módulo IME acoplado a um posto polarográfico Metrohm 663 VA.

Usaram-se um eléctrodo de Ag/AgCl(s) KCl 3 mol/L, como eléctrodo de referência, um eléctrodo de carbono vítreo, como eléctrodo auxiliar, e um eléctrodo de mercúrio Metrohm, como eléctrodo de trabalho. Este último foi usado sob a forma de eléctrodo gotejante de mercúrio (EGM), nas experiências realizadas por PDI, e sob a forma de eléctrodo de mercúrio de gota suspensa (EMGS), nas experiências efectuadas por VRADI. Em algumas experiências (ver capítulo 3.2), o eléctrodo de mercúrio foi substituído por um eléctrodo de carbono vítreo com filme de mercúrio (ECFM).

As determinações realizadas por PDI foram efectuadas com uma célula de vidro de dupla parede da marca Metrohm, EA 880T. As experiências realizadas por VRADI e também por PRA, excepto as descritas no capítulo 3.1 foram efectuadas com vasos de polietileno, os quais foram introduzidos dentro da célula de vidro de dupla parede da marca Metrohm EA 880T. Cada vaso foi usado apenas uma vez por dia.

2.2.3.3 Potenciometria de redissolução anódica

As determinações descritas no capítulo 3.1 foram efectuadas com um sistema de varrimento anódico da marca Radiometer ISS 820. Este sistema é constituído por uma unidade REA 120, uma unidade TTA-IS e um registador Servograph REC 80.

A célula electroquímica consistiu num vaso de polietileno, no qual foram inseridos o agitador mecânico Radiometer 847-712 e os eléctrodos. Usaram-se: um eléctrodo saturado de calomelanos K-4040, como eléctrodo de referência, um eléctrodo de platina P1312, como eléctrodo auxiliar, e um eléctrodo de carbono vítreo F3500, como eléctrodo de trabalho.

Nas restantes experiências efectuadas por PRA usou-se o sistema polarográfico descrito em 2.2.3.2. Os eléctrodos de trabalho utilizados foram o eléctrodo EMGS e em algumas experiências descritas no capítulo 3.2 também o eléctrodo ECFM.

2.2.3.4 Polarografia com corrente alternada

As experiências realizadas por PCA foram efectuadas com um polarógrafo Metrohm E 506 gentilmente cedido pela Mestra Cidália Botelho e pelo Doutor Rui Boaventura. Este polarógrafo encontra-se acoplado a um posto polarográfico Metrohm 663 VA. Usou-se o eléctrodo de Ag/AgCl(s) KCl 3 mol/L, o eléctrodo de carbono vítreo e o eléctrodo gotejante de mercúrio como eléctrodos de referência, auxiliar e de trabalho, respectivamente.

As determinações foram realizadas directamente em células de vidro de dupla parede da marca Metrohm EA 880T.

2.2.3.5 Sistema de digestão de amostras

A destruição da matéria orgânica das amostras de microalgas marinhas foi realizada em vaso fechado num sistema de digestão por microondas da marca Millestone, MLS-1200 Mega acoplado a um módulo de exaustão EM-30.

2.2.3.6 Espectrofotometria de absorção atómica

As determinações de cobre total ($[Cu]_t$) na água do mar sintética e de zinco total nas microalgas marinhas foram realizadas num espectrofotómetro de absorção atómica com atomização por chama PU 9200X Philips.

Na quantificação de $[Cu]_t$ nas microalgas marinhas usou-se um espectrofotómetro de absorção atómica com atomização electrotérmica 4100 ZL Perkin-Elmer acoplado a um amostrador automático AS-70 Perkin-Elmer.

2.2.3.7 Determinação do carbono orgânico total

O COT foi doseado num aparelho IONICS modelo 1258, gentilmente cedido pelo Doutor Rui Boaventura.

2.2.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todas as soluções foram tamponadas relativamente ao pH. Para tal, usou-se tampão PIPES para pH 6,0, 6,5 e 7,5 e tampão HEPES para pH 8,0. Previamente, confirmou-se que estes compostos não formavam complexos com o cobre(II) quer a pH 6,5 (ver apêndices 1 (PIPES) e 2 (HEPES), respectivamente) quer a pH 8,0 (resultados não mostrados), como era descrito na literatura[4,5].

2.2.4.1 Determinações por potenciometria com eléctrodo selectivo de cobre

As titulações efectuadas por PESC foram feitas às temperaturas de 20 °C e, em alguns casos adiante especificados, também a 25 °C para permitir comparação dos resultados com outros descritos na literatura.

Nas experiências realizadas por PESC usaram-se sempre dois eléctrodos selectivos a catião cobre(II), em paralelo, para testar a reprodutibilidade do potencial. A leitura do potencial foi efectuada após estabilização: $\Delta E \leq 0{,}1$ mV/minuto. O número de pontos foi variável entre 20 e 39 por ensaio.

2.2.4.2 Determinações por técnicas de redissolução anódica

As determinações realizadas por PRA e por VRADI foram efectuadas, por partida, à temperatura de 20 °C.

O volume de solução usado na célula electroquímica foi de 20 mL em todas as determinações. O oxigénio dissolvido foi previamente removido da solução com uma corrente de azoto com um grau de pureza de 99,995 % durante 10 minutos salvo indicação em contrário, tendo sido mantida uma atmosfera de azoto sob a solução durante as experiências. O tempo de residência na célula das amostras e das soluções padrão foi sempre o mesmo, de modo a minimizar os efeitos dos fenómenos de adsorção do metal às paredes da célula nos resultados[6].

Como agente oxidante para provocar a redissolução anódica em PRA, usou-se mercúrio(II). Este era adicionado na forma de solução de cloreto de mercúrio(II) imediatamente antes de se iniciar a etapa de redissolução, com vista a não perturbar o equilíbrio químico na solução durante a fase de deposição. O volume e a concentração da solução, que variaram de caso para caso, são referidos adiante em cada situação particular.

As experiências realizadas por VRADI foram efectuadas nas condições experimentais seguintes, salvo indicação em contrário: altura do impulso, 50 mV; duração do impulso, 60 ms; tempo de repetição do impulso, 1s e velocidade de varrimento, 5 mV/s. As restantes condições experimentais serão referidas em cada caso particular.

As determinações de cobre total em água do mar sintética foram efectuadas por VRADI para concentrações inferiores a 4,72 μmol/L. Para concentrações superiores, as determinações foram efectuadas por EAA-C (ver secção 2.2.4.4). As amostras foram acidificadas com ácido nítrico a 3% (m/v) imediatamente após a sua colheita. Os padrões usados nas determinações por VRADI ou por EAA-C foram obtidos a partir de soluções intermédias de 0,787 e 1,57 mmol/L de cobre(II) (ver secção 2.2.2.1) e preparados em meio de água do mar sintética com ácido nítrico a 3 % (m/v). As determinações de cobre total na água do mar sintética (ver capítulo 3.5) realizadas por VRADI foram efectuadas nas condições experimentais seguintes: potencial de deposição, E_d = -0,7 V *vs.* Ag/AgCl(s) KCl 3 mol/L; tempo de deposição, 50 s (30 com agitação e 20 em repouso) e velocidade de varrimento, 10 mV/s.

2.2.4.3 Determinações por polarografia com corrente alternada

Nos estudos dos fenómenos de adsorção, realizados por PCA, usou-se um ângulo de fase (φ) de 90°. A amplitude do componente sinusoidal do potencial, ΔE = 10 mV, foi sobreposta à rampa de potencial contínuo, que variou entre 0 e -1,2 V à velocidade de 5 mV/s. Trabalhou-se com uma frequência de 75 Hz e um tempo de gota de 0,8s.

2.2.4.4 Determinações por espectrofotometria de absorção atómica

As determinações de zinco total e de cobre total nas microalgas marinhas foram efectuadas por EAA-C e EAA-AE, respectivamente, contra curvas de calibração. As soluções padrão de zinco e de cobre foram preparadas a partir de soluções intermédias de 1,53 mmol/L de zinco e de 15,75 μmol/L de cobre (ver secção 2.2.2.1), e aciduladas de

modo a que a concentração final de ácido nítrico fosse 3 ou 0,46 %(m/v), respectivamente.

As determinações de zinco total realizadas por EAA-C foram efectuadas nas condições experimentais seguintes: comprimento de onda, 213,9 nm; largura de banda, 0,5 nm; intensidade da corrente da lâmpada, 7,5 mA; tempo de análise, 4s e fluxo de acetileno, 0,9 L/min.

As condições instrumentais usadas nas determinações de cobre realizadas por EAA-C e por EAA-AE são dadas na Tabela 2.2.2.

Tabela 2.2.2 Condições experimentais usadas nas análises de cobre total por EAA-C ou por EAA-AE.

EAA-C:

Comprimento de onda : 324,8 nm

Largura de banda: 0,5 nm

Intensidade da corrente da lâmpada: 7,5 mA

Tempo de análise: 4 s

Fluxo de acetileno: 0,9 L/min

EAA-AE:

Comprimento de onda : 324,8 nm

Largura de banda: 0,7 nm

Intensidade da corrente da lâmpada: 10 mA

Volume de injecção das amostras e dos padrões: 20 µL

Programa de temperaturas :

Fase	Temperatura	Tempo (s)		Caudal de Azoto	Leitura
	(°C)	Rampa	Permanência	(mL/min)	
1	110	20	1	250	
2	130	30	5	250	
3	1100	20	10	250	
4	1900	5	0	0	x
5	2400	2	1	250	

Os restantes detalhes experimentais serão referidos em cada capítulo.

REFERÊNCIAS

1- E.M. Thurman *em* "Humic substances and their role in the environment", F.H. Frimmel e R.F. Christman, Eds., Wiley-Interscience, NewYork, 1988, pp. 31.

2- P.J. Harrison, R.E. Waters e F.J.R. Taylor, *J. Phycol.*, **16**, 28 (1980).

3- J.L.F.C. Lima e A.A.S.C. Machado, *em* "Analytical Techniques in Environmental Chemistry", Vol. 2, J. Albarges, Ed., Pergamon, New York, 1982, pp. 419.

4- N.E. Good, G.D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa e R.M.M. Singh, *Biochemistry*, **5**, 467 (1966).

5- N.E. Good e S. Izawa, *Method. Enzymol.*, **24 B**, 53 (1972).

6- J.M. Diaz-Cruz, M. Esteban, M.A.G.T. van den Hoop e H.P. van Leeuwen, *Anal. Chem.*, **64**, 1769 (1992).

CAPÍTULO 2.3

Métodos de Cálculo

2.3.1 DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE ESTABILIDADE CONDICIONAIS DE COMPLEXOS COM COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO LÁBIL

2.3.1.1 Cálculo de constantes de estabilidade condicionais a partir dos desvios do potencial do pico

2.3.1.2 Cálculo de constantes de estabilidade condicionais a partir das intensidades dos picos

2.3.2 CÁLCULO DE β_j' A PARTIR DE CONSTANTES DE ESTABILIDADE ESTEQUIOMÉTRICAS DA LITERATURA

2.3.3 MODELOS DE RUZIC E DE SCATCHARD

2.3.4 FUNÇÃO DE EQUILÍBRIO DIFERENCIAL

2.3.5 CÁLCULO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO

2.3.6 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE EQUILÍBRIO QUÍMICO

O presente capítulo descreve os modelos matemáticos e os métodos de cálculo utilizados no tratamento dos resultados experimentais.

2.3.1 DETERMINAÇÃO DE CONSTANTES DE ESTABILIDADE CONDICIONAIS DE COMPLEXOS COM COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO LÁBIL

2.3.1.1 Cálculo de constantes de estabilidade condicionais a partir dos desvios do potencial do pico

No caso de complexos lábeis (ver secção 3.3.2), os desvios do potencial do pico (ΔE_p) obtidos para uma solução contendo um ião

metálico, M^n, e um ligando, L, relativamente ao potencial observado na ausência de ligando, permite obter informações acerca da extensão da complexação[1-4]. Os ΔE_p associados à complexação podem ser calculados pelo método de DeFord-Hume[2,5] através da equação seguinte:

$$\Delta E_p = Ep^a - Ep^p = (2{,}303\ RT/nF)\ [\log \alpha + \log (ip^p/ip^a)] \qquad [8]$$

em que α está relacionado com o grau de complexação[3] através da equação [9] e $[M]_t$ e [M] são as concentrações do catião metálico total e livre (aquocomplexo), respectivamente.

$$\alpha = [M]_t/[M] \qquad [9]$$

E_p^p, i_p^p, E_p^a e i_p^a representam os potenciais de pico e as intensidades de corrente referentes ao metal na presença (p) e na ausência (a) de ligando, respectivamente; n, R, T e F têm o significado habitual.

Atendendo à semelhança existente entre a VRADI e a PRA, nesta última os valores de i_p^p e i_p^a na equação [8] podem ser substituídos por $(dt/dE)^p$ e $(dt/dE)^a$, respectivamente.

As condições de validade da equação [8] são referidas na secção 3.3.2.

A equação [8] pressupõe que o processo é controlado por difusão e pode tomar a forma seguinte:

$$\Delta E_p = Ep^a - Ep^p = (2{,}303\ RT/nF)\ [\log \alpha + \log (\bar{D}/D_M)^{1/2}] \qquad [10]$$

em que D_M é o coeficiente de difusão do metal livre (e pode ser encontrado na literatura) e $\bar{D}$ é o coeficiente de difusão médio das diversas formas do metal. Este parâmetro traduz a difusão global das

formas livre, [M], e complexada, $[M]_{lig}$, como consequência do rápido equilíbrio que se estabelece (complexos lábeis) e pode ser calculado através da equação seguinte[6]:

$$\bar{D} = D_{Mlig}\,(\alpha\text{-}1)/\alpha + D_M/\alpha \qquad [11]$$

em que $\bar{D} = D_{Mlig}$ quando $\alpha \rightarrow \infty$ (isto é, $[L]_t \rightarrow \infty$).

Quando os ligandos são simples (monoméricos) e de pequeno tamanho, como é o caso, por exemplo, dos aniões inorgânicos e de aminoácidos, os coeficientes de difusão dos complexos formados (D_{Mlig}) são semelhantes ao do ião metálico[3], D_M. Sendo assim, $\log (i_p{}^p/i_p{}^a) = 0$ porque $i_p{}^p/i_p{}^a \cong 1$. Neste caso, a equação [10] toma a forma seguinte:

$$\Delta E_p = Ep^a - Ep^p = (2{,}303\ RT/nF)\ \log \alpha \qquad [12]$$

Para titulações de um metal com um ligando simples, que formam complexos ML_j e em que $D_M = D_{Mlig}$, as concentrações de metal livre e total, em cada ponto da titulação, relacionam-se com as constantes condicionais de estabilidade globais de equilíbrio, β'_j, através da equação seguinte:

$$\alpha = 1 + \sum_j \beta'_j\ [L]^j \qquad [13]$$

O ajuste dos dados experimentais (ΔE_p) à função descrita pela equação [14] conduz a um polinómio de grau j. Os coeficientes do polinómio correspondem aos valores das constantes condicionais de estabilidade globais.

$$\sum_j \beta'_j\ [L]^j = 10^{\left[\frac{\Delta E_p}{(2{,}303\ RT/nF)}\right]} - 1 \qquad [14]$$

Para titulações de ligandos polifuncionais, que possuem um grande número de locais de coordenação (ver secção 2.3.4), com um metal, as concentrações de metal livre e complexado, em cada ponto da titulação, podem ser calculadas a partir da equação [8] e do balanço material do metal (equação [15]):

$$[M]_t = [M]_{lig} + [M] \qquad [15]$$

onde $[M]_{lig}$ significa o metal complexado.

O cálculo de α através da equação [8] só poderá ser aplicado se as diferenças entre os valores de ΔE_p e os valores de $[(2{,}303\ RT/nF) \log (i_p{}^p/i_p{}^a)]$ forem significativamente superiores ao erro experimental na medição do potencial[7,8]. Se as diferenças forem muito pequenas e os valores das intensidades dos picos na presença do ligando forem significativamente menores do que na ausência de ligando, os cálculos devem ser efectuados a partir dos valores das intensidades dos picos (ver secção seguinte).

2.3.1.2 Cálculo de constantes de estabilidade condicionais a partir das intensidades dos picos

Considerando que o processo electroquímico é controlado por difusão, a corrente do pico, i_p, pode ser dada pela equação seguinte:

$$i_p = C\ \bar{D}^{1/2}\ [M]_t \qquad [16]$$

em que o valor da constante, C, pode ser calculado a partir do declive da curva de calibração utilizando um valor de D_M da literatura. Em cada ponto da titulação de ligando com metal, $\bar{D}$ pode ser calculado a partir da equação [16], uma vez conhecido o valor de C. Numa zona da curva de titulação em que o ligando se encontre em largo excesso (início da titulação) pode-se calcular $D_{M_{lig}}$ a partir do declive da equação [16] uma vez que $[M]_{lig} \cong [M]_t$ e por isso $D_{M_{lig}} = \bar{D}$.

Os valores de $[M]_{lig}$ e [M] podem ser calculados a partir da

equação [11] e do balanço material do metal (equação [15]). No entanto, este método só é válido se durante a fase de deposição o ligando se encontrar em excesso[8].

Atendendo à semelhança existente entre a VRADI e a PRA, a determinação de $[M]_{lig}$ e [M] a partir das intensidades dos picos (dt/dE) é também válida para a PRA.

Posteriormente, a aplicação dos modelos de Ruzic[9,10] e de Scatchard[10] (ver secção 2.3.3) ou do modelo da função de equilíbrio diferencial[10,11] (ver secção 2.3.4) aos valores de [M], $[M]_{lig}$ e $[M]_t$ permite calcular os parâmetros complexométricos ou os valores da função de equilíbrio diferencial.

2.3.2 CÁLCULO DE β_j' A PARTIR DE CONSTANTES DE ESTABILIDADE ESTEQUIOMÉTRICAS DA LITERATURA[12]

Considere-se a complexação de um metal, M, a um ligando de estrutura e composição simples e definida, H_mL, com formação de complexos em que o ligando intervem na forma totalmente desprotonada, ML, ML_2 ... ML_j, cujos equilíbrios podem ser representados pelas equações seguintes (para simplificar, as cargas foram omitidas):

$$M + L \leftrightarrow ML \qquad [17]$$

.....

$$M + j\,L \leftrightarrow ML_j \qquad [18]$$

cujas constantes de estabilidade estequiométricas globais (β_j) são dadas pelas equações seguintes:

$$\beta_1 = [ML]/([M]x[L]) \qquad [19]$$

.....

$$\beta_j = [ML_j]/([M]x[L]^j) \qquad [20]$$

Uma vez que a complexação implica a desprotonação do ligando,

a extensão da complexação é também função do pH do meio.

A um dado pH e em condições de excesso de ligando (ver secção 3.3.2), os balanços materiais do ligando e do metal podem ser dados pelas equações seguintes:

$$[M]_t = [M] + \sum_j [ML_j] \quad [21]$$

$$[L]_t = [L]\{1+ ... + [H]^m/(Ka_1 \times ... \times Ka_m)\} + \sum_j [ML_j] \quad [22]$$

em que $[L]_t$, $[L]$, Ka_1 e Ka_m representam as concentrações de ligando total e livre e as constantes de protólise de H_mL e HL, respectivamente.

Definindo α' como:

$$\alpha' = 1+ ... + [H]^m/(Ka_1 \times ... \times Ka_m) \quad [23]$$

a equação [22] toma a forma seguinte:

$$[L]_t = [L]\,\alpha' + \sum_j [ML_j] \quad [24]$$

A partir do balanço material do ligando (equação [24]) e das β_j representadas pelas equações [19] e [20], obtêm-se as relações seguintes:

$$\beta_1' = \beta_1/\alpha' = [ML]/\{[M] \times ([L]_t - \sum_j [ML_j])\} \quad [25]$$

.....

$$\beta_j' = \beta_j/(\alpha')^j = [ML_j]/\{[M] \times ([L]_t - \sum_j [ML_j])^j\} \quad [26]$$

as quais permitem, a uma dada [H] (ou pH), calcular as constantes condicionais de estabilidade globais (β_j') a partir de β_j e dos valores das constantes de protólise.

2.3.3 MODELOS DE RUZIC E DE SCATCHARD

A capacidade de complexação (CC) de um sistema químico para um dado metal pode estar associada à formação de um só tipo de complexos ou vários tipos de complexos 1:1 com ligandos diferentes ou com um mesmo ligando com diversas posições de coordenação, às quais correspondem constantes de estabilidade diferentes. Se os valores das constantes de estabilidade de diferentes complexos apresentarem ordens de grandeza significativamente diferentes, será possível distingui-los por métodos gráficos simples, como são os métodos de Ruzic[9,10] e de Scatchard[10].

Considere-se que um dado ligando polimérico possui dois tipos de locais de coordenação, C_1 e C_2, em que $[C_1]_t + [C_2]_t = CC$ (ver secção 2.3.5). Admitindo que o metal forma complexos na proporção estequiométrica 1:1 com cada uma das posições de coordenação, o sistema é caracterizado pelo conjunto de equações seguintes:

$$CC = [C_1]_t + [C_2]_t \quad [27]$$

$$[M]_{lig} = [M]_t - [M] = [MC_1] + [MC_2] \quad [28]$$

$$[C_1]_t = [C_1] + [MC_1] \quad [29]$$

$$[C_2]_t = [C_2] + [MC_2] \quad [30]$$

$$K_1' = [MC_1] / ([M] \times [C_1]) \quad [31]$$

$$K_2' = [MC_2] / ([M] \times [C_2]) \quad [32]$$

em que K_1' , K_2' $[C_1]_t$, $[C_2]_t$, $[C_1]$ e $[C_2]$ representam as constantes de estabilidade condicionais, as concentrações totais e não complexadas dos dois tipos de locais de coordenação (posições 1 e 2), respectivamente.

Cada ponto da curva de titulação do ligando com o metal pode ser descrito pela função $[M]/[M]_{lig} = f([M])$ (ver exemplo: curva a da Figura 2.3.1). Este método gráfico é vulgarmente designado de método

de Ruzic[9,10] e é descrito pela equação seguinte[9]:

$$[M]/[M]_{lig} = 1/\{[C_1]_t/([M] + 1/K_1') + [C_2]_t/([M] + 1/K_2')\} \quad [33]$$

$$= \{[M] + ([M]/K_1^{**} + 1/K_1' \times K_2')/([M] + 1/K_2^{**})\}/([C_1]_t + [C_2]_t) \quad [34]$$

em que $K_1^{**} = ([C_1]_t + [C_2]_t)/([C_1]_t/K_1' + [C_2]_t/K_2')$ e $K_2^{**} = ([C_1]_t + [C_2]_t)/([C_2]_t/K_1' + [C_1]_t/K_2')$[9].

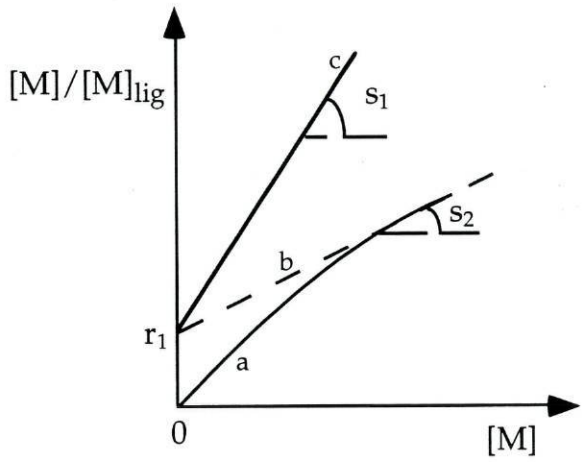


Figura 2.3.1. Representação gráfica de $[M]/[M]_{lig} = f([M])$ para a formação de complexos 1:1 entre um metal e dois tipos de locais de coordenação. (a) Representação gráfica original (ver equação [33]); (b) assíntota traçada na zona da curva em que os locais de fixação estão maioritariamente ocupados (ver equação [35]); (c) representação gráfica do inverso da diferença entre os valores das ordenadas da assíntota (curva b) e da curva de titulação com M (curva a) *vs.* [M], na zona da curva onde a fixação do metal ao ligando está a ocorrer nos locais mais fortes (ver equação [36]). Adaptado da referência[9].

Na zona da curva em que os locais de fixação estão maioritariamente ocupados, isto é quando $[M] \rightarrow \infty$, a equação [34] simplifica-se e é possível determinar a CC a partir do declive da recta (s_2) e uma constante de estabilidade condicional "total", K_1^{**}, a partir da ordenada na origem (r_1):

$$\{[M]/[M]_{lig}\}_{M\rightarrow\infty} = [M]/CC + 1/(K_1^{**} \times CC) \quad [35]$$

Na zona da curva onde a fixação do metal ao ligando está a ocorrer nos locais mais fortes, a representação gráfica do inverso da diferença entre os valores das ordenadas obtidas a partir da assíntota (definida por s_2 e r_1) e da curva de titulação com [M] (curva a) é descrita pela relação seguinte:

$$1/\{([M]/[M]_{lig})_{M\rightarrow\infty} - [M]/[M]_{lig}\} = ([M] + 1/K_2^{**})([C_1]_t + [C_2]_t)/(1/K_1^{**}K_2^{**} - 1/K_1' \times K_2') = s_1[M] + r_1 \quad [36]$$

Os valores de K_1' e K_2' e $[C_1]_t$ e $[C_2]_t$ podem ser determinados através da equação [27] e das relações seguintes:

$$K_1' + K_2' = (s_1 + K_1^{**} \times r_1)/(r_1 - K_1^{**} \times CC) \quad [37]$$

$$K_1' \times K_2' = (K_1^{**} \times s_1)/(r_1 - K_1^{**} \times CC) \quad [38]$$

$$[C_1]_t - [C_2]_t = [CC/(K_2' - K_1')] \times [(s_1 - K_1^{**} \times r_1)/(r_1 - K_1^{**} \times CC)] \quad [39]$$

De modo semelhante, o método gráfico de Scatchard[10] descrito pela função $[M]_{lig}/[M] = f([M]_{lig})$ permite calcular os mesmos parâmetros complexométricos através da combinação dos valores dos declives (s_1 e s_2), da ordenada na origem (r_1) e da abcissa na origem (r_2) obtidos a partir da representação gráfica apresentada na Figura 2.3.2:

$$s_1 = -\{[C_1]_t \times (K_1')^2 + [C_2]_t \times (K_2')^2\}/([C_1]_t \times K_1' + [C_2]_t \times K_2') \quad [40]$$

$$r_1 = [C_1]_t \times K_1' + [C_2]_t \times K_2' \quad [41]$$

$$r_2 = [C_1]_t + [C_2]_t \quad [42]$$

$$s_2 = 1/\{[C_1]_t/[([C_1]_t + [C_2]_t) \times K_1'] + [C_2]_t/[([C_1]_t + [C_2]_t) \times K_2']\} \quad [43]$$

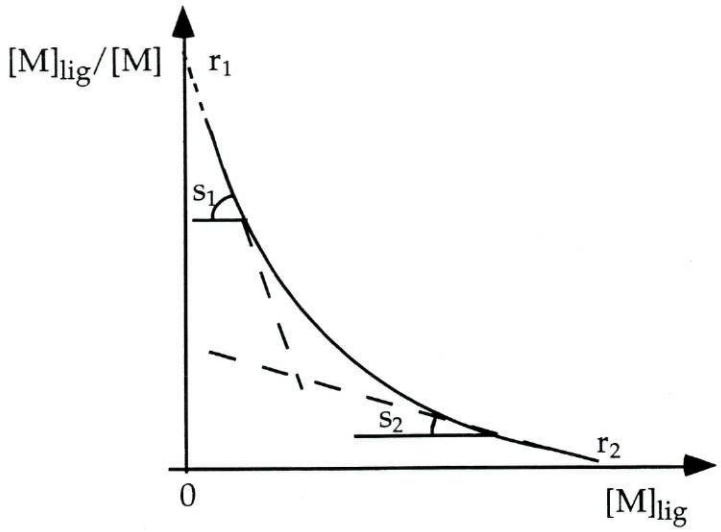


Figura 2.3.2. Representação gráfica de $[M]_{lig}/[M] = f([M]_{lig})$ para a formação de complexos 1:1 entre um metal e dois tipos de locais de coordenação. Adaptado da referência[10].

2.3.4 FUNÇÃO DE EQUILÍBRIO DIFERENCIAL[10,11,13]

No caso de ligandos poliméricos que possuem um número muito elevado de locais de coordenação diferentes, as constantes de estabilidade respectivas são diferentes devido à natureza polifuncional, polielectrolítica e conformacional destes ligandos. No entanto, alguns desses valores são muito próximos entre si e, por isso, indistinguíveis pelos métodos de análise gráfica anteriormente descritos. Neste caso, o sistema pode ser melhor caracterizado através da função de equilíbrio diferencial, que se passa a descrever sumariamente.

Considere-se um ligando, L, que possui uma infinidade de posições de coordenação ($j= \infty$) e cuja concentração total na solução ($[L]_t= \sum_j [^jL]_t$) é constante durante a titulação. Como o número de posições de coordenação é muito elevado, a concentração total de uma dada posição j de coordenação $[^jL]_t$, assim como as respectivas posições ocupadas, $[M^jL]$, disponíveis, $[^jL]'$, são de grandeza infinitamente pequena relativamente ao número total de posições de coordenação do ligando L, e podem ser representadas como o diferencial dos locais de

coordenação ocupados d[ML]) ou não ocupados (d[L]') das concentrações totais respectivas.

Designe-se por θ o grau de ocupação dos locais de fixação pelo metal e por $^{j}K'$ a constante de formação associada ao local j:

$$\theta = (1/\ [L]_t) \times \sum_j \{(^{j}K' \times [M])/(1 + {}^{j}K' \times [M])\} \times [^{j}L]_t \qquad [44]$$

$$[M^{j}L] \cong d\ [M]_{lig} = [L]_t\ d(\theta) \qquad [45]$$

e

$$[^{j}L]' \cong d\ [L]' = [L]_t\ d(1-\theta) \qquad [46]$$

Para cada ponto da titulação de ligando com o metal pode, portanto, definir-se $^{j}K'$:

$$^{j}K' = [M^{j}L]\ /(\ [M] \times [^{j}L]') \qquad [47]$$

a qual varia com θ, uma vez que a natureza (ou a força) dos locais de fixação, ^{j}L, também varia, decrescendo ao longo da titulação uma vez que os locais mais fortes são aqueles que são ocupados em primeiro lugar. Define-se, então, uma função contínua designada de função de equilíbrio diferencial:

$$K_{fed} = d[M]_{lig}/([M] \times d[L']) = f(\theta) \qquad [48]$$

cujos valores podem ser calculados, para uma concentração de ligando constante durante a titulação, a partir da equação [49] abaixo indicada, desde que se conheçam $[M]_t$, $[L]_t$ e [M]:

$$K_{fed} = -\frac{\alpha^2}{[M]_t}\left[\frac{1}{1+(\alpha-1)\ \frac{d\ln([M]_t/[L]_t)}{d\ln\alpha}}\right] \qquad [49]$$

2.3.5 CÁLCULO DA CAPACIDADE DE COMPLEXAÇÃO

No caso de ligandos heterogéneos (poliméricos e polifuncionais), cuja composição exacta e concentração molar é desconhecida, é vulgar estimar a concentração das respectivas posições de coordenação através de um parâmetro, designado por CC, o qual pode ser calculado por vários processos baseados na formação de complexos 1:1, de entre os quais se referem os seguintes que foram usados neste trabalho:

(i) curva de $[M]_{lig} = f\,[M]_t$[14]: a partir dum determinado valor de $[M]_t$ esta curva apresenta um valor constante de $[M]_{lig}$, que coincide com a CC;

(ii) método de Ruzic[9,10]: a CC é obtida a partir do valor do declive da parte linear da curva $[M]/[M]_{lig} = f([M])$ onde os locais de fixação estão maioritariamente ocupados (equação [35]);

(iii) método de Scatchard[10]: a CC é obtida do valor da abcissa na origem quando se verifica formação de dois ou mais complexos 1:1) (equação [42]).

2.3.6 SIMULAÇÕES COMPUTACIONAIS DE EQUILÍBRIO QUÍMICO

Os cálculos de especiação foram efectuados recorrendo ao programa de especiação MICROQL (II) (versão para computador "Apple-Machintosh" do programa originalmente criado por Westall[15], gentilmente cedido pela Mestra Cidália Botelho).

O programa permite calcular a concentração de todas as espécies químicas em equilíbrio, desde que se tenham previamente definido os componentes independentes (número mínimo de reagentes a partir dos quais todas as espécies podem ser obtidas) e as espécies (todas as entidades químicas com existência previsível no sistema), os quais são correlacionados numa matriz estequiométrica (ver exemplos típicos de matrizes de dados e de resultados nos apêndices 3 e 4). As simulações computacionais de equilíbrios químicos foram efectuadas utilizando dados compilados da literatura e outros obtidos experimentalmente. No entanto, é importante referir que os resultados das simulações

computacionais devem ser considerados apenas como valores aproximados uma vez que, por um lado, existe uma variabilidade significativa nos valores de uma mesma constante determinada por diferentes autores em condições experimentais semelhantes e, por outro lado, nem sempre se encontrou na literatura dados para as condições experimentais usadas no presente trabalho.

REFERÊNCIAS

1- R. Ernst, H.E. Allen e K.H. Mancy, *Wat. Res.*, **9**, 969 (1975).

2- D.D. DeFord e D.N. Hume, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 5321 (1951).

3- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 9.

4- J. Buffle, *em* "The determination of trace metals in natural waters", T.S. West e H. W. Nürnberg, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, cap. 6.

5- D.R. Crow, "Polarography of metal complexes", Academic Press, New York, 1969, cap. 4.

6- J. Buffle, J.J. Vuilleumier, M.L. Tercier e N. Parthasarathy, *Sci. Total Environ.*, **60**, 75 (1987).

7- J.P. Pinheiro, A.M. Mota e M.L. Simões Gonçalves, *Anal. Chim. Acta*, **284**, 525 (1994).

8- M. Bejarano, A.M. Mota, M.L.S. Gonçalves e L. Madrid, *Sci. Total Environ.*, **158**, 9 (1994).

9 - I. Ruzic, *Anal. Chim. Acta*, **140**, 99 (1982).

10- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 5.

11- J. Buffle e R. S. Altmann, *em* "Aquatic surface chemistry, chemical processes at the particle-water interface", W. Stumm, Ed., John Wiley and Sons, New York, 1987, cap. 13.

12 J. Cabral, "Lições de química analítica (principios fundamentais), Porto, 1987, cap. 6.

13- R.S. Altmann e J. Buffle, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 1505 (1988).

14- T.A. Neubecker e H.E. Allen, *Wat. Res.*, **17**, 1 (1983).

15- J. C. Westall, "MICROQL, a chemical equilibrium program in BASIC", Internal Report, Institut for Water Resources and Water Pollution Control (EAWAG), Dubendorf, 1979.

PARTE 3

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CAPÍTULO 3.1

Estudo da Labilidade de Complexos de Cobre(II) com AF por PESC e PRA

3.1.1 INTRODUÇÃO

3.1.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.3.1 Determinação dos parâmetros de complexação por PESC

3.1.3.2. Determinações por PRA

3.1.4 CONCLUSÕES

3.1.1 INTRODUÇÃO

Nos sistemas aquáticos, a matéria orgânica é constituída por uma mistura complexa de vários compostos, a qual inclui uma variedade de substâncias de origem biológica presente em diferentes graus de degradação: glícidos, proteínas e peptídos e lípidos. No entanto, na maioria dos ecossistemas, 70 a 80% da matéria orgânica pertence a um grupo diferente, vulgarmente designado de matéria orgânica refractária ou substâncias húmicas, uma vez que o seu período de vida é muito mais elevado do que o dos restantes compostos[1].

A designação de substâncias húmicas abrange uma mistura complexa e variada de compostos resultantes da condensação de produtos de degradação de plantas e de animais resistentes à degradação microbiana mas que apresenta um conjunto de propriedades similares que permite inclui-las num mesmo grupo[2,3].

Ao contrário dos ligandos simples, as substâncias húmicas apresentam o seguinte conjunto de características que justificam a

designação de ligandos heterogéneos[1,4]: (i) natureza polifuncional por possuírem um número significativo de locais de coordenação diferentes; (ii) natureza polielectrolítica: por um número elevado de locais de ligação apresentarem também carácter ácido-base, as macromoléculas apresentam uma densidade de carga eléctrica elevada, variável com o grau de complexação e com o pH do meio envolvente; (iii) efeitos conformacionais resultantes da influência da densidade de carga e grau de hidratação destas macromoléculas.

Uma vez que o número e distribuição dos locais de coordenação disponíveis das substâncias húmicas variam com o pH, a força iónica do meio e razões metal/ligando, a heterogeneidade do ligando tem repercussões nas propriedades termodinâmicas e cinéticas dos complexos formados e, consequentemente, na respectiva labilidade[4-6]. Esta, por sua vez, é uma medida da biodisponibilidade dos metais ligados a materiais húmicos em meios naturais.

O objectivo do trabalho descrito neste capítulo foi a determinação da labilidade operacional (medida por PRA) de complexos de cobre com AF num intervalo alargado de razões metal/ligando a pH 6,5, em perclorato de sódio 0,5 mol/L e em água do mar sintética[7]. Neste último caso, o trabalho foi também realizado a pH 7,5.

Para tal, recorreu-se a duas técnicas que fornecem informações complementares: a PESC, que mede apenas a concentração de metal livre (aquocomplexo), e a PRA, que mede além do metal livre, aquele que se dissocia dos respectivos complexos ao potencial de deposição aplicado durante a escala de tempo da técnica analítica utilizada, ou seja o metal lábil[8-11]. Em PRA, cada metal origina, normalmente, um pico (máximo da função $dt/dE = f(E)$) cuja altura é proporcional à concentração de metal lábil nas condições experimentais usadas. A combinação de resultados obtidos por PESC e por PRA, à mesma força iónica e ao mesmo pH, permite, portanto, obter informações sobre a labilidade dos complexos de cobre(II) com AF, uma vez que se sabe que os complexos inorgânicos são lábeis.

Parte dos resultados apresentados encontram-se publicados[12].

3.1.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As determinações por PESC foram realizadas a concentrações fixas de AF em meio de perclorato de sódio 0,5 mol/L a pH 6,5 tamponado com PIPES 10 mmol/L. O efeito de diluição devido à adição do titulante foi inferior a 10%. Como titulante, usou-se uma solução 5 mmol/L de nitrato de cobre(II) em perclorato de sódio 0,5 mol/L. As concentrações de ligando e de metal são dadas na Tabela 3.1.1.

Tabela 3.1.1. Condições experimentais usadas nas determinações.

Meio[a]	pCu_t	pCu^b	AF (mg/L)	Tempo de deposição (s)
		PESC[c]		
$NaClO_4$ 0,5 mol/L	5,3-3,0	6,4-3,1	1-150	----------
		PRA[d]		
$NaClO_4$ 0,5 mol/L	6,1-5,2	6,5-5,4	10-150	60 ou 120
Água do mar sintética[e]	4,8-5,7	6,3-5,0	10-150	60 ou 120

a - pH 6,5; *b*- metal lábil nas experiências de PRA; *c* - à temperatura de 20 e 25 °C; *d* - à temperatura de 20 °C; *e* - experiências também realizadas a pH 7,5.

Nas determinações por PRA, o ECFM foi preparado diariamente através da electrólise de uma solução 20 µmol/L de cloreto de mercúrio(II). Para isso, efectuaram-se quatro ciclos de deposição/varrimento a um potencial de deposição de -0,5 V *vs.* um eléctrodo saturado de calomelanos (ESC) durante quatro minutos cada. A velocidade de agitação das soluções foi de 2550 rotações por minuto (rpm). Dependendo da razão metal/ligando, o tempo de electrólise usado foi de 60 ou 120 s (ver outras informações na Tabela 3.1.1.). Em todas as experiências, 80 µL de uma solução 5 mmol/L de cloreto de mercúrio(II), que conferiu à solução a concentração de 20 µmol/L em mercúrio(II), foram adicionados imediatamente antes do início da fase

de redissolução anódica. Uma curva de calibração foi efectuada diariamente, utilizando procedimento semelhante, mas na ausência de ligando.

O COT existente nas soluções de AF foi de 0,35 (± 0,10) g COT/g AF. Para a determinação do COT, a curva de calibração foi efectuada com soluções padrão de hidrogenoftalato de potássio entre 4×10^{-3} e 2×10^{-2} g COT/L.

3.1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.3.1 Determinação dos parâmetros de complexação por PESC

Para o estudo da labilidade operacional dos complexos de cobre com AF era necessário conhecer os respectivos parâmetros complexométricos. Uma vez que os AF apresentam uma massa molecular indefinida, estima-se, normalmente, a sua concentração molar equivalente através da respectiva CC determinada por PESC[13,14]. Como o ião cloreto interfere na resposta do eléctrodo selectivo de cobre, as determinações por PESC foram efectuadas em soluções de perclorato de sódio com uma força iónica (≅ 0,5 mol/L) semelhante à da água do mar sintética (ver composição na Tabela 2.2.1.).

Efectuaram-se titulações de soluções com concentrações de AF entre 1 e 150 mg/L com cobre(II) (ver um exemplo típico na Figura 3.1.1). A partir dos valores de $[Cu]_t$ e de [Cu] em cada ponto da curva de titulação, determinou-se a CC dos AF através da representação gráfica de $[Cu]_{lig} = f\,[Cu]_t$[14] (ver secção 2.3.5) (ver exemplo típico na Figura 3.1.2). Este método só conduz a resultados aceitáveis, se a formação de hidroxocomplexos for desprezável no intervalo de valores de [Cu] usados no cálculo de CC. Neste trabalho, a validade desta condição foi avaliada através de uma simulação computacional, tendo-se estimado um erro máximo de 6% para os últimos pontos da curva de titulação. Os valores médios de cinco determinações independentes efectuadas para cada concentração de AF apresentam-se na Tabela 3.1.2. e na Figura 3.1.3. Esta figura mostra que a CC (mol/L), varia linearmente com a concentração de AF (coeficiente de correlação, R = 0,998, n = 6).

A partir do declive da recta, obteve-se uma CC de 1,8 mmol/g de AF (5,2 mmol/g COT), a qual foi independente da concentração de AF no intervalo de 1 a 150 mg/L de AF (0,35 - 52 mg/L COT). Lund *et al.*[15] obtiveram um comportamento semelhante com substâncias húmicas e fúlvicas no intervalo de 6 a 60 mg/L de COT. Este comportamento mostra que no intervalo de concentrações de AF estudadas não deverão ter ocorrido agregações ou alterações conformacionais em extensão apreciável[16]. Para concentrações de AF superiores, observou-se uma diminuição do declive da função CC = f ([AF]) (Figura 3.1.4.), o que se deveu provavelmente a alterações conformacionais dos AF. Por esta razão, a concentração máxima de AF utilizada nos estudos de labilidade subsequentes foi de 150 mg/L.

A partir do inverso do declive da recta da Figura 3.1.3, calculou-se a massa molar equivalente do AF, tendo-se obtido um valor de 552 g/mol. Este valor é da mesma ordem de grandeza das massas molares equivalentes obtidas noutros estudos para amostras de AF de solos de origens diferentes[17].

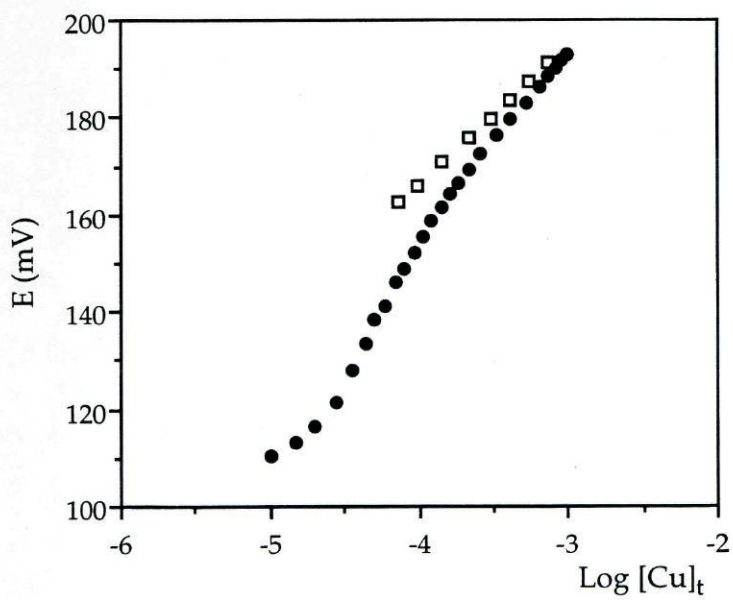


Figura 3.1.1. Curva de titulação, por PESC, (●) de AF 50 mg/L em perclorato de sódio 0,5 mol/L com cobre a pH 6,5 e à temperatura de 20 °C e respectiva curva de calibração (□): E (mV) = (28,6 ± 0,4) log $[Cu]_t$ + (280 ± 1); R = 0,99992, P = 0,05, n = 8. Os resultados apresentados são a média da resposta de dois eléctrodos colocados na mesma solução e constituem um exemplo típico de uma de cinco experiências efectuadas.

Tabela 3.1.2. Parâmetros de complexação obtidos, por PESC, para complexos de cobre com AF a pH 6,5.[a]

	CC[b,c]	$[C_1]_t$[d]	$[C_2]_t$[d]	$\log K'_1$[e]	$\log K'_2$[e]
		(x 10^5 mol/L)			
$[AF]_t$ mg/L[f]	25°C	20°C/25°C	20°C/25°C	20°C/25°C	20°C/25°C
10	2,4	---/---	---/---	4,9/---	3,8/---
(0,018-0,90)	(0,6)			(0,2)	(0,8)
50	10	3/---	9/---	5,5/---	3,92/---
(0,098-4,5)	(1)	(2)	(3)	(0,2)	(0,04)
100	19,1	5/4	15/17	5,77/5,5	4,2/4,2
(0,18-18)	(0,8)	(1)/(3)	(2)/(3)	(0,09)/(0,2)	(0,1)/(0,1)
150	27,6	---/8	---/20	---/5,7	---/4,3
(0,27-18)	(0,4)	(3)	(3)	(0,2)	(0,2)

a - Entre parênteses, apresentam-se os limites de confiança (P = 0,05); *b* - Obtidas a partir da curva $[Cu]_{lig} = f([Cu]_t)$[14]; *c* - Para $[AF]_t$ de 1 e 5 mg/L, os valores de CC foram 0,5 (0,2) e 2,1 (0,6) x 10^{-5} mol/L, respectivamente; *d* - Obtidos a partir do método de Ruzic [18]; *e* - Obtidos a partir do método de Scatchard[19]; *f* - Entre parênteses, são dados os limites das razões molares $[AF]_t/[Cu]_t$ usadas nos cálculos.

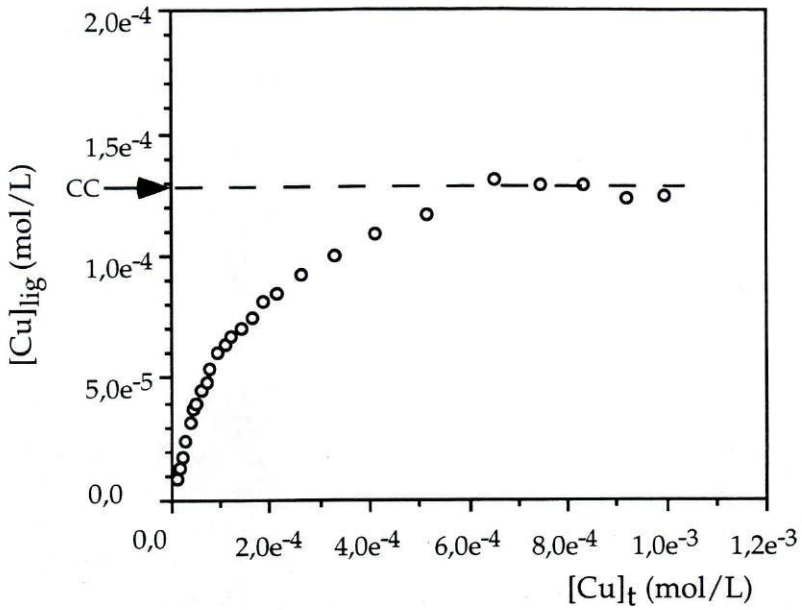


Figura 3.1.2. Variação de $[Cu]_{lig}$ ao longo de uma titulação de AF 50 mg/L com cobre(II) (I = 0,5 mol/L, perclorato de sódio pH 6,5, t= 20 °C). Valores calculados a partir dos dados apresentados na Figura 3.1.1.

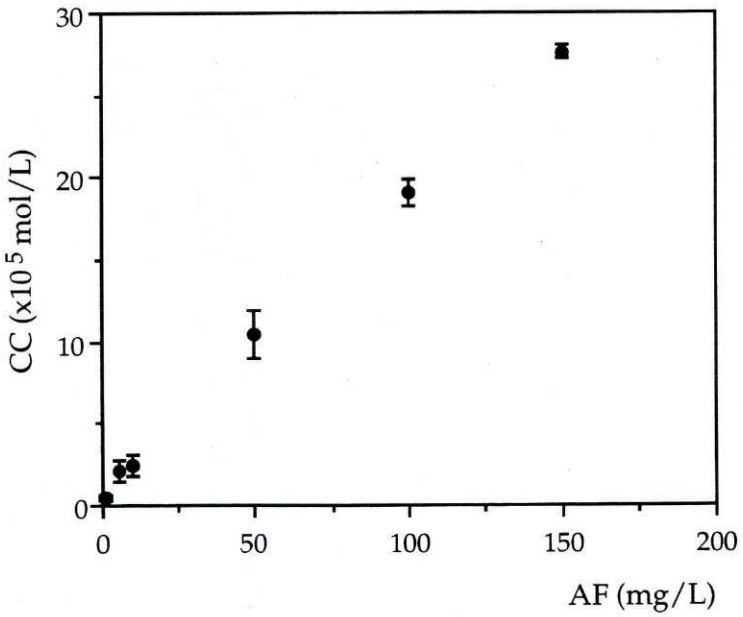


Figura 3.1.3. Valores médios da CC e limites de confiança respectivos (P = 0,05, n = 5) para diferentes concentrações de AF. Parâmetros de regressão linear: [CC]=(1,81 ± 0,01) x 10^{-6}[AF] + (0,8 ± 0,8) x 10^{-6}; R = 0,998, P = 0,05, n = 6.

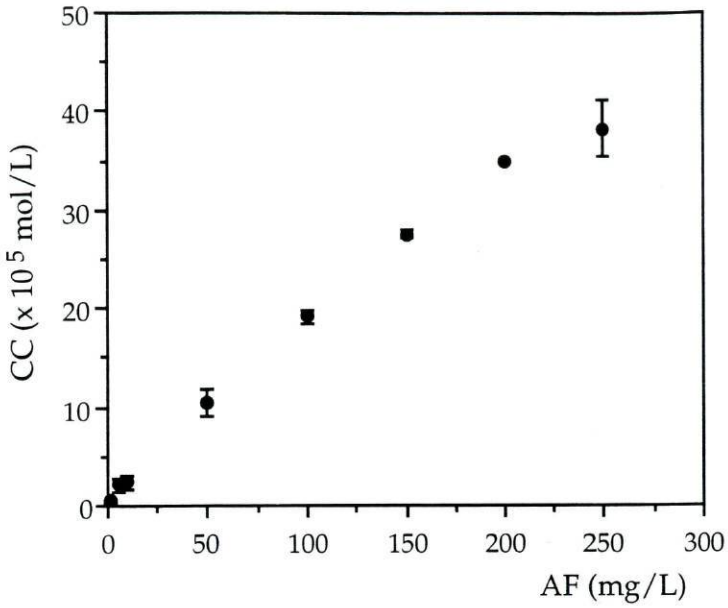


Figura 3.1.4. Variação dos valores médios da CC para diferentes concentrações de AF. Incluem-se os limites de confiança respectivos (P = 0,05, n ≥ 3).

Os dados experimentais obtidos nas titulações foram também tratados pelos métodos de Ruzic[18,20] (Figura 3.1.5 A) e de Scatchard[19] (Figura 3.1.5.B) (ver secção 2.3.3). As referidas figuras ilustram que os dados se ajustavam razoavelmente a estes modelos, sendo possível diferenciar dois segmentos de recta com declives diferentes.

A partir da representação de Ruzic[18], determinaram-se as CC correspondentes aos dois tipos macroscópicos de coordenação (C_1 e C_2) e as constantes de estabilidade condicionais respectivas (K_1' e K_2') (ver secção 2.3.3). Valores mais precisos de K_1' e K_2' foram obtidos pelo método de Scatchard[19] (ver secção 2.3.3). Por exemplo, para a concentração de AF de 50 mg/L, a 20 °C, obtiveram-se os seguintes valores para log K_1': 5,8 ± 0,7 (Ruzic[18]) e 5,5 ± 0,2 (Scatchard[19]); para log K_2': 3,9 ± 0,1 (Ruzic[18]) e 3,92 ± 0,04 (Scatchard[19]).

Para concentrações baixas de AF, entre 1 e 5 mg/L, observou-se uma grande dispersão dos resultados, não tendo sido possível aplicar os métodos de Ruzic[18] ou de Scatchard[19]. A baixa precisão dos valores de concentração de cobre(II) livre, resultou da zona de operação ser próxima do limite inferior de resposta linear dos eléctrodos e da

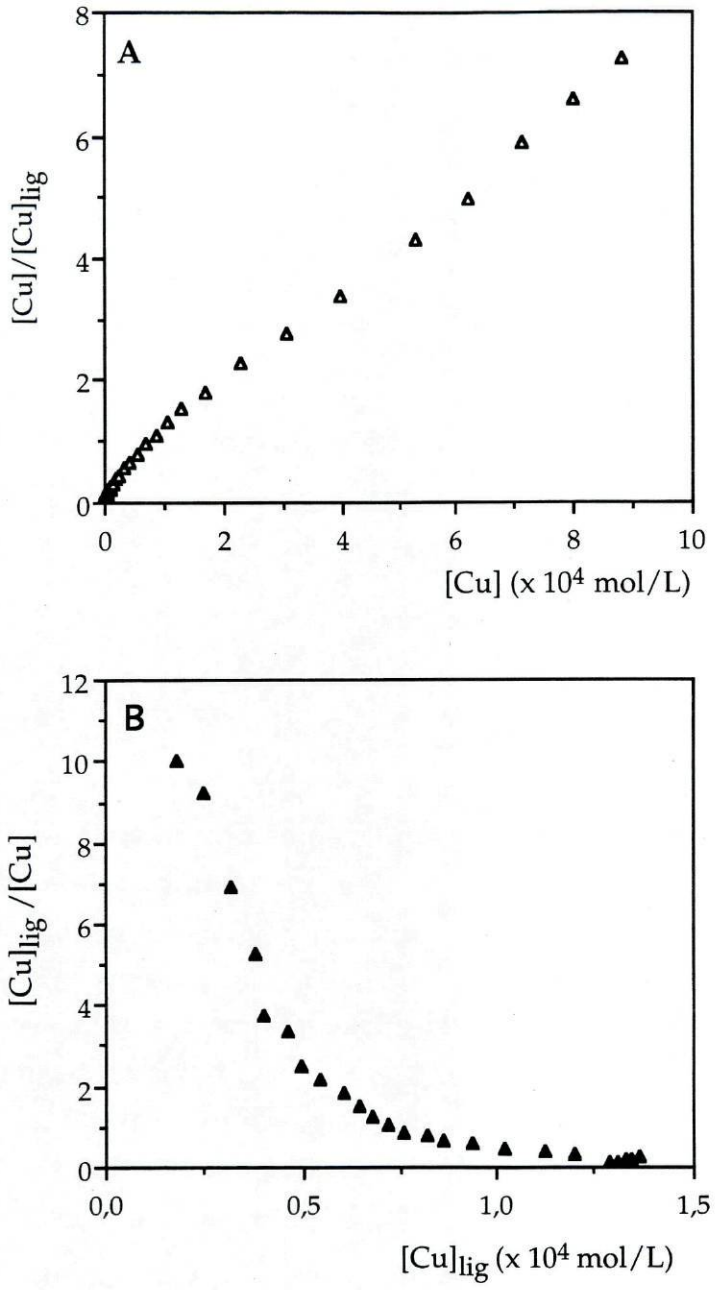


Figura 3.1.5. Resultados típicos obtidos com os modelos de Ruzic (A) e de Scatchard (B) para a titulação, por PESC, de uma solução de AF 50 mg/L a 20 °C.

capacidade tampão dos AF ser fraca a estes níveis de concentração. Para as restantes concentrações de AF, o método de Scatchard[19] foi aplicado tendo-se obtido dois segmentos de recta, com coeficientes de regressão linear iguais ou superiores a 0,94 para um número experimental de

pontos entre 25 e 39 (ver exemplo típico na Figura 3.1.5). A aplicação do método de Ruzic[18] conduziu a resultados semelhantes. Os valores médios e os limites de confiança respectivos para um grau de probabilidade de 95% de CC, $[C_1]_t$, $[C_2]_t$, K_1' e K_2' obtidos para concentrações de AF entre 10 e 150 mg/L são apresentados na Tabela 3.1.2. A Tabela mostra que os valores da CC obtidos por ambos os métodos ($CC = [C_1]_t + [C_2]_t$) foram praticamente coincidentes.

A partir das curvas de titulação efectuadas para soluções 100 mg/L em AF, nas quais foi varrido um intervalo de razões molares $[AF]_t/[Cu]_t$ entre 18 e 0,18, obtiveram-se os parâmetros complexométricos seguintes: $\log K_1' = 5{,}77 \pm 0{,}09$, $[C_1]_t = (5 \pm 1) \times 10^{-5}$ mol/L (ou 0,5 ± 0,1 mmol/g AF) e $\log K_2' = 4{,}2 \pm 0{,}1$, $[C_2]_t = (15 \pm 2) \times 10^{-5}$ mol/L (ou 1,5 ± 0,2 mmol/g AF) (entre parênteses, encontram-se os limites de confiança para um grau de probabilidade de 95%; 20 ^{0}C); e $\log K_1' = 5{,}5 \pm 0{,}2$, $[C_1]_t = (4 \pm 3) \times 10^{-5}$ mol/L (ou 0,4 ± 0,3 mmol/g AF) e $\log K_2' = 4{,}2 \pm 0{,}1$, $[C_2]_t = (17 \pm 3) \times 10^{-5}$ mol/L (ou 1,7 ± 0,3 mmol/g AF) (25 ^{0}C). Os valores médios das constantes de estabilidade condicionais obtidos a 25 °C foram semelhantes aos descritos na literatura[15,21] para complexos de cobre com AF de solos de origens diferentes.

A Tabela 3.1.2. mostra que os valores de $\log K_1'$ e de $\log K_2'$ aumentaram com a concentração de AF, ou mais precisamente com os valores de $[AF]_t/[Cu]_t$ abrangidos na curva de titulação, como seria de esperar e tem sido observado noutros estudos[22]. Como se trata de um ligando polimérico que inclui um número elevado de locais de coordenação, a cada um dos quais está associado uma constante de estabilidade microscópica, quanto maior for a razão $[AF]_t/[Cu]_t$, menor será o grau de ocupação e portanto maior serão os valores das constantes de estabilidade microscópicas, e, consequentemente os valores de K_1' e K_2'.

A Tabela 3.1.2 evidência também que a variação de $\log K_1'$ e $\log K_2'$ com a temperatura foi pouco significativa.

3.1.3.2 Determinações por PRA

Escolha do potencial de deposição

A labilidade/inércia de complexos de iões metálicos depende do método e das condições experimentais usadas na sua determinação. No caso da PRA, o potencial de deposição influência a fracção lábil de um complexo (ver secção 3.2.1.)[23,24]. Com o objectivo de definir as condições experimentais de forma a obter elevada sensibilidade e o mínimo de labilidade do complexo cobre-AF, procedeu-se ao varrimento do potencial de deposição desde valores de potencial relativamente pouco negativos (-0,35 V) até valores bastante mais negativos (-1,0 V), numa solução preparada em água do mar sintética contendo 3,15 µmol/L de cobre e noutra semelhante mas contendo além do metal, na mesma concentração, também 100 mg/L de AF. Como mostra a Figura 3.1.6, para a solução contendo apenas cobre(II), a redução do metal começou a ocorrer a $E_d \cong$ -0,35 V, tendo a sensibilidade aumentado

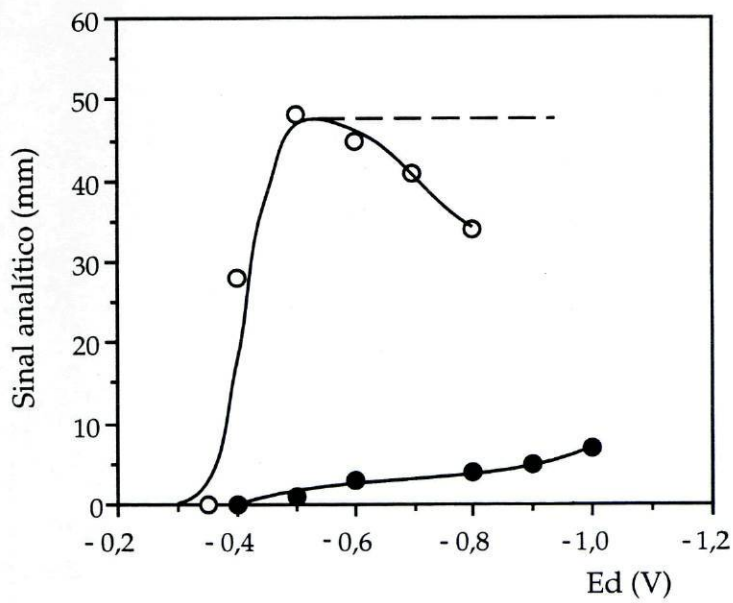


Figura 3.1.6. Variação do sinal analítico em função do potencial de deposição aplicado. Soluções de (○) 3,15 µmol/L de cobre(II) e de (●) 3,15 µmol/L de cobre(II) e 100 mg/L de AF em água do mar sintética para t_d = 1 min.

acentuadamente à medida que o E_d se tornava mais negativo, atingindo um valor máximo para $E_d \cong$ -0,5 V. Para valores de E_d superiores, verificou-se uma diminuição da sensibilidade relativamente ao previsto teoricamente (linha a tracejado na Figura 3.1.6.). Esta diminuição do sinal deveu-se possivelmente à formação de compostos intermetálicos de cobre-estanho[25]. Para uma solução que continha 3,15 µmol/L de cobre e 100 mg/L de AF, o sinal analítico só se tornou importante, nas condições experimentais usadas, para valores de potencial de -0,6 V ou superiores.

Em face dos resultados obtidos, escolheu-se para os estudos de labilidade subsequentes o potencial de deposição de -0,5 V, que correspondeu ao máximo de sensibilidade para o metal livre.

Estabelecimento do equilíbrio químico dos complexos cobre-AF

Atendendo a que aquando da adição de cobre, uma parte significativa dos AF pode encontrar-se complexada com metais alcalino-terrosos e outros metais pesados presentes na água do mar

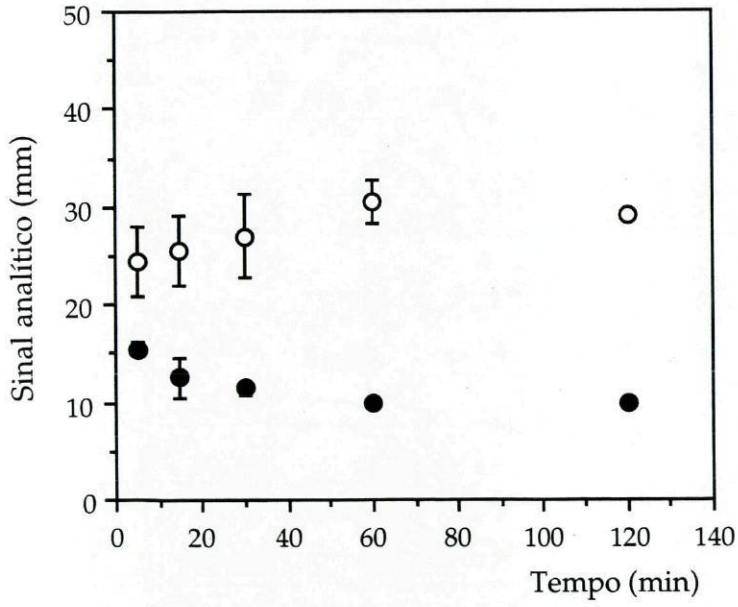


Figura 3.1.7. Variação do sinal analítico da PRA em função do tempo de pré-equilíbrio das soluções contendo 3,15 µmol/L de cobre e 10 (○) ou 50 (●) mg/L de AF. Os valores médios são acompanhados do desvio padrão (n = 3).

sintética, imponha-se, em primeiro lugar, estudar o tempo mínimo necessário para se estabelecer o equilíbrio de complexação entre o cobre(II) e os AF. Para tal, prepararam-se várias soluções contendo 3,15 μmol/L de cobre e 10 ou 50 mg/L de AF em água do mar sintética. As soluções foram analisadas após períodos de tempo variáveis entre 5 minutos e 2 horas contados a partir da respectiva preparação (Figura 3.1.7.). Para ambas as concentrações de AF, os resultados obtidos ao fim de uma e duas horas foram praticamente coincidentes, o que permitiu concluir que uma hora seria suficiente para o sistema atingir o equilíbrio. No entanto, por precaução, nos estudos subsequentes as soluções foram deixadas a equilibrar durante 2 horas.

Verificação da ocorrência de fenómenos de adsorção

Estudou-se ainda se os AF adsorviam à superfície do eléctrodo de filme de mercúrio. Para isso, seleccionaram-se previamente concentrações de cobre(II) e de AF de forma a que a $[Cu]_{lig}$ fosse muito pequena. Concretamente, os estudos foram realizados com soluções de perclorato de sódio 0,5 mol/L tamponado com PIPES a pH 6,5, na ausência de AF e contendo 1 mg/L de AF e concentrações de cobre(II) entre 3,15 e 6,30 μmol/L. Nestas condições, as percentagens de $[Cu]_{lig}$, calculadas através de um programa de especiação variaram entre 11 e 7,8 % para concentrações de cobre(II) entre 3,15 e 6,30 μmol/L, respectivamente, o que correspondeu a um valor de $[Cu]_{lig}$ muito pequeno da mesma ordem de grandeza do limite de detecção da técnica (0,35 μmol/L), nas condições experimentais usadas.

Os resultados, apresentados na Figura 3.1.8, mostram que os sinais analíticos na presença e ausência de AF foram coincidentes. A obtenção de sinais analíticos nas soluções com AF inferiores aos obtidos com soluções contendo apenas o metal poderia indicar qualquer dos seguintes fenómenos: (i) os complexos de cobre(II)-AF não eram lábeis; (ii) os coeficientes de difusão dos complexos formados eram inferiores ao do metal livre; (iii) fenómenos de adsorção dos AF à superfície do eléctrodo. Neste caso, dado que a complexação era desprezável, diferenças no sinal analítico na presença e na ausência de

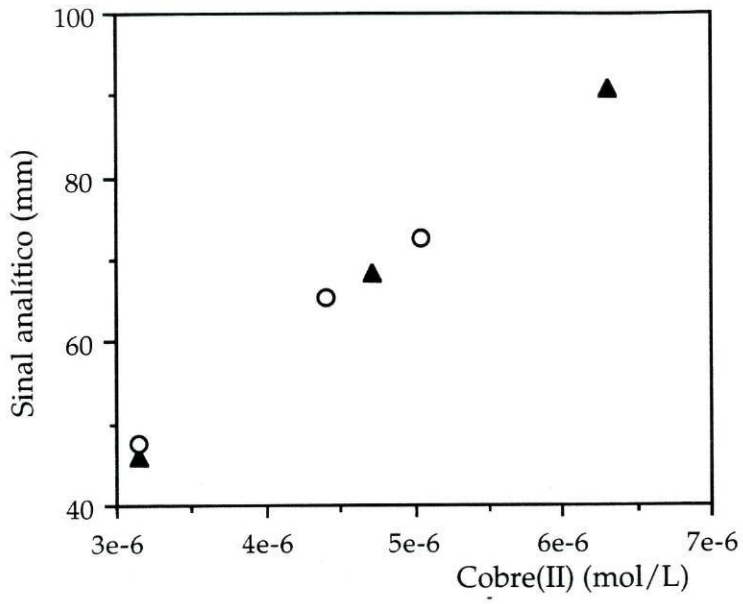


Figura 3.1.8. Variação do sinal analítico em soluções contendo cobre(II) (O) e 1 mg/L de AF (▲).

AF indicaria interferências provocadas por fenómenos de adsorção de AF ao eléctrodo. Tais interferências não foram observadas. De salientar que todas as experiências foram efectuadas com o mesmo filme de mercúrio, isto é, a superfície do eléctrodo não era renovada, o que teria agravado os fenómenos de adsorção, caso tivessem ocorrido. Os resultados mostram, ainda, que os coeficientes de difusão dos complexos formados eram iguais ao do metal livre.

Estudos de labilidade

O estudo foi efectuado em soluções contendo proporções variáveis entre cobre e AF de modo a cobrir um intervalo alargado de razões $[AF]_t/[Cu]_t$ (ver Tabela 3.1.3.).

Determinações em perclorato de sódio 0,5 mol/L a pH 6,5. A água do mar sintética utilizada neste trabalho[7] tem uma composição muito complexa no que se refere quer a catiões metálicos quer a aniões/ligandos. Além disso, as constantes de estabilidade de complexos de AF com alguns dos metais presentes na solução não são

conhecidas, o que impossibilita a utilização de simulações computacionais baseadas em equilíbrios químicos, para estimar a quantidade de cobre ligada ao AF. Por estas razões e atendendo a que a força iónica do meio influência as constantes de estabilidade dos complexos e o ião cloreto interfere nas determinações de PESC, começou-se por usar, um meio simplificado com uma força iónica similar à da água do mar sintética (perclorato de sódio 0,5 mol/L). Além disso, teve que se utilizar um valor de pH inferior ao da água do mar, porque nas titulações de AF com cobre por PESC não se podia ultrapassar pH 6,5 para evitar a formação de hidroxocomplexos de cobre(II).

Para as condições de pH acima referidas, as concentrações de cobre inorgânico, livre e na forma de hidroxocomplexos ($[CuHO]^+$, $Cu(HO)_2$, $[Cu_2(HO)_2]^{2+}$, $[Cu(HO)_3]^-$ e $[Cu(HO)_4]^{2-}$), e de cobre ligado aos AF foram calculadas através dum programa de especiação[26] (ver secção 2.3.6). Para isso, recorreu-se a constantes de estabilidade estequiométricas dos hidroxocomplexos de cobre(II) obtidas na literatura[27,28] e às constantes de estabilidade condicionais dos complexos de cobre com AF obtidos por PESC (ver um exemplo de uma matriz de dados e de resultados no apêndice 3). Estas últimas foram calculadas num intervalo de razões $[AF]_t/[Cu]_t$ entre 0,18 e 18 (curva de titulação obtida com 100 mg/L de AF). A simulação computacional envolveu algumas aproximações: (i) no modelo de cálculo usado (ver secção 2.3.3.) na determinação das constantes de estabilidade condicionais de cobre com AF considerou-se simplesmente a formação de complexos 1:1 em cada um dos locais de coordenação; (ii) distinguiram-se apenas dois grupos de coordenação e para cada um deles calculou-se apenas um K' médio; (iii) as constantes de estabilidade dos hidroxocomplexos de cobre utilizadas não foram obtidas exactamente nas mesmas condições experimentais usadas no presente trabalho. Por estas razões, os valores de $[Cu]_{lig}$ calculados a partir da simulação computacional constituem apenas valores aproximados.

Experimentalmente, mediu-se, por PRA, a concentração de cobre lábil em soluções com razões $[AF]_t/[Cu]_t$ num intervalo alargado.

Tabela 3.1.3. Labilidade dos complexos de cobre, determinada por PRA, com AF a pH 6,5 e a 20°C.

[AF] (mg/L)	$[Cu]_t$ (x10^7 mol/L)	Razão Molar $[AF]_t/[Cu]_t$	Razão Molar $[AF]_1{}^a/[Cu]_t$	0,5 mol/L $NaClO_4$ $[Cu]_{lig}{}^b$/COT (mmol/g)	0,5 mol/L $NaClO_4$ Cal$[Cu]_{lig}\%{}^{b,c,d}$	0,5 mol/L $NaClO_4$ Exp$[Cu]_{lig}\%{}^{c,e}$	0,5 mol/L $NaClO_4$ Lab%^{f}	Água do mar sintética Exp$[Cu]_{lig}(\%)^{c,e}$
150	31,5	89,0	26,8	0,06	98(92)	90	8,0	82
100	31,5	61,8	14,8	0,09	96(88)	79	18	75
50	31,5	39,2	10,7	0,17	95(88)	68	28	*g*
10	7,87	29,6	7,5	0,18	77(70)	40	48	65
10	18,9	12,3	3,1	0,41	74(67)	28	62	38
10	31,5	7,4	1,9	0,65	71(63)	29	59	33
10	39,4	5,9	1,5	0,79	69(61)	25	64	32
10	63,0	3,7	0,9	1,2	63(53)	30	52	35
10	110	2,2	0,5	1,7	52(40)	30	42	14
10	142	1,6	0,4	1,9	47(33)	21	57	11

a - $[AF]_1 = [C_1]_t$;
b - $[Cu]_{lig}$ calculada através de um programa de especiação;
c - Percentagem de $[Cu]_t$; *d* - a $[Cu]_{lig}$ apenas referente a AF_1 encontra-se entre parênteses;
e - Média de 2 a 4 experiências;
f - Labilidade = ($[Cu]_{lig}$ calculado - $[Cu]_{lig}$ experimental)/ $[Cu]_{lig}$ calculado;
g - Não foram realizadas as experiências.

A composição das soluções e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.1.3. (ver também a Figura 3.1.9). A Tabela mostra que para o valor da razão $[Cu]_{lig}$ /massa COT mais pequena (0,06 mmol/g), a labilidade dos complexos de cobre com AF foi muito reduzida (as percentagens de $[Cu]_{lig}$ calculado (98%) e experimental (90%) foram relativamente próximas). Estes resultados são compreensíveis uma vez que apenas os locais de coordenação mais fortes deverão ter sido ocupados, atendendo a que a CC dos AF era 89 vezes maior do que a concentração de cobre presente na solução. Efectivamente, a Tabela 3.1.3. mostra que a maior parte do cobre se encontrava ligado aos locais de coordenação mais fortes (AF_1, cuja capacidade de complexação era $[C_1]_t$): a diferença entre o total de $[Cu]_{lig}$ e o $[Cu]_{lig}$ a $[C_1]_t$ foi de apenas 6%. Como, em geral, a velocidade de dissociação dos complexos varia inversamente com a respectiva constante de formação, quanto maior for a constante microscópica de formação mais inerte será a ligação[6].

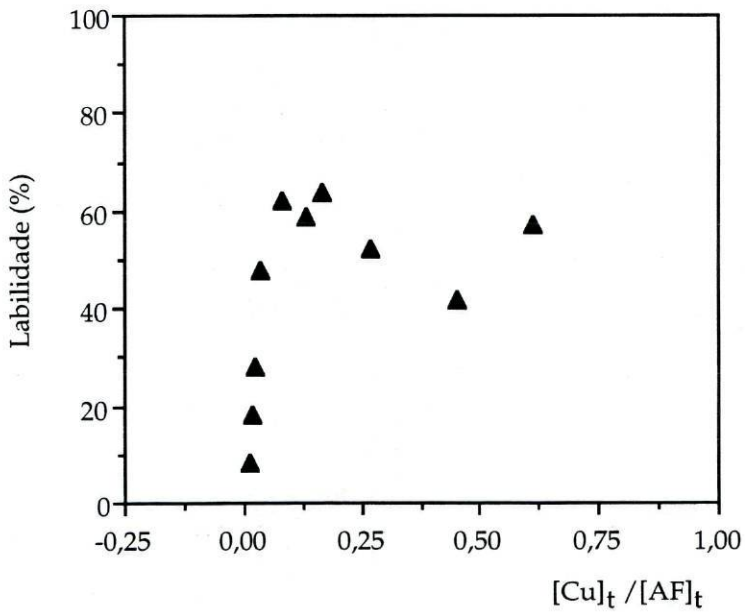


Figura 3.1.9. Variação da labilidade dos complexos de cobre com AF com a razão molar $[Cu]_t$ /$[AF]_t$. As determinações foram efectuadas por PRA a um potencial de deposição de - 0,5 V *vs*. ESC em meio de perclorato de sódio 0,5 mol/L, a pH 6,5.

À medida que o excesso de ligando foi diminuindo, a labilidade aumentou até atingir valores entre 62 e 64%, que ocorreram para razões de $[Cu]_{lig}$/massa COT entre 0,4 e 0,8 mmol/g. Para valores mais elevados desta razão observou-se uma ligeira diminuição da labilidade: cerca de 50 % para 1,9 mmol/g. Para valores > 2 mmol/g, o comportamento cinético dos complexos de cobre com AF não pode ser investigado por falta de sensibilidade do método analítico. Com efeito, uma vez que a CC do AF era de 5,2 mmol/g COT e os complexos de cobre com AF são relativamente fracos, para obter $[Cu]_{lig}$ /massa COT > 2 mmol/g seria necessário um largo excesso de cobre na solução. Nestas condições, o sinal analítico do cobre labél seria praticamente coincidente com o do $[Cu]_t$ e, consequentemente, o valor de $[Cu]_{lig}$ demasiado pequeno para poder ser determinado indirectamente.

São muito escassos na literatura resultados experimentais sobre labilidades de complexos de cobre com AF. No entanto, os presentes resultados corroboram a opinião de Buffle *et al.*[22] de que as constantes de dissociação dos complexos formados com ligandos heterogéneos, como é o caso dos AF, dependem da razão das concentrações $[AF]_t/[Cu]_t$, como consequência da variação das constantes de estabilidades microscópicas com a razão $[Cu]_{lig}$/massa COT, conforme se discutiu acima.

Fillela *et al.*[4] estabeleceram os limites dos intervalos de valores de $[Cu]_{lig}$/massa COT para os quais o comportamento voltamétrico dos complexos de cobre(II) com AF, a pH 8, seriam totalmente inertes (valores < 0, 3 mmol/g COT) e totalmente lábil (valores > 3 mmol/g COT). Estes autores[4] admitiram também que para valores mais baixos de pH, o limite inferior da zona de $[Cu]_{lig}$/massa COT para a qual os complexos seriam totalmente lábeis poderia estender-se a valores mais baixos. Tal previsão resulta de as velocidades de dissociação dos complexos, em geral, variarem inversamente com as constantes de estabilidade respectivas e para as substâncias húmicas um abaixamento do pH ser acompanhado da diminuição das constantes de estabilidade dos complexos[5,6].

O presente estudo não permitiu definir os limites dos intervalos de valores de $[Cu]_{lig}$ /massa COT para os quais os complexos de cobre-AF apresentavam labilidade ou inércia total. No entanto, em concordância com informações da literatura[4,22], os resultados deste trabalho mostraram que a inércia dos complexos de cobre(II) com AF diminui acentuadamente quando a razão $[Cu]_{lig}$/massa COT aumenta entre 0,06 (8% de labilidade) e 0,8 mmol/g (64% de labilidade). No entanto, para razões > 0,8 mmol/g não se verificou um aumento sistemático. Pelo contrário, verificou-se um ligeiro decréscimo.

Gregor e Powell[29] observaram, por voltametria de redissolução anódica com varrimento linear a E_d = -0,6 V *vs.* Ag/AgCl e pH 4,8, percentagens de labilidade entre 50 e 70% para complexos de cobre(II) com vários AF extraídos de turfa e de solos. As concentrações de cobre(II) total e de AF utilizados foram de 0,12 µmol/L e *ca.* 1,2 mg/L, respectivamente. A razão $[Cu]_t/[AF]_t$, expressa em mmol/g, usada por estes autores foi de ≅ 0,1. Fazendo a correspondência deste valor para o presente trabalho, esta razão corresponde ao intervalo das razões molares $[AF]_t/[Cu]_t$ entre 29,6 e 12,3, onde as percentagens de labilidade obtidas oscilaram entre 48 e 62%, portanto próximas das obtidas por Gregor e Powell[29].

Estudos cinéticos recentes[6], sobre um sistema cobre(II)-AH, efectuado por espectrofotometria do visível, após derivatização com 4-(2-piridilazoresorcinol) mostraram também que a velocidade de dissociação dos complexos aumentava com a razão $[Cu]_t/[AH]_t$ no intervalo 0,079 e 0,315 mmol/g.

Determinações em água do mar sintética. Repetiram-se as medições experimentais mas em água do mar sintética a pH = 6,5. A Tabela 3.1.3 mostra que os valores de $[Cu]_{lig}$ obtidos não diferiram muito dos obtidos em perclorato de sódio 0,5 mol/L. Este resultado sugere que o comportamento cinético dos complexos de cobre(II) com AF no meio de água do mar sintética não deverá ser muito diferente do observado no meio simples com força iónica semelhante.

As concentrações de cobre(II) e de AF presentes na água do mar natural podem variar mais de uma década de um local para outro, segundo dados da literatura[9]. Sendo assim, e uma vez que a labilidade depende das razões $[AF]_t/[Cu]_t$, é difícil fazer previsões acerca do comportamento cinético dos complexos de cobre com AF em águas marinhas com base nos presentes resultados. No entanto, em casos particulares, designadamente na costa noroeste de Portugal, próximo da cidade do Porto, onde foram quantificadas concentrações de cobre dissolvido e de AF entre 7,7 e 130 nmol/L[30] e 0,1 mg/L[31], respectivamente, pode-se fazer uma previsão da labilidade admitindo que a CC dos AF marinhos isolados era semelhante à dos usados nos estudos realizados neste trabalho (CC = 1,8 mmol/g). Nestas condições, as razões molares $[AF]_t/[Cu]_t$ oscilariam entre 23 e 1,4 sendo de prever que os complexos apresentassem um comportamento semi-lábil a pH próximo da neutralidade.

Influência do pH. Como foi referido anteriormente, as experiências foram efectuadas a pH 6,5 de modo a minimizar a formação de hidroxocomplexos de cobre. Este problema era particularmente importante nas determinações por PESC, devido ao limite de detecção relativamente elevado da técnica que obriga a utilizar concentrações de $[Cu]_t$ muito mais elevadas do que as necessárias por PRA. No entanto, como o pH da água do mar natural é mais elevado, tinha interesse avaliar a influência do pH na labilidade dos complexos em estudo. Por essa razão, as experiências efectuadas em água do mar sintética foram repetidas a pH 7,5 (ver Figura 3.1.10). Este valor de pH é ainda inferior ao das águas marinhas, mas não foi possível utilizar um valor mais elevado por falta de poder tampão do PIPES.

A Figura 3.1.10 mostra que a fracção de cobre lábil foi praticamente constante para valores de pH 6,5 e 7,5.

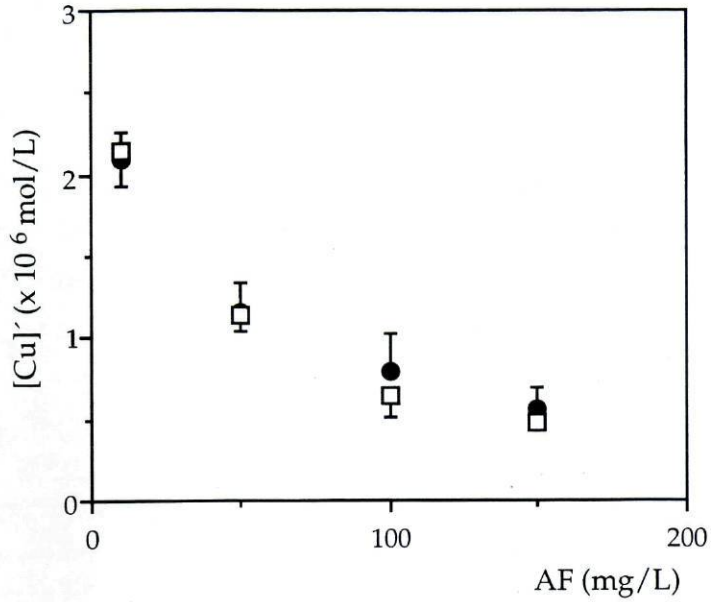


Figura 3.1.10. Influência do pH no valor da concentração de cobre lábil ([Cu]´) determinado em água do mar sintética a $[Cu]_t$ = 3,15 µmol/L: (●) pH 6,5; (□) pH 7,5. São apresentados os valores médios de quatro determinações e os respectivos intervalos de confiança (P = 0,05).

3.1.4 CONCLUSÕES

Este estudo constituiu evidência experimental de que a labilidade dos complexos de cobre-AF dependia das razões molares de $[AF]_t/[Cu]_t$. Para uma razão de 89, a inércia medida por PRA foi quase total. A labilidade aumentou significativamente até razões de $[AF]_t/[Cu]_t$ de 6, tendo-se verificado um ligeiro decréscimo para razões inferiores até 1,6. Os resultados obtidos em água do mar sintética sugerem que o comportamento cinético dos complexos cobre-AF avaliado por PRA deverá ser semelhante ao obtido em meio de perclorato de sódio com força iónica semelhante. A partir destes resultados e para os níveis de concentração de cobre dissolvido (entre 7,7 e 130 nmol/L[30]) e de AF (0,1 mg/L[31]) encontradas na costa noroeste de Portugal, prevê-se que os complexos de cobre-AF apresentem um comportamento semi-lábil a pH próximo da neutralidade.

De referir, a finalizar que sendo a labilidade electroquímica um parâmetro operacional, conforme se discutirá no capítulo seguinte, os valores de labilidade obtidos neste estudo, em rigor, são apenas válidos nas condições experimentais usadas.

REFERÊNCIAS

1- J. Buffle, *em* "Metal ions in biological systems", vol. 18, H. Siegel, Ed., Marcel Dekker, New York, 1984, cap. 6.

2- J.C. G. Esteves da Siva, "Acid-base and metal ion complexation properties of humic substances studied by chemometric analysis of spectroscopic-potentiometric hyphenated data", Dissertação para doutoramento, Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 1994, cap. 1.1.

3- J.P. Pinheiro, A.M. Mota e M.L. Simões Gonçalves, *Anal. Chim. Acta*, **284**, 525 (1994).

4- M. Filella, J. Buffle e H. P. Van Leeuwen, *Anal. Chim. Acta*, **232**, 209 (1990).

5- J. Buffle, "Complexation Reaction in Aquatic Sytems: an Analytical Approach", Ellis Horwood, Chischester, 1988, cap. 6.

6- A.W. Rate, R.G. McLaren e R.S. Swift, *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 1408 (1993).

7- P. J. Harrison, R. E. Waters e F. J. R. Taylor, *J. Phycol.*, **16**, 28 (1980).

8- M.T.S.D. Vasconcelos, "Determinação potenciométrica (pH e pM) de constantes de formação de complexos", Dissertação para doutoramento, Departamento de Química da Faculdade de Ciências do Porto, Porto, 1983, cap. 3.1.

9- J. Buffle,*em* "The determination of trace metals in natural waters", T.S. West e H. W. Nürnberg, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, cap. 6.

10- T.M. Florence, *Analyst*, **111**, 489 (1986).

11-W. Davison, *J. Electroanal. Chem.*, **87**, 395 (1978) .

12- H.M.V.M. Soares, e M. T. S. D. Vasconcelos, *Anal. Chim. Acta*, **293**, 261 (1994) .

13- J.R. Tuschall e P.L. Brezonik, *em* "Aquatic and Terrestrial Humic Materials", R.F. Christman e E.T. Gjessing, Eds., Ann Arbor Science, Michigan, 1983, cap.13.

14- T. A. Neubecker e H.E. Allen, *Wat. Res.*, **17**, 1 (1983).

15- W. Lund, I. A. Helbak e H. M. Seip, *Sci. Total Environ.*, **92**, 269 (1990).

16- D. R. Turner, M.S.Varney, M. Whitfield, R. F. C. Mantoura e J. P. Riley, *Sci Total Environ.*, **60**, 17 (1987).

17- J. Buffle, F. L. Greter e W. Haerdi, *Anal. Chem.*, **49**, 216 (1977).

18- I. Ruzic, *Anal. Chim. Acta*, **140**, 99 (1982).

19- J. Buffle, "Complexation Reaction in Aquatic Sytems: an Analytical Approach", Ellis Horwood, Chischester, 1988, cap. 5.

20- I. Ruzic, *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 1132 (1987).

21- G.A. Bhat, R.A. Saar, R.B. Smart e J. H. Weber, *Anal. Chem.*, **53**, 2275 (1981).

22- J. Buffle, J.J. Vuilleumier, M.L. Tercier e N. Parthasarathy, *Sci. Total Environ.*, **60**, 75 (1987).

23- C.M.G. van den Berg, *Analyst*, **117**, 589 (1992).

24- T.M. Florence, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 4.

25- J. Wang, "Stripping analysis, principles, instrumentation and applications", VCH Publishers, Florida,1985, cap. 4.

26-J. C. Westall, "MICROQL, a chemical equilibrium program in BASIC", Internal Report, Institut for Water Resources and Water Pollution Control (EAWAG), Dubendorf, 1979.

27- W. Stumm e J. Morgan, "Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters", John Wiley and Sons, New York, 1981, cap. 6.

28- J. Bjerrum, G. Schwarzenbach e L.G. Sillén, "Stability constants of metal-ion complexes, with solubility products of inorganic substances, Part II: Inorganic ligands", The Chemical Society, London, 1958.

29- J. E. Gregor e H. K. J. Powell, *Anal. Chim. Acta*, **211**, 141 (1988).

30- O.M. Lage, A.M. Parente, H.M.V.M. Soares, M.T.S. Vasconcelos e R. Salema, *Eur. J. Phycol.*, **29**, 253 (1994).

31- A.A.S.C. Machado e J.C.G. Esteves da Silva, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, **19**, 155 (1993).

CAPÍTULO 3.2

Avaliação das Técnicas de Redissolução Anódica para Especiação de Cobre a Potenciais de Deposição Relativamente Elevados

3.2.1 INTRODUÇÃO

3.2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.3.1 Avaliação comparativa da PRA e da VRADI para determinação de cobre com deposição a -0,3 V

3.2.4 CONCLUSÕES

3.2.1 INTRODUÇÃO

A fracção de metal total que é reduzida, designada por metal lábil, depende das condições operacionais utilizadas, designadamente do potencial de deposição (nas técnicas de redissolução anódica), da velocidade de rotação do eléctrodo ou de agitação, a qual afecta a espessura da camada de difusão e duração do impulso, no caso de se tratar de uma técnica em que o varrimento é efectuado por impulsos[1-4]. Os conceitos de labilidade/inércia são, portanto, operacionais. Logo, em qualquer estudo de especiação, as condições experimentais a utilizar devem ser criteriosamente seleccionadas e devem ser, também detalhadamente referidas aquando da divulgação dos resultados.

Considere-se a electrodeposição de um complexo 1:1, formado por um catião metálico , M^n, e um ligando, L. A dissociação do complexo e subsequente redução de M^n no eléctrodo de trabalho pode ser representada do seguinte modo (os equilíbrios ácido-base e todas as cargas, exceptuando a do catião metálico, foram omitidas para simplificar):

$$ML \underset{k_f}{\overset{k_d}{\rightleftharpoons}} M^n + L \qquad [50]$$

em que

$$K = [ML]/([M^n]\,[L]) = k_f/k_d \qquad [51]$$

e

$$M^n + n\,e^- \rightarrow M^o \qquad [52]$$

em que k_f e k_d representam, respectivamente, as velocidades de formação e dissociação do complexo ML.

Admitindo que o complexo não é directamente redutível, no processo electrolítico o catião metálico pode participar em três etapas consecutivas seguintes: difusão, dissociação química e transferência de carga (Figura 3.2.1).

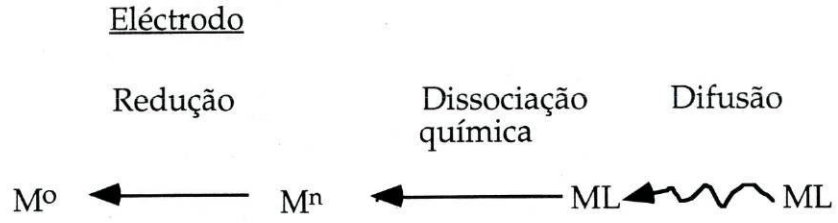


Figura 3.2 .1. Representação esquemática dos fenómenos que podem ocorrer à superfície do eléctrodo de trabalho para o complexo ML. Adaptado da referência[5].

Dependendo das velocidades relativas destes processos, podem, na prática, surgir uma multiplicidade de situações[6] em que a corrente farádica é afectada e, consequentemente, o quociente ip^p/ip^a, que é uma medida da fracção lábil do complexo. Considerando processos reversíveis, o quociente ip^p/ip^a é máximo, *i.e.*, igual a um, quando os complexos são totalmente lábeis (*i. e.*, quando a reacção $ML \rightleftharpoons M^n + L$ é suficientemente rápida para que o equilíbrio entre ML e M^n possa ocorrer a qualquer distância do eléctrodo apesar do consumo de M^n) e os complexos apresentam coeficientes de difusão idênticos ao do metal

livre. Por outro lado, quando o metal está maioritariamente na forma de complexos inertes (a dissociação de ML em M^n e L é tão lenta que a concentração do complexo se mantem inalterada na camada de difusão) e que não sejam directamente redutíveis, o quociente ip^p/ip^a é muito pequeno.

Nas técnicas de redissolução anódica, o fluxo de redução, $[M^n]^o/[M^o]^o$, resultante de um processo reversível de redução do metal livre pode ser dado pela equação seguinte:

$$[M^n]^o/[M^o]^o = \exp\{nF/[RT\,(E_d-E^o)]\} \qquad [53]$$

em que $[M^n]^o$, $[M^o]^o$, E_d e E^o representam, respectivamente, a concentração do catião metálico à superfície do eléctrodo, a concentração de metal reduzido no eléctrodo, o potencial de deposição e o potencial normal do par óxido-redutor[6]. A equação [53] mostra que o fluxo de redução (logo a sensibilidade) aumenta à medida que o potencial de deposição (ao qual se dá a redução) é mais negativo (ver Figura 3.1.6).

No caso de complexos que se dissociam lentamente (k_d pequenos), o equilíbrio entre M^n e ML não chega a ser restabelecido na vizinhança do eléctrodo. No entanto, poderá ocorrer um deslocamento da reacção [50] no sentido da dissociação de ML e portanto, do restabelecimento parcial da situação de equilíbrio numa zona mais distanciada do eléctrodo na camada de difusão[6]. Assim, quanto mais negativo for o potencial de deposição menor será o valor de $[M^n]_o$, e, consequentemente, mais extensa a dissociação do complexo, por efeito de acção de massa. Num estudo efectuado para águas marinhas, van den Berg[7] mostrou, por exemplo, que poderá ocorrer dissociação de complexos de cobre(II) com ligandos orgânicos para potenciais de deposição mais negativos do que -0,3 V. Por isso, em amostras naturais cuja composição química (logo a labilidade dos complexos) não seja conhecida, as electrólises devem ser realizadas a potenciais o menos negativos possível sempre que se pretenda minimizar a dissociação dos complexos de forma a medir a fracção mais lábil do metal. No entanto, a utilização de potenciais de deposição relativamente pouco negativos

para determinações de cobre em VRADI é problemática quando as amostras têm elevada concentração de cloretos. Este facto resulta da conjugação de dois factores: (i) desvio do potencial do pico para valores mais negativos, como resultado da complexação do cobre pelos cloretos na fase de redissolução anódica; (ii) um aumento da inclinação da linha de base como resultado da oxidação do mercúrio[8].

Dadas as limitações da VRADI referidas, considerou-se oportuno averiguar se a PRA era vantajosa para especiação de cobre em soluções com elevada concentração de cloretos a um potencial de deposição pouco negativo (-0,3 V). Este estudo constitui o objectivo deste capítulo.

Tendo-se passado a dispor de um equipamento que permitia fazer determinações quer por PRA quer por VRADI em condições experimentais semelhantes, foi possível usar em paralelo estas duas técnicas electroquímicas e comparar os respectivos desempenhos.

Os resultados apresentados neste capítulo encontram-se publicados[9].

3.2.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As determinações foram efectuadas a pH 6,5 em meio de nitrato de potássio 10 mmol/L) e a pH 7,5 em água do mar sintética (ver composição na Tabela 2.2.1), ambos os meios foram tamponados com PIPES 10 mmol/L.

As experiências foram realizadas, em paralelo, por PRA e VRADI, para um tempo de deposição (t_d) de 3 minutos e um potencial de deposição, E_d = -0,3 V *vs.* Ag/AgCl (s) KCl 3 mol/L. Nas experiências realizadas por PRA, usou-se 3,15 µmol/L de mercúrio(II) como agente oxidante (adição de 31,5 µL de uma solução 2,0 mmol/L de cloreto de mercúrio(II)).

Quando se utilizou como eléctrodo trabalho um ECFM, este foi preparado diariamente por electrólise de 20 mL de uma solução 20 µmol/L de cloreto de mercúrio(II). Para isso, foram realizados 3 ciclos

sequenciais deposição/redissolução a um potencial de deposição a -0,5 V e um último ciclo com um potencial de deposição de -0,05 V, todos com duração de 4 minutos.

Na Tabela 3.2.1, estão resumidas as condições experimentais utilizadas nas experiências.

Tabela 3.2.1. Condições experimentais usadas e limites de detecção (LD) obtidos nos estudos realizados por PRA e por VRADI.

Meio	Eléctrodo de trabalho	$[Cu]_t$ µmol/L	Potencial de deposição (V)	LD[a] µmol/L
PRA				
Água do mar sintética[b,c]	EMGS	0,315-2,83	-0,3	0,28
KNO_3 10 mmol/L[d]	EMGS	0,0787-0,630	-0,3	0,15
VRADI				
Água do mar sintética[b,c]	EMGS	0,315-0,630	-0,3	----
	ECFM	0,0787-0,157	-0,5	----
KNO_3 10 mmol/L[d]	EMGS	0,0787-0,630	-0,3	0,18
	ECFM	0,0157-0,173	-0,3	0,018

a - Calculado a partir dos parâmetros da curva de calibração[10]; *b* - Ver composição do meio na Tabela 2.2.1; *c* - 20 °C, pH = 7,5; *d* - 20 °C, pH = 6,5.

3.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.3.1 Avaliação comparativa da PRA e da VRADI para a determinação de cobre com deposição a -0,3 V

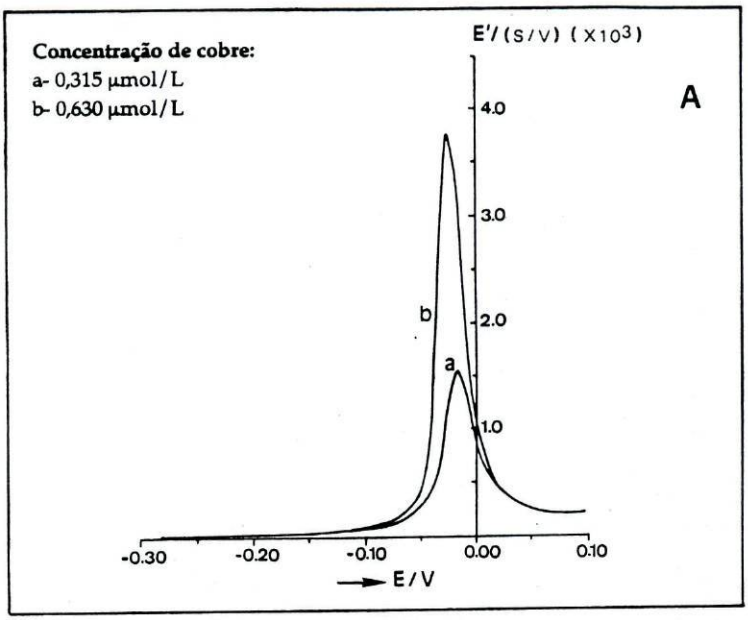
O presente estudo foi efectuado em água do mar sintética[11] e, para comparação, num meio de baixa força iónica (10 mmol/L nitrato de potássio) e sem agentes complexantes.

Potenciometria de Redissolução Anódica

Os resultados obtidos por PRA com um EMGS como eléctrodo de trabalho são apresentados nas Figuras 3.2.2A (meio de nitrato de potássio) e B (água do mar sintética). Uma análise comparativa destas figuras evidência a ocorrência de um desvio, no sentido dos potenciais mais negativos, do sinal analítico do cobre em água do mar em relação ao respectivo valor em nitrato de potássio. Este desvio deveu-se, fundamentalmente à complexação do metal pelo ião cloreto na fase de redissolução. De notar no entanto que, ao contrário do que seria de esperar, em ambos os meios se observou um ligeiro desvio do potencial do pico para valores mais negativos com o aumento da concentração de cobre. Este fenómeno deverá resultar do facto de a concentração de oxidante (mercúrio(II)) usada não ter sido suficientemente elevada para que a variação da sua concentração na solução devido à reacção com o cobre tivesse um efeito desprezável.

No caso do meio de nitrato de potássio, a curva de calibração foi obtida num intervalo de concentrações de cobre(II) entre 0,0787 e 0,630 µmol/L. A aplicação de regressão linear[10] à curva de calibração conduziu aos parâmetros seguintes (que incluem os limites de confiança para um intervalo de confiança de 95%[10]): $[(dt/dE)_{max}]$ (s/V) = (6,3 ± 0,8) x 10^9 [cobre, mol/L] + (-5 ± 3) x 10^2; coeficiente de correlação (R) = 0,995, n = 5. O limite de detecção calculado a partir da recta[10], foi de 0,15 µmol/L. Este valor é relativamente elevado, o que se deve ao facto do potencial de deposição ser relativamente pouco negativo. Dado que a sensibilidade da técnica é baixa ao E_d usado (ver equação [53]) o decréscimo do limite de detecção com o tempo de deposição é pouco significativo e torna o processo analítico muito moroso. Por estas razões o t_d não foi ampliado.

Nas determinações efectuadas em água do mar sintética (Figura 3.2.2B), os sinais obtidos por PRA foram registados no intervalo de concentrações de cobre(II) entre 0,315 e 2,83 µmol/L. Nas condições experimentais usadas, os pârametros de regressão linear calculados[10] foram os seguintes : $[(dt/dE)_{max}]$ (s/V) = (9 ± 5,) x 10^8 [cobre, mol/L] + (-2,5 ± 0,9) x 10^2; R = 0,999, P = 0,05, n = 5. O limite de detecção



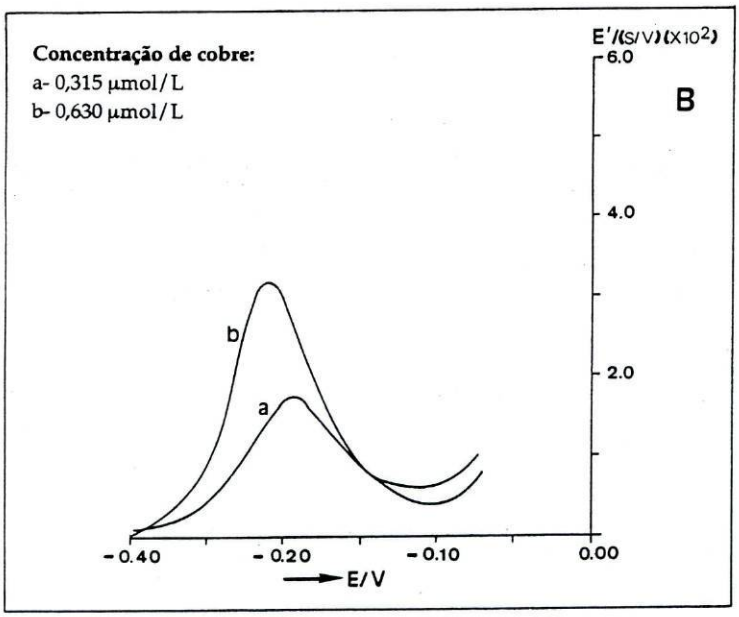


Figura 3.2.2. Potenciogramas (modo dPRA) de cobre em nitrato de potássio 10 mmol/L (A) e em água do mar sintética (B) a um E_d = -0,3 V *vs.* Ag/AgCl(s), KCl 3 mol/L e t_d = 3 min.

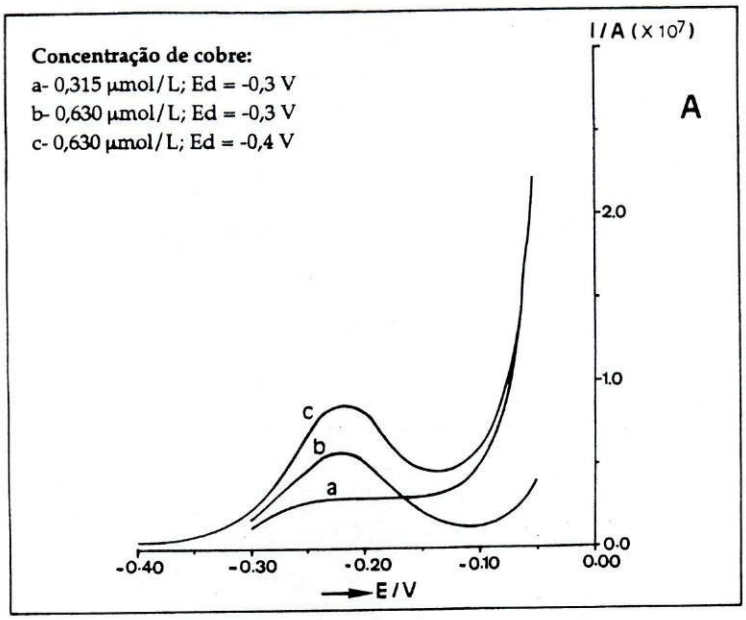
calculado[10] foi de 0,28 μmol/L, o que é relativamente alto. Pôs-se então a hipótese de tentar melhorar a eficiência do sistema, substituindo o EMGS por um ECFM. Porém, neste caso o E_p tem um valor mais negativo do que com EMGS, tal como sucede em VRA[12] (ver adiante), o que impediu as determinações a E_d = -0,3 V.

Voltametria de redissolução anódica diferencial com impulsos

No caso da VRADI utilizando um EMGS e Ed = -0,3 V, para o meio de salinidade elevada não foi possível a medição da concentração de cobre por ausência de sinal mensurável (Figura 3.2.3A). Para valores de concentração de cobre $\geq$ 0,630 μmol/L, observaram-se sinais analíticos mas a linha de base não estava perfeitamente definida o que tornava impossível a sua quantificação. Como já foi referido, esta situação resultou da ocorrência de desvios dos potenciais para valores mais negativos (complexação do catião metálico pelo anião cloreto) e da oxidação do mercúrio, a qual provoca um grande aumento do declive da linha de base para valores de potenciais superiores a -0,6 V[8]. A alteração do valor de E_d para -0,4 V já permitiu a definição da linha de base e, consequentemente, a quantificação do sinal analítico referente à solução 0,630 μmol/L em cobre(II) (ver linha c na Figura 3.2.3A).

A substituição de EMGS por ECFM aumentou a sensibilidade da técnica; porém, a impossibilidade de quantificar os sinais analíticos em meio salino para E_d = -0,3 V manteve-se porque os valores de E_p foram ainda mais negativos do que no caso do EMGS. Constatou-se, por exemplo, que para um valor de E_d = -0,5 V, soluções 0,0787 e 0,157 μmol/L em cobre(II) originavam $E_p \cong$ -0,4 V. Valores de E_p mais negativos para ECFM do que para EMGS têm sido também observados noutros estudos[12].

Para o meio de força iónica mais baixa e sem complexantes (10 mmol/L nitrato de potássio), foi possível realizar determinações de cobre a E_d = -0,3 V quer com o EMGS quer com o ECFM, porque a linha de base era, neste caso, bem definida (exemplo típico na Figura 3.2.3B).



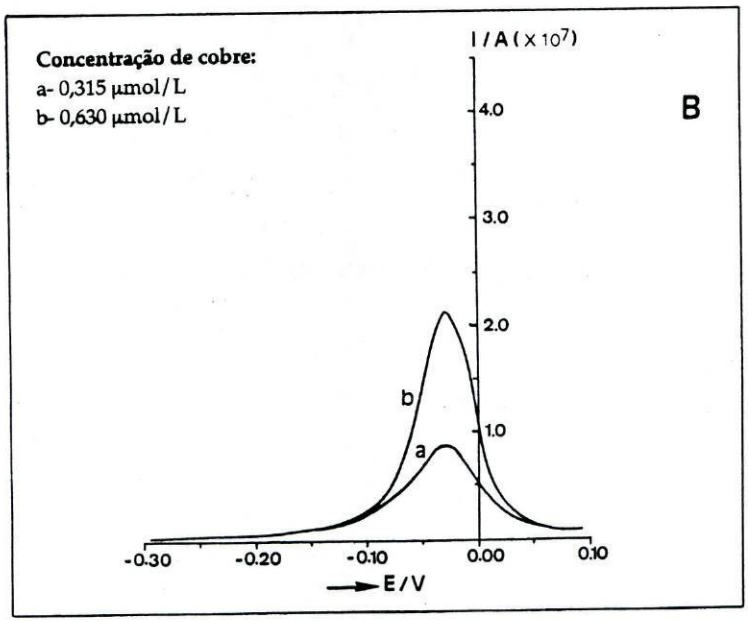


Figura 3.2.3. Voltamogramas de cobre em água do mar sintética (A) (ver Tabela 2.2.1) e em nitrato de potássio 10 mmol/L (B) para E_d = -0,3 V *vs.* Ag/AgCl(s), KCl 3 mol/L e t_d = 3 min.

Os pârametros de regressão linear calculados[10] foram os seguintes: i_p (A) = (0,35 ± 0,05) [cobre, mol/L] + (-2 ± 2) x 10^{-8}, R = 0,993, P= 0,05, n = 5, para o EMGS e i_p (A)=(0,34±0,02) [cobre, mol/L] + (2,0 ± 0,2) x 10^{-8}, R=0,9998, P = 0,05, n = 4, para o ECFM. Os limites de detecção calculados[10] foram, respectivamente, de 0,18 µmol/L e 0,018 µmol/L (isto é dez vezes menor para ECFM do que para EMGS).

3.2.4 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que, em meio com concentrações de cloretos elevadas, a PRA permite a determinação de cobre a E_d menos negativos do que a VRADI. Este facto resulta, basicamente, de em PRA não haver passagem de corrente durante a fase de redissolução. A PRA será, portanto, mais adequada do que a VRADI para estudos de especiação de cobre em meios de salinidade elevada sempre que se pretenda medir a fracção mais lábil do metal em estudo. No entanto, os limites de detecção elevados observados neste trabalho são incompatíveis com a aplicação da PRA a estudos de especiação em águas naturais, onde os níveis de cobre são, em geral, da ordem dos submicromolar ou nanomolar. Apesar de tudo, mesmo nas presentes condições experimentais, a PRA pode ser vantajosa para realizar especiação do metal em meios de cultura de microrganismos marinhos (ver capítulo 3.5), onde concentrações de cobre relativamente elevadas são frequentemente usadas em estudos de toxicidade[13,14], e em meios muito poluídos.

REFERÊNCIAS

1- T.M. Florence, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 4.

2- W. Davison, *J. Electroanal. Chem.*, **87**, 395 (1978).

3- D.R. Turner e M. Whitfield, *J. Electroanal. Chem.*, **103**, 43 (1979).

4- D.R. Turner e M. Whitfield, *J. Electroanal. Chem.*, **103**, 61 (1979).

5- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 10.

6- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 9.

7- C.M.G. van den Berg, *Analyst*, **117**, 589 (1992).

8- W. Lund e D. Onshus, *Anal. Chim. Acta*, **86**, 109 (1976).

9- H.M.V.M. Soares e M.T. Vasconcelos, *Anal. Chim. Acta*, **303**, 255 (1995).

10- J.C. Miller e J.N. Miller, "Statistics for analytical chemistry", Ellis Horwood, New York, 1984, cap. 4.

11- P.J. Harrison, R.E. Waters e F.J.R. Taylor, *J. Phycol.*, **16**, 28 (1980).

12- G.E. Batley e T.M. Florence, *J. Electroanal. Chem.*, **55**, 23 (1974).

13- O.M. Lage, A.M. Parente, H.M.V.M. Soares, M.T.S. Vasconcelos e R. Salema, *Eur. J. Phycol.*, **29**, 253 (1994).

14- D.M.J. Tubbing, W. Admiraal, R.F.M.J. Cleven, M. Iqbal, D. van de Meent e W. Verweij, *Wat. Res.*, **28**, 37 (1994).

CAPÍTULO 3.3

Aplicação da PRA à Determinação de Constantes de Formação Condicionais de Complexos de Cobre com Ligandos que Não São Adsorvidos à Superfície do Eléctrodo

3.3.1 INTRODUÇÃO

3.3.2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

3.3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 3.3.4.1 Verificação da ausência de fenómenos de Adsorção
- 3.3.4.2. Efeitos de Superfície
- 3.3.4.3 Complexação

3.3.5 CONCLUSÕES

3.3.1 INTRODUÇÃO

A voltametria de redissolução anódica e técnicas similares têm sido largamente usadas em estudos de especiação, designadamente na determinação de constantes de estabilidade de complexos, por ter selectividade e sensibilidade elevadas[1,2].

Por outro lado, a principal aplicação da PRA tem sido a determinação de concentrações totais de metais pesados em vários tipos de amostras[3-8].

Porém, as semelhanças existentes entre as duas técnicas (ver secção 2.1.3) permite supor que a PRA possa também ser usada em estudos de especiação.

Como espécies electroactivas[9] e substâncias surfactantes[10] presentes na solução interferem em menor extensão em PRA do que em VRA, a PRA pode ser até vantajosa para estudos de especiação de metais, em algumas situações, conforme já foi referido. Porém, quando as características do sinal dependem da etapa de redissolução, como acontece nas determinações de constantes de formação de complexos, β_j', pelo método de DeFord-Hume o agente oxidante (mercúrio(II) neste trabalho) poderá interferir na especiação do metal, constituindo uma limitação importante do campo de aplicação da técnica. Por todas as razões referidas, estudos comparativos da eficiência relativa da PRA e da VRA para a determinação de valores de β_j' para ligandos típicos do meio aquático merece investigação mas, tanto quanto se sabe, não foram ainda realizados.

Considerou-se, portanto, oportuno avaliar as potencialidades da PRA para determinação de β_j' de complexos de cobre(II) com ligandos orgânicos.

Como a PRA nunca tinha sido aplicada à determinação de constantes de formação de complexos, começou-se por testar o método para um sistema muito simples e bem estudado na literatura por outras técnicas: cobre(II)-glicina. A glicina forma com o cobre(II) complexos lábeis que não são adsorvidos à superfície do eléctrodo. A aplicação, da PRA e da VRADI em paralelo, ao estudo do sistema cobre(II)-glicina constituiu o objecto do presente capítulo.

Os resultados apresentados encontram-se aceites para publicação[11].

3.3.2 ENQUADRAMENTO TEÓRICO

DeFord e Hume desenvolveram um método para a determinação de constantes de estabilidade[12] a partir de resultados obtidos por técnicas polarográficas para processos reversíveis. O método foi mais tarde adaptado para utilização com dados obtidos por técnicas de VRA.

O método de DeFord-Hume tem sido largamente utilizado na determinação de complexos de cádmio(II), chumbo(II) e cobre(II) com carbonatos, hidróxidos, glicina e cloretos em águas doces e marinhas[13-16].

A aplicação deste método (na secção 2.3.1.1 é efectuada uma descrição do mesmo) pressupõe as verificações simultâneas das seguintes condições:

(i) os complexos são lábeis ($k_d \rightarrow \infty$), o que significa que o equilíbrio entre M^n e ML ($ML \underset{k_f}{\overset{k_d}{\rightleftharpoons}} M^n + L$) se estabelece rapidamente em todos os pontos da titulação do ligando com o metal (ou vice-versa) e em toda a extensão da solução incluindo à superfície do eléctrodo[17]. Nestas condições, a velocidade de dissociação do complexo não influência a intensidade da corrente. As limitações da corrente ($i_p{}^p < i_p{}^a$, para o mesmo valor de concentração de metal), se existirem, serão de natureza difusional (se $D_{M_{lig}} < D_M$).

(ii) O sistema é reversível do ponto de vista electroquímico ou seja, o processo não é limitado por razões de transferência de carga mas, e uma vez que os complexos têm de ser lábeis, apenas por limitações de natureza difusional.

(iii) Não ocorrem fenómenos de adsorção à superfície do eléctrodo, que interfiram no processo electroquímico.

(iv) A concentração total do ligando tem de ser muito superior à do metal de modo a permitir que $[L]_t^o \cong [L]_t$, ou melhor, que a concentração do ligando à superfície do eléctrodo seja praticamente a mesma que existe no seio da solução, mesmo quando $[M]_t^o >> [M]_t$ na fase de redissolução. De facto, durante esta fase, $[M]_t^o$ torna-se muito mais elevada do que no seio da solução ($[M]_t$) dependendo o respectivo valor relativo do tempo de deposição e da concentração de metal na solução (Buffle *et al.*[18] estimaram valores de $[M]_t^o/[M]_t$

≅ 50-200, para um EGMS e t_d de alguns minutos). Se a concentração de ligando não for suficientemente elevada de modo a garantir a existência de um grande excesso do mesmo à superfície do eléctrodo, o catião metálico poderá saturar o ligando. Em consequência, as condições químicas à superfície do eléctrodo modificam-se drasticamente devido à complexação à superfície do eléctrodo e tornam-se muito diferentes das condições no seio da solução[19]. Este fenómeno provoca o alargamento dos picos e a consequente diminuição da $i_p{}^P$[18,19], traduzindo-se ainda numa relação não linear entre $i_p{}^P$ *vs.* t_d (obtem-se uma curva em forma de S) e numa diminuição de ΔE_p com t_d (ΔE_p deve ser independente do t_d)[19].

Estudos efectuados por Buffle *et al.*[20,21] utilizando técnicas de VRA mostraram que a equação de DeFord-Hume só pode ser aplicada para $[L]_t/[M]_t > 1000$ (para $D_{M_{lig}} = D_M$) e mesmo assim, só para valores de t_d suficientemente curtos para impedir efeitos de superfície (deficiência de ligando) à superfície do eléctrodo, durante a fase de redissolução. Para $[L]_t/[M]_t < 1000$, a determinação das constantes de estabilidade através da equação [12] implica que se faça uma extrapolação da curva ΔE_p *vs.* t_d para $t_d = 0$[20,21].

Chau *et al.*[22] demonstraram teoricamente que a aplicação do método de DeFord-Hume também pode ser extensiva à PRA, mas como já se referiu, desconhece-se que esta técnica tenha sido aplicada à determinação de constantes de equilíbrio.

3.3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As determinações foram efectuadas em meio de nitrato de potássio 10 mmol/L tamponado com PIPES 10 mmol/L para valores de pH 6,0 e 6,5.

Os estudos de complexação foram realizados à concentração de cobre(II) constante de 0,787 µmol/L (cerca de quatro vezes superior ao limite de detecção de ambas as técnicas nas condições experimentais usadas E_d = -0,3 V *vs.* Ag/AgCl(s) KCl 3 mol/L e t_d = 120s). A concentração de glicina foi variada entre 1,12 e 31,6 mmol/L. Nas

experiências realizadas por PRA, utilizou-se mercúrio(II) 4,72 μmol/L como agente oxidante (adição de 47,2 μL de cloreto de mercúrio(II) 2 mmol/L). Os ΔE_p calculados a partir dos valores dos potenciais dos picos na presença, E_p^p, e na ausência,E_p^a, de glicina foram usados para calcular as constantes de estabilidade condicionais (ver secção 2.3.1.1). Assumiu-se, ainda, que [L] = $[L]_t$ uma vez que o ligando se encontrava em grande excesso na solução ($[L]_t$ 1423 vezes mais ou superior à do cobre).

A não ocorrência de fenómenos de superfície foi testada por VRADI para valores de t_d entre 30 e 1400 s. Para tal, usou-se uma solução 0,787 μmol/L em cobre(II) e 1,12 mmol/L em glicina.

Para testar a ausência de fenómenos de adsorção da glicina por PCA, usaram-se soluções contendo 1,12 e 17,8 mmol/L de glicina e uma solução sem ligando.

3.3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.4.1 Verificação da ausência de fenómenos de adsorção

Começou-se por testar, experimentalmente, a ausência de adsorção da glicina ao eléctrodo de mercúrio, uma vez que a determinação de constantes de estabilidade por técnicas voltamétricas, utilizando o método de DeFord-Hume, conduz a resultados erróneos se ocorrerem fenómenos de adsorção à superfície do eléctrodo[23-25].

Para tal, analisou-se a influência da concentração de glicina na curva $i = f(E)$ (entre 0 e -1,2 V) obtida por PCA. Escolheu-se o ângulo de fase (φ) de 90° com o objectivo de ampliar o contributo devido à i_c em detrimento da i_f. Nestas condições, $i_t \cong i_c$ e proporcional à capacidade da dupla camada.

A Figura 3.3.1 mostra que as curvas de $i = f(E)$ obtidas para as duas soluções de glicina foram sobreponíveis entre si e com a curva obtida para uma solução sem ligando. Estes resultados mostram que a glicina não era adsorvida à superfície do eléctrodo de mercúrio[17].

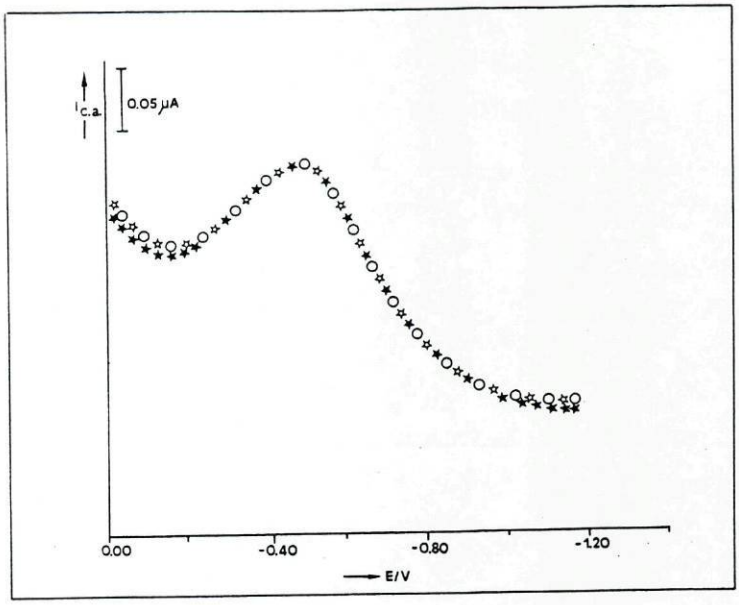


Figura 3.3.1. Polarogramas obtidos por PCA para soluções contendo diferentes concentrações de glicina: amplitude do componente sinusoidal do potencial = 10 mV; frequência do potencial alternado = 75 Hz; velocidade de varrimento = 5 mV/s; $\varphi = 90°$. [Glicina] = (★) 0,00; (☆) 1,12 mmol/L; (O) 17,8 mmol/L.

3.3.4.2 Efeitos de superfície

Para verificar se ocorriam efeitos de superfície durante a fase de redissolução, utilizou-se a VRADI e traçaram-se curvas $i_p = f(t_d)$ e $\Delta E_p = f(t_d)$[17] para um valor de razão $[glicina]_t/[cobre]_t = 1423$ (Figura 3.3.2). Observou-se uma variação linear de i_p vs. t_d sendo a curva sobreponível até 400 s com a obtida para uma solução sem ligando (Figura 3.3.2.A) e ΔE_p manteve-se constante até 400 s (Figura 3.3.2.B).

Estes resultados mostraram que os efeitos de superfície eram desprezáveis para esta razão de concentrações desde que $t_d < 400$ s. Em face destes resultados, os estudos de complexação subsequentes foram efectuados para razões $[glicina]_t/[cobre]_t > 1423$ e $t_d < 400$ s. Os resultados evidenciam ainda que os coeficientes de difusão dos complexos cobre(II)-glicina foram idênticos ao coeficiente de difusão do catião metálico livre, como se esperava, dado tratar-se de um ligando monomérico de pequenas dimensões.

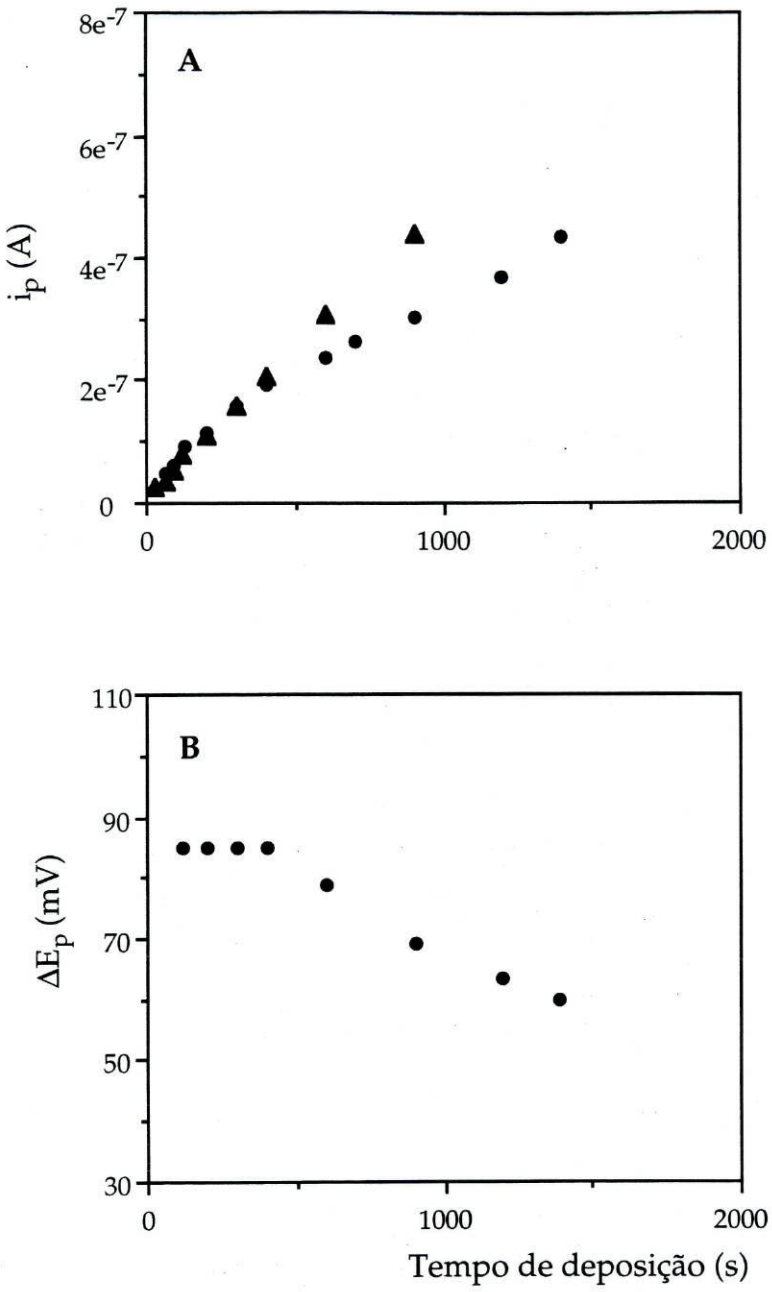


Figura 3.3.2. Resultados típicos obtidos no estudo da influência da concentração de glicina (▲ sem ligando, ● 1,12 mmol/L) na resposta por VRADI de uma solução de cobre (II) 0,787 µmol/L. E_d = -0,3 V vs. Ag/AgCl(s) KCl 3 mol/L. **A** - $i_p=f(t_d)$; **B** - $\Delta E_p=f(t_d)$.

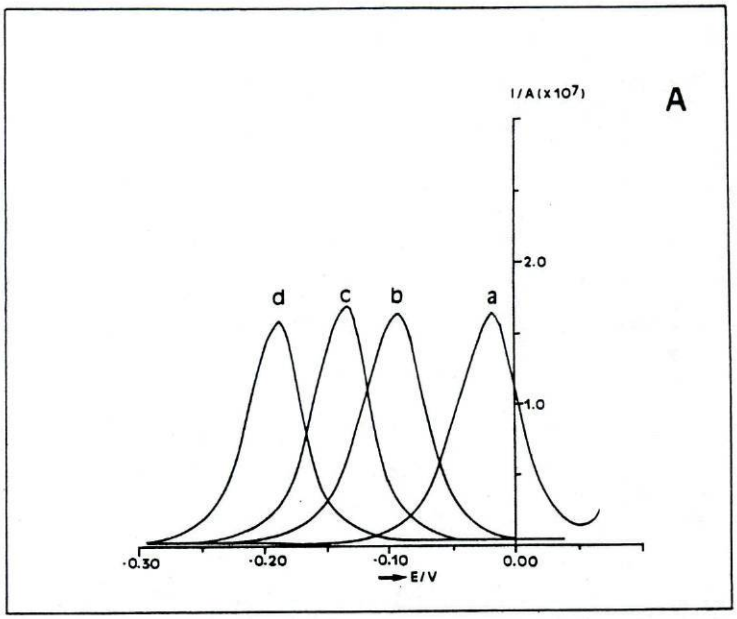
3.3.4.3 Complexação

As Figuras 3.3.3.A e 3.3.3.B mostram voltamogramas e potenciogramas, respectivamente, registados para soluções contendo 0,787 µmol/L de cobre (II) e 0,00, 1,41, 7,94 ou 31,6 mmol/L de glicina. A Figura 3.3.3.A mostra que os valores das i_p observados para as soluções com diferentes concentrações de glicina foram idênticas entre si e ao valor obtido na ausência de ligando. Estes resultados indicam que os complexos em estudo eram lábeis na escala de tempo das técnicas utilizadas e confirmaram que os coeficientes de difusão dos complexos eram idênticos ao do metal livre. Esta figura mostra ainda que os valores dos E_p se tornaram progressivamente mais negativos à medida que a concentração de glicina aumentava.

Os resultados obtidos por PRA (Figura 3.3.3B) (valores de dt/dE) foram compatíveis com os obtidos por VRADI. Os valores de ΔE_p (= $E_p{}^a$ - E_pP) obtidos por ambas as técnicas foram também praticamente idênticos (Tabela 3.3.1). Os desvios para valores mais negativos dos E_p resultaram da complexação rápida do cobre(II) pela glicina durante a fase de redissolução[17]. Tais desvios dependem da relação [glicina]/[Cu] e não do valor de E_d, o qual deve apenas ser suficientemente negativo para permitir a redução do catião metálico. As Figuras 3.3.3A e 3.3.3B e a Tabela 3.3.1 mostram que, na ausência de ligando, o E_p foi aproximadamente igual em ambas as técnicas.

Tabela 3.3.1. Valores da largura do pico ($W_{1/2}$) e do potencial do pico (E_p) obtidos por PRA e por VRADI com soluções a pH 6,5 com 0,787 µmol/L de cobre(II) e concentrações de glicina variáveis.

Curvas da Figura 3.3.3	Glicina (mmol/L)	VRADI (mV) $W_{1/2}$	VRADI (mV) E_p	PRA E_p (mV)
a	----	60	- 16	-15
b	1,41	55	-94	-98
c	7,94	54	-134	-136
d	31,6	54	-189	-185



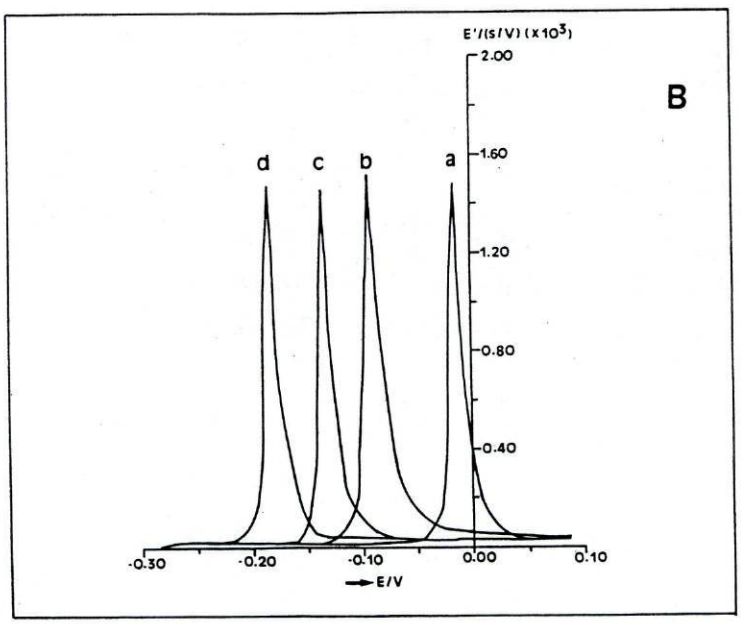


Figura 3.3.3. Voltamogramas obtidos por VRADI (**A**) e potenciogramas obtidos por PRA (modo dPRA) (**B**) registados para soluções a pH 6,5 com 0,787 μmol/L de cobre(II) e diferentes concentrações de glicina: a- 0,00; b- 1,41; c- 7,94; e d-31,6 mmol/L).

Por outro lado, na ausência de glicina, o valor da largura de pico ($W_{1/2}$) obtido por VRADI (Tabela 3.3.1) esteve de acordo com o teoricamente previsto[26]. Na presença de glicina, os valores de $W_{1/2}$ estiveram também de acordo com o esperado[26] embora tenham sido ligeiramente inferiores ao obtido na ausência de ligando. O facto de não se ter verificado alargamento dos picos e dado que não deveriam ter ocorrido efeitos de superfície permite concluir que o sistema em estudo apresentou um comportamento electroquímico reversível[14]. Atendendo a que os tempos de resposta da PRA e da VRADI são semelhantes (log t (s) variável entre -0,5 e -1,2[27]), será lícito assumir que o sistema em estudo também apresentará um comportamento electroquímico reversível em PRA.

O conjunto de resultados permite, portanto, concluir que, nas condições experimentais usadas, o sistema cobre(II)-glicina parece obedecer às condições de aplicabilidade da equação de DeFord-Hume (equação [12])[28].

Na Figura 3.3.4 apresentam-se os gráficos de ΔE_p = f (log [glicina]) obtidos a partir de dados experimentais quer de PRA quer de VRADI, a pH 6,0. A Figura mostra que a referida função é não linear, o que indica a formação de mais do que um complexo. Os dados obtidos por ambas as técnicas ajustavam-se a um polinómio de segundo grau, tendo as constantes de estabilidade condicionais sido obtidas a partir dos coeficientes do polinómio (ver secção 2.3.1.1) (ver Tabela 3.3.2):

$$\Delta E_p = (2{,}303\ RT/2F) \log (1 + \beta_1' [\text{glycine}] + \beta_2' [\text{glycine}]^2) \qquad [54]$$

A Tabela 3.3.2. mostra que os valores de constantes de estabilidade condicionais obtidos por PRA e por VRADI foram praticamente idênticos. Estes resultados permitem, portanto, concluir que a presença de mercúrio(II) durante a fase de redissolução não interferiu significativamente no sinal analítico, o que se deveu, provavelmente, ao facto de a glicina se encontrar em grande excesso na solução.

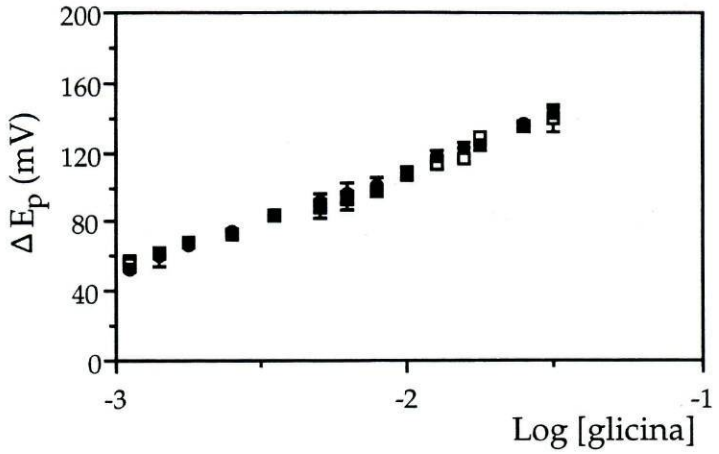


Figura 3.3.4. Valores médios e desvios padrão (n = 3) de ΔE_p *vs.* [glicina] para soluções 0,787 µmol/L em cobre (II) obtidos por PRA (□) e por VRADI (●), a pH 6,0.

Tabela 3.3.2. Constantes de estabilidade condicionais determinadas[a] por PRA e por VRADI e calculadas a partir de dados da literatura[b].

$\log \beta_j'$	PRA	VRADI	Literatura[b]
pH = 6,0			
β_1'	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,6	4,6
β_2'	7,6 ± 0,2	7,7 ± 0,3	7,9
pH = 6,5			
β_1'	5,7 ± 0,6	5,5 ± 0,5	5,1
β_2'	8,5 ± 0,4	8,6 ± 0,4	8,9

a - São dados também os desvios padrão ($n \geq 3$).
b - Referência[29] (ver texto).

A partir de constantes de estabilidade publicadas[29], log β_1 = 8,5 e log β_2 = 15,4 (T = 20 °C, I = 10 mmol/L), calcularam-se as constantes de estabilidade condicionais (ver secção 2.3.2) a pH 6,0 e 6,5, tendo-se chegado a valores semelhantes aos obtidos neste trabalho (ver Tabela 3.3.2). Por outro lado, a Figura 3.3.5 ilustra que a curva ΔE_p = f (log [glicina]) estimada a partir dos valores de β_j' calculados coincidem praticamente com a curva referente aos resultados experimentais obtidos por PRA.

A boa concordância observada entre os resultados experimentais e calculados com base em dados da literatura indica que, o cobre(II) e não cobre (I) (que surge frequentemente envolvido na oxidação de cobre(0) a cobre(II), na fase de redissolução do metal amalgamado) se forma directamente, num processo de transferência de 2 electrões, na etapa de redissolução. Este facto corrobora dados da literatura à cerca do comportamento electroquímico do sistema cobre(II)-glicina[30] e mostra que as técnicas de redissolução são adequadas à determinação das constantes de estabilidade respectivas.

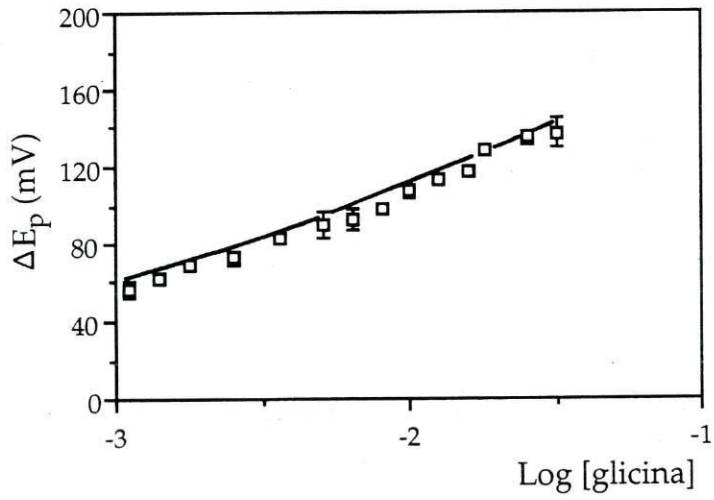


Figura 3.3.5. Valores médios e desvios padrão (n = 3) de ΔE_p *vs.* [glicina] para soluções 0,787 μmol/L em cobre (II) e pH = 6,0 obtidos por PRA (□) e curva (⁀) obtida a partir de valores de β_j' calculados a partir de constantes de estabilidade estequiométricas da literatura[29].

A Tabela 3.3.2. mostra ainda que, no intervalo de pH estudado, os valores das constantes de formação condicionais dos complexos de cobre(II)-glicina dependem acentuadamente do pH, o que era esperado devido ao envolvimento de grupos carboxílicos na complexação.

3.3.5 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que a PRA é adequada para a determinação de constantes de estabilidade de complexos entre metais e ligandos orgânicos que não sejam adsorvidos à superfície do eléctrodo de mercúrio, em condições de aplicabilidade da equação de DeFord-Hume.

REFERÊNCIAS

1- T.M. Florence, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 4.

2- J. Wang, "Stripping analysis, principles, instrumentation and applications", VCH Publishers, Florida,1985, cap. 2.

3- M. Betti, L. Almestrand, D. Jagner e L. Renman, *Annali di Chimica*, **82**, 323 (1992).

4- M. Betti, L. Almestrand, D. Jagner e L. Renman, *Annali di Chimica*, **82**, 339 (1992).

5- M. Froning, C. Mohl e P. Ostapczuk, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **345**, 233 (1993) .

6- D. Jagner, L. Renman e Y. Wang, *Electroanal.*, **5**, 283 (1993).

7- P. Ostapczuk, *Anal. Chim. Acta*, **273**, 35 (1993).

8- D. Jagner, L. Renman e Y. Wang, *Electroanal.*, **6**, 285 (1994).

9- D. Jagner, M. Josefson e S. Westerlund, *Anal. Chim. Acta*, **128**, 155 (1981).

10- D. Jagner, *Analyst*, **107**, 593 (1982).

11- H.M.V.M. Soares e M.T. Vasconcelos, *Talanta* (1995, no prelo).

12- D.D. DeFord e D.N. Hume, *J. Am. Chem. Soc..*, **73**, 5321 (1951).

13- M. Odier e V. Plichon, *Anal. Chim. Acta*, **55**, 209 (1971).

14- R. Ernst, H.E. Allen e K.H. Mancy, *Wat. Res.*, **9**, 969 (1975).

15- H. Bilinski, R. Huston e W. Stumm, *Anal. Chim. Acta*, **84**, 157 (1976).

16- M.L.S. Simões Gonçalves, P. Valenta e H.W. Nürenberg, *J. Electroanal. Chem.*, **149**, 249 (1983).

17- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 9.

18- J. Buffle, A. Tessier e W. Haerdi, *em* "Complexation of trace metals in natural waters", C.J.M. Kramer e J.C. Duinker, Eds., Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, Boston, 1984, Part V.

19- J. Buffle, *J. Electroanal. Chem.*, **125**, 273 (1981).

20- J. Buffle, A.M. Mota e M.L. Gonçalves, *Portugaliae Electrochimica Acta*, **3**, 293 (1985).

21- A.M. Almeida Mota, J. Buffle, S.P. Kounaves e M.L.S.S. Gonçalves, *Anal. Chim. Acta*, **172**, 13 (1985).

22- T.C. Chau, D.Y. Li e Y.L. Wu,*Talanta*, **29**, 1083 (1982).

23- M.C. Montemayor e E. Fatas, *J. Electroanal. Chem.*, **246**, 271 (1988).

24- M. Lovric, *Anal. Chim. Acta*, **218**, 7 (1989).

25- M. Zelic e M. Branica, *Anal. Chim. Acta*, **268**, 275 (1992).

26- E.P. Parry e R.A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **37**, 1634 (1965).

27- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 6.

28- D.R. Crow, "Polarography of metal complexes", Academic Press, New York, 1969, cap. 4.

29-L.G. Sillén e A.E. Martell, "Stability constants of metal-ion complexes", vol. 17, The Chemical Society, London, 1964.

30- A. Nelson e R.F.C. Mantoura, *J. Electroanal. Chem.*, **164**, 237 (1984).

CAPÍTULO 3.4

Aplicação da PRA à Determinação de Constantes de Formação Condicionais de Complexos de Cobre com Ligandos que São Adsorvidos à Superfície do Eléctrodo

3.4.1 INTRODUÇÃO

3.4.2. DIFICULDADES NA INTERPRETAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPLEXAÇÃO METAL-AH OBTIDOS POR TÉCNICAS DE VARRIMENTO

3.4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

- 3.4.4.1 Determinação da capacidade de complexação dos AH por PESC
- 3.4.4.2. Verificação da ocorrência de fenómenos de adsorção
- 3.4.4.3 Determinações por PESC/PDI
- 3.4.4.4 Influência da adsorção nos parâmetros electroquímicos obtidos por PRA e VRADI
- 3.4.4.5 Determinação de parâmetros de complexação

3.4.5 CONCLUSÕES

3.4.1 INTRODUÇÃO

A adsorção de matéria orgânica à superfície do eléctrodo, particularmente do eléctrodo de mercúrio, é uma das complicações mais sérias dos métodos voltamétricos.

A adsorção de certas substâncias na interface eléctrodo-solução é favorecida quer pelas propriedades hidrofóbicas dessas substâncias quer pelo aumento da entropia quando as mesmas fazem deslocar moléculas de água, que se encontram de uma forma ordenada adjacentes à interface, para a solução que se encontra num estado de

maior desordem[1]. As substâncias que sofrem adsorção podem dividir-se em três grupos: (i) espécies não electroactivas nem complexantes, (ii) electroactivas e não complexantes e (iii) não electroactivas mas que reagem quimicamente com o metal a determinar. Este último grupo é o mais importante em estudos ambientais de especiação uma vez que os sistemas naturais contém frequentemente macromoléculas e/ou substâncias coloidais nessas condições.

Os fenómenos de adsorção podem influenciar as propriedades redox dos metais em VRA, originando valores erróneos de i_p e de E_p[1-4]. Em casos extremos pode observar-se desdobramento do sinal e/ou um desvio no valor de E_p[5]. Tais interferências dependem das características das substâncias adsorvidas[1] e podem mascarar os resultados de estudos de complexação em águas naturais[6,7]: as constantes de estabilidade determinadas a partir de valores de ΔE_p têm um carácter aparente[5], isto é, não correspondem ao valor verdadeiro.

Para investigar se a PRA seria vantajosa para estudos de especiação na presença de substâncias surfactantes realizaram-se medições sobre o sistema cobre(II)-AH em paralelo por PRA e por VRADI. Os AH foram escolhidos por serem, simultaneamente, complexantes naturais importantes (ver secção 3.1.1) e substâncias surfactantes[2,8]. As suas estruturas macromoleculares que incluem uma quantidade apreciável de partes hidrofóbicas são responsáveis pela adsorção[6,9].

Neste trabalho, começou-se por averiguar se os AH utilizados eram adsorvidos à superfície do eléctrodo de trabalho e de que modo e em que extensão a adsorção afectava as características do sinal em PRA e em VRADI. Seguidamente, procurou-se obter informações sobre as propriedades complexantes dos AH para cobre(II), através da determinação da função de equilíbrio diferencial. Devido à complexidade do sistema químico em estudo, e à ocorrência de fenómenos de adsorção, procurou-se obter informações complementares sobre o sistema por outras técnicas que foram, designadamente PDI e PESC. Nesta última, as determinações cobriram razões $[AH]_t/[Cu]_t$ idênticas mas também mais elevadas do que as

usadas nas técnicas de varrimento anódico, devido ao limite de detecção elevado da PESC.

Parte dos resultados apresentados encontram-se publicados[10]. Os restantes constam de um outro artigo aceite para publicação[11].

3.4.2 DIFICULDADES NA INTERPRETAÇÃO DOS PARÂMETROS DE COMPLEXAÇÃO METAL-AH OBTIDOS POR TÉCNICAS DE VARRIMENTO

As reacções de complexação que envolvem AH são difíceis de estudar por várias razões que podem ser agrupadas em dois tipos diferentes:

I- Inerentes ao sistema químico

(i) Estes ligandos apresentam uma estrutura complexa devido à sua natureza polifuncional e polielectrolítica e à possibilidade de sofrerem alterações conformacionais (ver secção 3.1.1)[12,13].

(ii) As concentrações de AH e metais presentes nos meios naturais são muito baixas (níveis vestigiais)[14].

II- Inerentes aos métodos analíticos

(i) As técnicas analíticas a usar têm de ser muito sensíveis, uma vez que os valores das capacidades de complexação e das constantes de estabilidade condicionais dos complexos dependem da janela analítica (zona de concentração em que são realizadas as determinações). Por consequência, a utilização de técnicas de redissolução é necessária na maior parte dos estudos com interesse ambiental.

(ii) Os AH são adsorvidos à superfície do eléctrodo de mercúrio mascarando os resultados analíticos[13,15,16].

(iii) Nas águas naturais, as razões $[AH]_t/[M]_t$ são relativamente baixas, muito inferiores a 1000. Ora este valor tem sido considerado o valor mínimo necessário para prevenir efeitos de superfície (devidos à

saturação do ligando pelo metal à superfície do eléctrodo, (ver secção 3.3.2)[17], embora a presença de complexos em que $D_{M_{lig}} < D_M$, como acontece com os AH, possa permitir usar razões menores[16], mas cujo limite inferior não foi ainda estabelecido.

(iv) Os AH difundem-se lentamente para a superfície do eléctrodo (*i.e.* $D_{M_{lig}} < D_M$) por serem moléculas de dimensões elevadas.

(v) Devido à heterogeneidade dos AH, a labilidade dos respectivos complexos depende não só das características da técnica electroquímica utilizada[18] mas também da razão $[AH]_t/[M]_t$ conforme se discutiu no capítulo 3.1.

Alguns dos problemas acima mencionados têm efeitos aditivos ou antagónicos nas características da resposta electroquímica, i_p e/ou E_p. Por exemplo, ambos os fenómenos II(ii) e II(iii) originam funções $i_p = f(t_d)$ não lineares[1]; para a mesma razão $[AH]_t/[Cu]_t$, $\Delta E_p > \Delta E_p^e$ em (ii) mas $\Delta E_p < \Delta E_p^e$ em (iii) (sendo ΔE_p^e o valor esperado na ausência de interferências).

A importância destes problemas é ainda acrescida pelo facto da aplicabilidade do método de DeFord-Hume exigir a verificação de determinadas condições, já mencionadas na secção 3.3.2.

Pelos motivos apresentados anteriormente, é importante recorrer a outras técnicas analíticas, para além das técnicas de redissolução anódica, para comparação e interpretação dos resultados obtidos com estas últimas. Foi o que se procurou fazer no presente estudo.

3.4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As determinações foram efectuadas a pH 6,5 em meio de nitrato de potássio 10 mmol/L, tamponado com PIPES 10 mmol/L.

As determinações por PESC foram realizadas a concentrações fixas de AH. Como titulante, usaram-se soluções de nitrato de cobre(II) 0,500 e 5,00 mmol/L em nitrato de potássio 10 mmol/L.

As concentrações de AH (ver secção 3.4.4.1) usadas nas determinações efectuadas por PCA para um φ de 90° foram de 8 e 18 µmol/L. Foram ainda realizadas experiências para um φ de 0° para a solução de 18 µmol/L.

Por PRA e VRADI, efectuaram-se experiências em três condições diferentes: (i) com concentrações fixas de cobre(II), 0,787 µmol/L, e de AH, 18 µmol/L; (ii) concentração fixa de cobre(II), 2,20 µmol/L, e concentrações de AH variáveis entre 22,8 e 283 µmol/L; (iii) concentração fixa de AH, 82,8 µmol/L, e concentrações de cobre(II) variáveis entre 0,315 e 4,70 µmol/L. Usou-se E_d = -0,4 V *vs.* Ag/AgCl(s) KCl 3 mol/L em todas as determinações realizadas por PRA e por VRADI. Na experiência (i), o t_d foi variado entre 10 e 600 s. Nas restantes, o t_d foi de 90 s. Nas determinações realizadas por PRA, usou-se 1,19 µmol/L de mercúrio(II) (agente oxidante) na experiência (i), e 4,73 µmol/L nas restantes experiências (adição de 11,9 e de 47,3 µL de cloreto de mercúrio(II) 2 mmol/L, respectivamente). O oxigénio dissolvido foi removido da solução durante 40 minutos, o tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio químico.

As experiências realizadas por PDI foram efectuadas, à temperatura de 20 °C, nas condições experimentais seguintes: altura do impulso, 50 mV; duração do impulso, 60 ms; e velocidade de varrimento, 5 mV/s. Os tempos de gota variaram entre 0,5 e 2,5 s.

3.4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.4.1 Determinação da capacidade de complexação dos AH por PESC

Uma vez que os AH apresentam uma massa molecular indefinida e não são totalmente solúveis a pH próximo da neutralidade, estimou-se a sua concentração molar através da capacidade de complexação (CC)[19,20]. Para tal, efectuaram-se titulações

de soluções de AH em concentrações variadas com cobre(II), por PESC (ver exemplo típico na Figura 3.4.1). Os resultados experimentais foram tratados pelo método de Ruzic (ver secções 2.3.3)[21].

Nos estudos subsequentes, os valores da CC obtidos foram usados como uma medida da concentração das posições de coordenação de AH na solução.

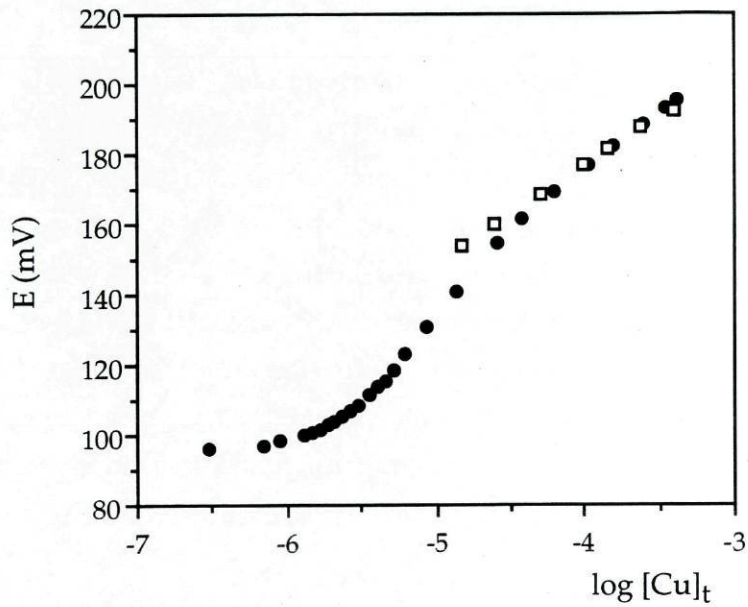


Figura 3.4.1. Curva de titulação (●) de uma solução de AH em nitrato de potássio 10 mmol/L com cobre a pH 6,5 e respectiva curva de calibração (□) (E (mV) = (28 ± 1) log $[Cu]_t$ + (287 ± 4); R = 0,9995, P = 0,05, n = 7). Valor de CC calculado: 22,8 ± 0,9 µmol/L (média e desvio padrão, n = 3).

3.4.4.2 Verificação da ocorrência de fenómenos de adsorção

Por razões já discutidas em 3.3.4.1, começou-se por avaliar a influência dos AH nas curvas $i = f(E)$ obtidas por PCA para um φ de 90° (Figura 3.4.2).

Uma análise da figura evidência a ocorrência de uma diminuição dos valores de i_t com o aumento da concentração de AH (compare-se as curvas b e c com a curva a, esta obtida na ausência de

AH). A diminuição da i_t resulta da diminuição da capacidade da dupla camada a qual, por sua vez, é provavelmente devida à ocorrência de adsorção à superfície do eléctrodo. Além disso, verificou-se que nas soluções contendo AH, as gotas de mercúrio resultantes da renovação do eléctrodo não coalesciam, como consequência da alteração da tensão superficial à sua superfície.

Estes resultados mostram que os AH são adsorvidos à superfície do eléctrodo de mercúrio e que a adsorção aumenta com a concentração de AH.

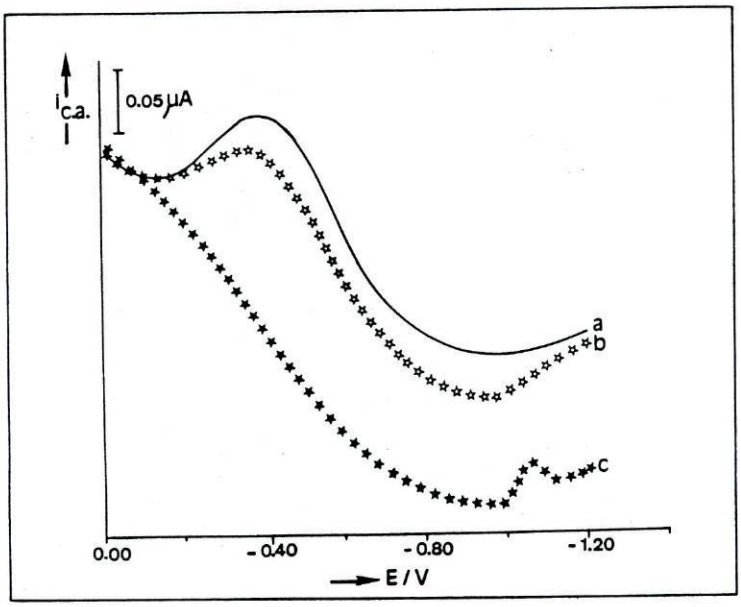


Figura 3.4.2. Polarogramas obtidos por PCA na ausência (a) e na presença de AH: (b) 8 ; (c) 18 μmol/L. Amplitude do componente sinusoidal do potencial, 10 mV; frequência do potencial alternado, 75 Hz; velocidade de varrimento, 5 mV/s e $\varphi = 90°$.

Foi também evidente que os fenómenos de adsorção ocorriam num intervalo alargado de valores de potencial (ver Figuras 3.4.2 e 3.4.3). Além disso, a Figura 3.4.3 mostra que a diminuição de i_t, devido à presença de 18 μmol/L de AH, aumentou acentuadamente a partir de -0,2 V, atingiu um valor máximo próximo de -0,4 V e decresceu de um modo menos marcado para valores de E_d mais negativos. O facto da depressão de i_t ser máxima na zona de potencial de carga nula ($\cong$ –0,4 V) deve-se provavelmente à adsorção ser mais acentuada nessa

zona de potencial, como consequência das interacções hidrofóbicas entre os AH e o eléctrodo de mercúrio (o mercúrio comporta-se como uma superfície hidrofóbica na zona de potencial de carga nula e hidrofílica nas outras zonas)[15,22].

Para a solução 18 μmol/L de AH procedeu-se também ao registo de uma curva de $i = f(E)$ para um $\varphi = 0°$ para o qual $i_t \cong i_c$ (Figura 3.4.4). Observou-se um valor de i_t aproximadamente constante e próximo de zero entre 0 e -0,95 V e o aparecimento de um pico próximo de -1,0 V. Este pico ocorreu para o mesmo valor de potencial ao qual tinha ocorrido um pico nas determinações a $\varphi = 90°$ (ver curva c na Figura 3.4.2) e deveu-se, provavelmente, à redução dos AH. Estes resultados evidenciaram que estes ácidos não apresentam características electroactivas até um potencial próximo de -1,0 V.

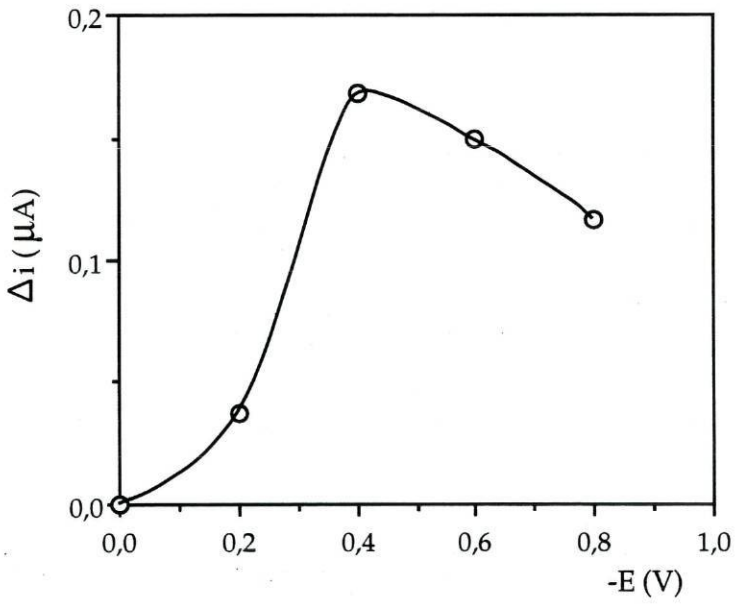


Figura 3.4.3. Variação da intensidade da corrente relativa observada para diferentes valores de E_d. Resultados obtidos por diferença entre os valores de i_t na ausência de AH (curva a da Figura 3.4.2) e para 18 μmol/L de AH (curva c da Figura 3.4.2).

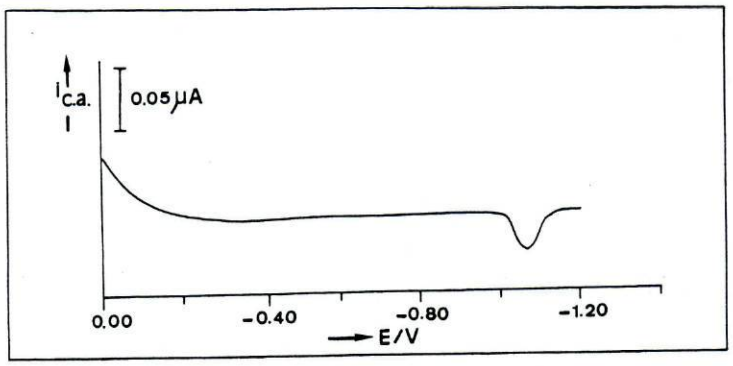


Figura 3.4.4. Polarograma obtido por PCA com uma solução de AH com 18 μmol/L. Amplitude do componente sinusoidal do potencial, 10 mV; frequência do potencial alternado, 75 Hz; velocidade de varrimento, 5 mV/s e $\varphi = 0°$.

3.4.4.3 Determinações por PESC/PDI

Problemas típicos das técnicas voltamétricas, tais como, labilidade dos complexos, irreversibilidade do processo electroquímico, fenómenos de adsorção à superfície do eléctrodo ou fenómenos de superfície, não se colocam nos estudos de complexação realizados por PESC. Por estas razões foi considerado importante, para a interpretação dos resultados obtidos pelas técnicas de redissolução anódica, extrair o máximo de informação do sistema cobre-AH a partir dos resultados obtidos por PESC. Assim, para além da determinação da função de equilíbrio diferencial, K_{fed} (ver Figura 3.4.15 adiante), para cada curva de titulação realizada por PESC e para razões $[AH]_t/[Cu]_t$ semelhantes às usadas nas técnicas de redissolução anódica foram calculados os valores de α (ver Figura 3.4.5) de modo a poder-se estimar os valores de ΔE_p, através da equação [10]. Para isso, os valores de $\bar{D}$ foram calculados através da equação [11][23] considerando $D_{Cu} = 1 \times 10^{-5}$ cm^2 s^{-1} (retirado da referência[24]). Para o cálculo do valor de $D_{Cu_{lig}}$ ($=\bar{D}$ quando $\alpha \rightarrow \infty$ (ou $[AH]_t \rightarrow \infty$)) usou-se uma solução $1{,}52 \times 10^{-4}$ mol/L em AH e 38 μmol/L em cobre(II). Para esta solução obteve-se, por PESC, um valor de α = 199,5 indicando que 99,5 % do cobre total da solução estava ligado aos AH. $D_{Cu_{lig}}$ foi calculado através da igualdade[3,7] $i_p{}^p/i_p{}^a = (D_{Cu_{lig}}/D_{Cu})^{1/2}$, tendo os valores de $i_p{}^p$ e de $i_p{}^a$ sido estimados

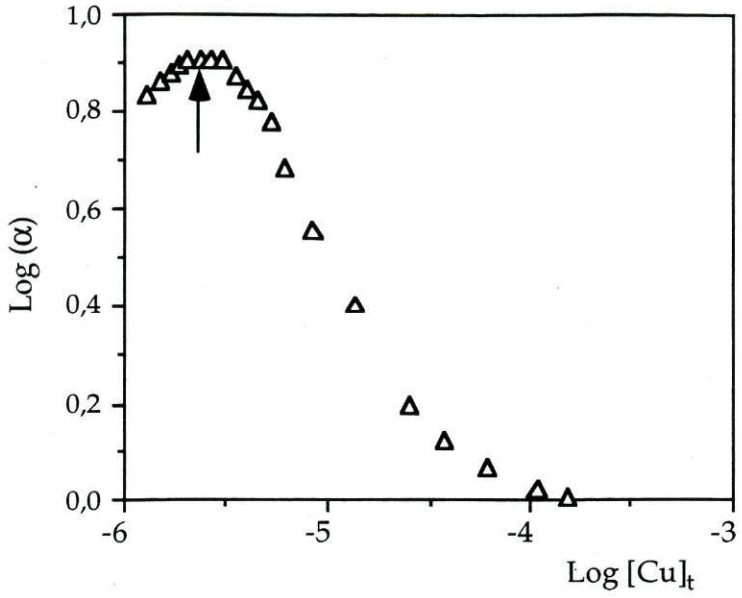


Figura 3.4.5. Exemplo típico do modo de determinação de α (= $[Cu]_t/[Cu]$), obtido ao longo da titulação, por PESC, de uma solução 22,8 μmol/L em AH com cobre(II). Valores obtidos a partir dos resultados apresentados na Figura 3.4.1. A seta assinala o valor de α utilizado no cálculo de ΔE_p para a concentração de AH referida usada na Figura 3.4.12.

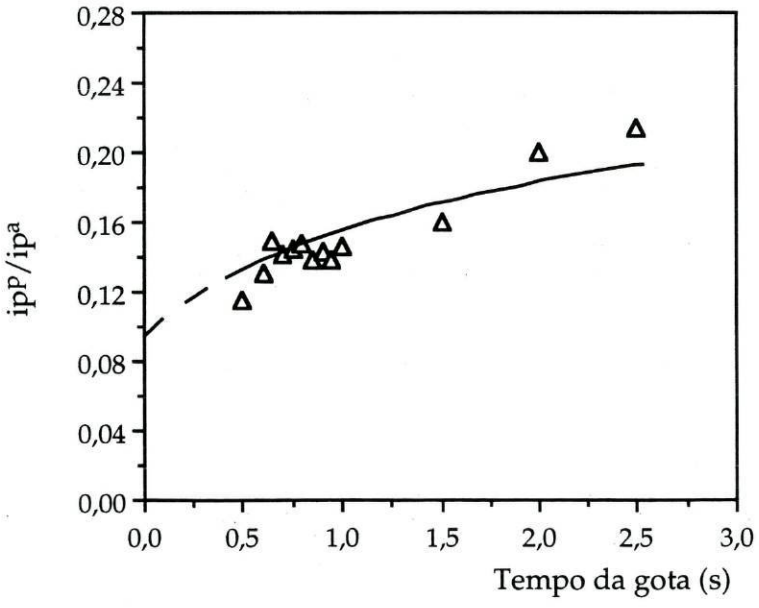


Figura 3.4.6. Variação de ip^P/ip^a com o tempo da gota, obtido por PDI, para uma solução 152 ± 29 μmol/L (média e desvio padrão, n = 3) em AH e 38 μmol/L em cobre(II).

por PDI, considerando, para tal, que os complexos eram lábeis (ver secção 3.4.4.5). Dada a ocorrência de fenómenos de adsorção, a razão i_{pP}/i_{pa} não era independente do tempo da gota (ver Figura 3.4.6) e, por isso, o valor de $D_{Cu_{lig}}$, 9 x 10-8 $cm^2\ s^{-1}$, foi calculado por extrapolação do valor de i_{pP}/i_{pa} para um tempo de gota nulo[3,7].

Os valores de ΔE_p obtidos através da equação [10] foram incluídos na Figura 3.4.12, adiante, juntamente com os valores obtidos por PRA e VRADI, para fins comparativos.

3.4.4.4 Influência da adsorção nos parâmetros electroquímicos obtidos por PRA e VRADI

A influência da adsorção nas características do sinal de cobre(II) nas técnicas de redissolução anódica foi estudada de dois modos: (i) avaliando a influência de t_d nas características do sinal (i_p ou $(dt/dE)_{max} = f(t_d)$) e $\Delta E_p = f(t_d)$[1] e (ii) avaliando a variação de ΔE_p com a concentração de AH. Em ambos os estudos, usou-se E_d = -0,4 V, uma vez que este valor pertencia à zona de potenciais onde se verificou um máximo de adsorção (ver Figura 3.4.3), e um EMGS porque permitia a renovação da superfície do eléctrodo de trabalho, o que era vantajoso: num eléctrodo de superfície não renovável poderia não se verificar a desadsorção total dos AH do mesmo entre experiências sucessivas[6].

Variação da intensidade do sinal e de ΔE_p em função do tempo de deposição

Os estudos de variação da intensidade do sinal (i_p em VRADI ou $(dt/dE)_{max}$ em PRA) e do E_p em função do t_d foram realizados com uma solução 18 µmol/L em AH e 0,787 µmol/L em cobre(II). Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 3.4.7 a 3.4.11. Verificou-se previamente, por PESC/PDI, que o grau de complexação desta solução era desprezável ($\Delta E_p \cong 5$ mV, ver secção 3.4.4.3).

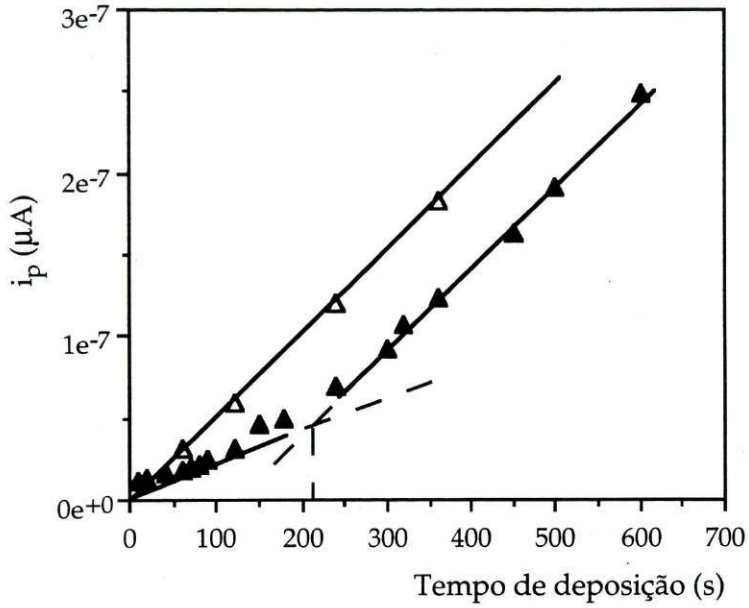


Figura 3.4.7. Variação de i_p com t_d (Δ sem AH, ▲com AH 18 μmol/L) por VRADI para uma solução de 0,787 μmol/L de cobre(II). A figura representa os resultados de uma de duas experiências efectuadas.

Determinação por VRADI. A Figura 3.4.7 mostra que os valores de i_p não variaram linearmente com t_d, observando-se uma quebra para $t_d \cong 210s$, designando-se este de tempo crítico (t_c)[1]. Para valores de $t_d < t_c$, a curva $i_p = f(t_d)$ apresenta declive inferior ao da curva para a solução sem ligando, o que já não acontece para $t_d > t_c$.

Paralelamente, a Figura 3.4.8 mostra que os valores de ΔE_p observados por VRADI diminuiram abruptamente com o aumento do t_d e que os valores de ΔE_p referentes a t_d baixos ($< t_c$) foram muito superiores ao estimado por PESC/PDI (ver secção 3.4.4.3) ($\Delta E_p \cong 5$ mV), o que resultou provavelmente da adsorção dos AH. Este último valor representa o ΔE_p que deveria ser obtido para um sistema com a mesma "força" de complexação, em que os complexos fossem lábeis, não adsorvessem à superfície do eléctrodo e não existissem efeitos de superfície[23]. Para valores de $t_d < t_c$, o metal reoxidado, [Cu(II)]^o, foi complexado não só pelos AH dissolvidos mas também pelos AH adsorvidos à superfície do eléctrodo, o que provocou desvios de E_p mais pronunciados do que o esperado devido ao efeito da complexação pelos AH dissolvidos[1]. À medida que o t_d foi aumentando, o [Cu(II)]^o

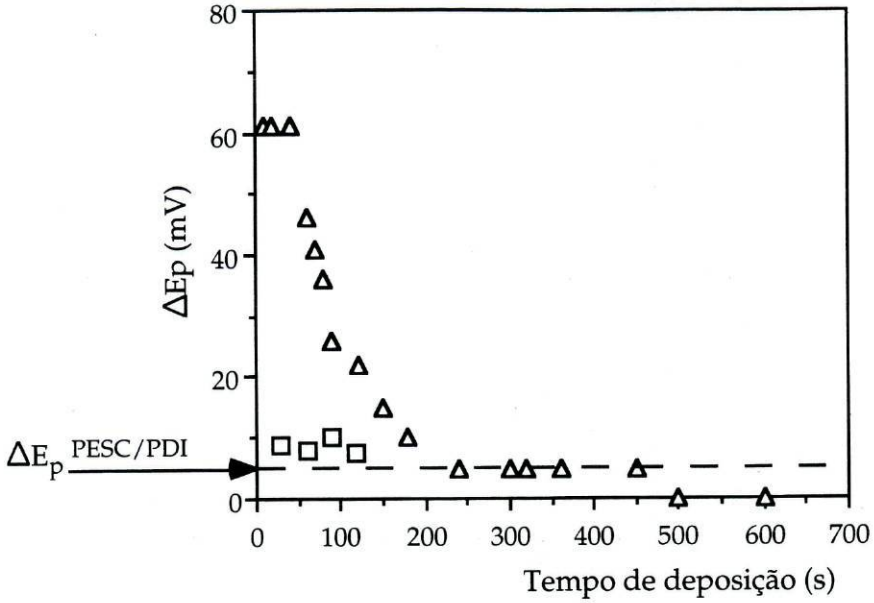


Figura 3.4.8. Variação de ΔE_p com t_d por VRADI (Δ) e por PRA (□) para uma solução 18 μmol/L em AH e 0,787 μmol/L em cobre(II). O valor de ΔE_p estimado por PESC/PDI (ver secção 3.4.4.3) foi também incluído. A figura representa os resultados experimentais de uma de duas experiências efectuadas.

aumentou também e uma fracção apreciável dos AH à superfície do eléctrodo fica saturada no metal. Em consequência, o valor de ΔE_p diminui (Figura 3.4.8). Para valores de $t_d > t_c$, o [Cu(II)]^o era suficiente para saturar os AH quer na forma adsorvida quer na forma dissolvida presentes na camada de difusão. A partir daí, à medida que o t_d aumenta, o efeito da complexação devido aos AH torna-se cada vez menos importante até ser desprezável e, consequentemente a maior parte da corrente corresponde à reoxidação do cobre no estado de oxidação zero a cobre livre (ΔE_p tende para zero)[1].

A Figura 3.4.8 mostra ainda que para valores de t_d inferiores a 50s, ΔE_p observado por VRADI atingiu um patamar correspondente a um valor máximo. Estes resultados devem-se provavelmente ao facto de, por um lado os t_d terem sido suficientes para se verificar a adsorção máxima do AH, e, por outro lado, suficientemente curtos de modo a que a saturação do ligando pelo cobre(II) fosse mínima[1].

Observou-se ainda um alargamento dos picos obtidos por VRADI para $t_d \leq 360$ s como mostra a Figuras 3.4.9. Porém, para

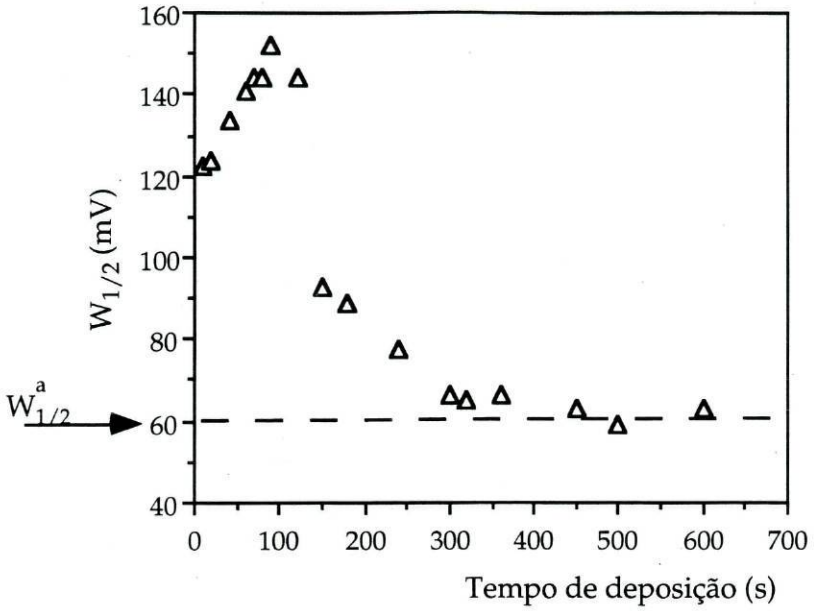


Figura 3.4.9. Variação de $W_{1/2}$ com o t_d para uma solução 18 μmol/L em AH e 0,787 μmol/L em cobre. O valor de $W^a_{1/2}$, *i.e.*, o observado na ausência de ligando foi também incluído. A figura representa os resultados experimentais de uma de duas experiências efectuadas.

valores de t_d mais elevados, os valores de $W_{1/2}$, obtidos (Figura 3.4.9), nas condições experimentais usadas, estão de acordo com o valor teórico[25] e com o facto do valor de ΔE_p tender para zero (Figura 3.4.8), conforme se discutiu anteriormente. Estes resultados são consistentes com a ocorrência de efeitos de superfície[26]. No entanto, a Figura 3.4.10 não evidência o aparecimento de um "ombro" nos voltamogramas, correspondente à formação do complexo como tem sido observado por outros autores[16,26].

Alargamentos dos picos têm sido atribuídos a uma diminuição da reversibilidade do processo electroquímico como resultado de fenómenos de adsorção[27]. Porém, a irreversibilidade do processo electroquímico deveria traduzir-se na manutenção de valores elevados de $W_{1/2}$, mesmo para os valores de t_d mais elevados[28], o que não aconteceu neste caso (ver Figura 3.4.9).

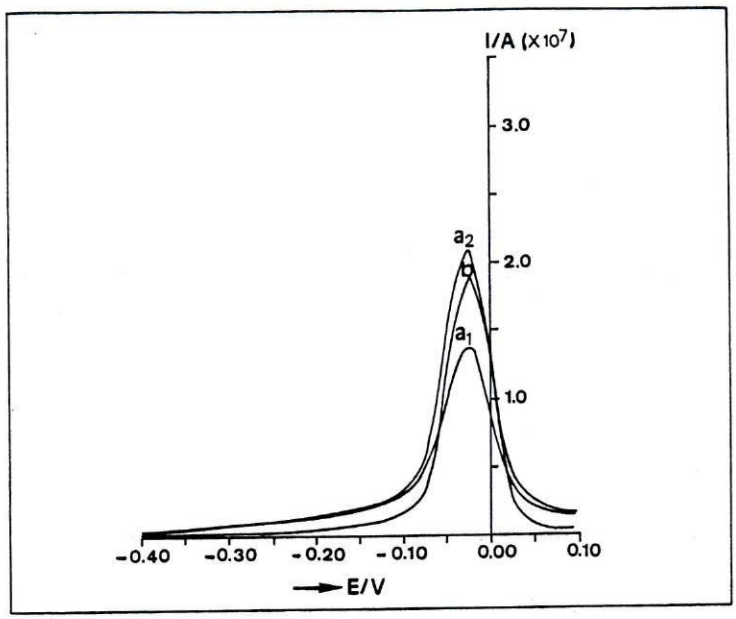


Figura 3.4.10. Voltamogramas obtidos com 0,787 µmol/L de cobre(II) na presença (a) e na ausência (b) de AH 18 µmol/L, a um Ed = -0,4 V *vs.* Ag/AgCl (s) KCl 3 mol/L, para vários t_d : (a_1) t_d = 360 s, (a_2) t_d = 500 s; (b) t_d = 360 s.

Determinação por PRA. As características dos picos obtidos por PRA, não evidenciaram interferências devidas a fenómenos de adsorção dos AH. Efectivamente, as curva de variação de $[(dt/dE)_{max}]$ com t_d (Figura 3.4.11) na presença e na ausência de AH foram paralelas. Por outro lado, a Figura 3.4.8 mostra que os valores de ΔE_p foram muito mais baixos do que os registados por VRADI e que, para valores de t_d baixos, foram próximos dos obtidos por PESC/PDI (para t_d superiores a 120 s, não foi possível prosseguir a experiência porque a concentração de oxidante usada era demasiado baixa).

Influência da concentração de AH na ΔE_p

Os resultados até agora apresentados evidenciaram que a adsorção dos AH à superfície do eléctrodo de mercúrio não teve efeitos notórios nos resultados obtidos por PRA. Para obter mais informação sobre o comportamento da PRA na presença de AH realizaram-se

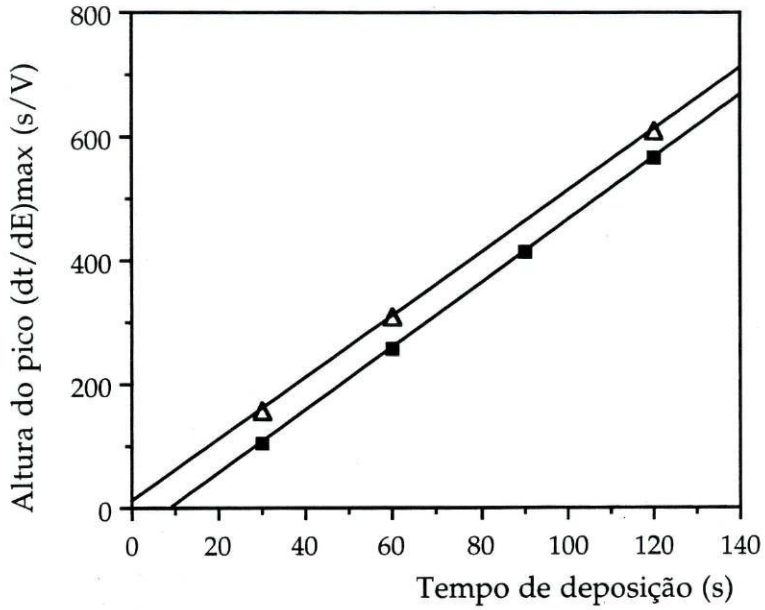


Figura 3.4.11. Influência do t_d na altura do pico [(dt/dE)max] observado por PRA, para concentração de cobre de 0,787 µmol/L , sem (Δ) e com AH (18 µmol/L) (■), a um E_d = 0,4 V vs. Ag/AgCl (s), KCl 3 mol/L. Parâmetros de regressão linear: (Δ) $[(dt/dE)_{max}]$ = (5,0 ± 0,2) t_d + (7 ± 15), R= 0,9999, P = 0,05, n= 3; (■) $[(dt/dE)_{max}]$= (5,1 ± 0,0)t_d + (-48 ± 1), R= 1, P = 0,05, n= 4. A figura representa os resultados experimentais de uma de duas experiências efectuadas.

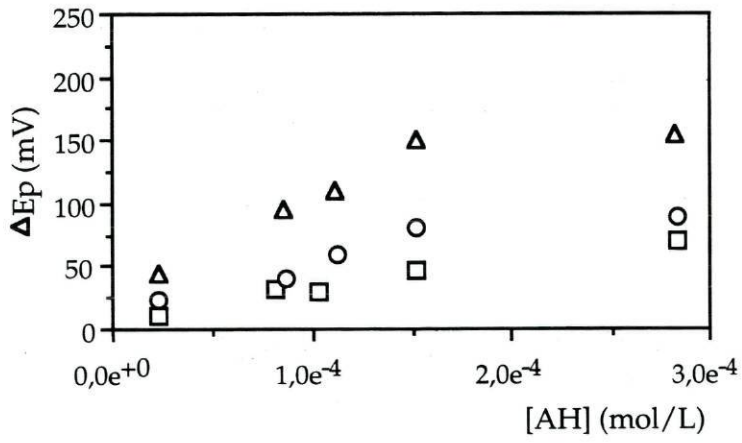


Figura 3.4.12. Variação de ΔE_p ao longo da titulação de cobre(II) 2,20 µmol/L com AH. Resultados obtidos por VRADI (Δ), PRA (O) e PESC/PDI (□) (ver secção 3.4.4.3). A figura representa os resultados experimentais de uma de duas experiências efectuadas.

experiências, em soluções com concentrações de AH mais elevadas, entre 23,0 e 283 μmol/L e uma concentração de cobre(II) constante, 2,20 μmol/L, e mediram-se valores de ΔE_p quer por PRA quer por VRADI. Além disso, para cada um dos valores da razão $[AH]_t/[Cu]_t$ usados estimou-se ΔE_p por PESC/PDI (ver secção 3.4.4.3).

Os resultados obtidos pelas diferentes técnicas são apresentados na Figura 3.4.12. Esta mostra que os valores de ΔE_p obtidos por VRADI foram, para todos os valores de $[AH]_t/[Cu]_t$ muito superiores aos obtidos por PRA e aos valores estimados por PESC/PDI. Por outro lado, para as concentrações de AH mais baixas (< $1x10^{-4}$ mol/L), os valores de ΔE_p obtidos por PRA foram praticamente iguais aos estimados por PESC/PDI. Para concentrações de AH mais elevadas, os valores de ΔE_p obtidos por PRA tornaram-se superiores aos estimados por PESC/PDI. Estes resultados mostram que enquanto em VRADI os fenómenos de adsorção interferem nos resultados em todo o intervalo de valores de concentrações de AH utilizado (entre 22,8 e 283 μmol/L), em PRA as interferências só foram notórias para as concentrações de AH mais elevadas (≥ 100 μmol/L).

A Figura 3.4.12 mostra ainda que o valor de ΔE_p aumentou com a razão $[AH]_t/[Cu]_t$, o que prova que os complexos de cobre(II)-AH apresentaram comportamento lábil na escala de tempo das técnicas analíticas usadas.

De notar, também, que nestas experiências se usaram razões $[AH]_t/[Cu]_t \leq 129$, portanto, muito inferiores a 1000[17,29]. Embora na presença de complexos em que $D_{M_{lig}} < D_M$ como é o caso, deva permitir usar razões $[AH]_t/[Cu]_t < 1000$ dado que $[M]_t^o$ diminui com a diminuição de $D_{M_{lig}}$[16], aos valores utilizados poder-se-ia, em princípio, esperar a ocorrência de fenómenos de superfície. Porém, o facto dos valores de ΔE_p obtidos pelas técnicas de redissolução anódica, nomeadamente por VRADI, terem sido, nestas condições, superiores aos estimados por PESC/PDI indica que os fenómenos de adsorção se sobrepuseram ao efeito de saturação do AH pelo cobre(II).

3.4.4.5 Determinação de parâmetros de complexação

Nas Figuras 3.4.13 A e 3.4.13 B apresentam-se, respectivamente, resultados típicos para dt/dE_{max} =f $[Cu]_t$ (PRA) e para i_p = f $[Cu]_t$ (VRADI), obtidos para soluções de AH 8,28 x 10^{-5} mol/L com diferentes

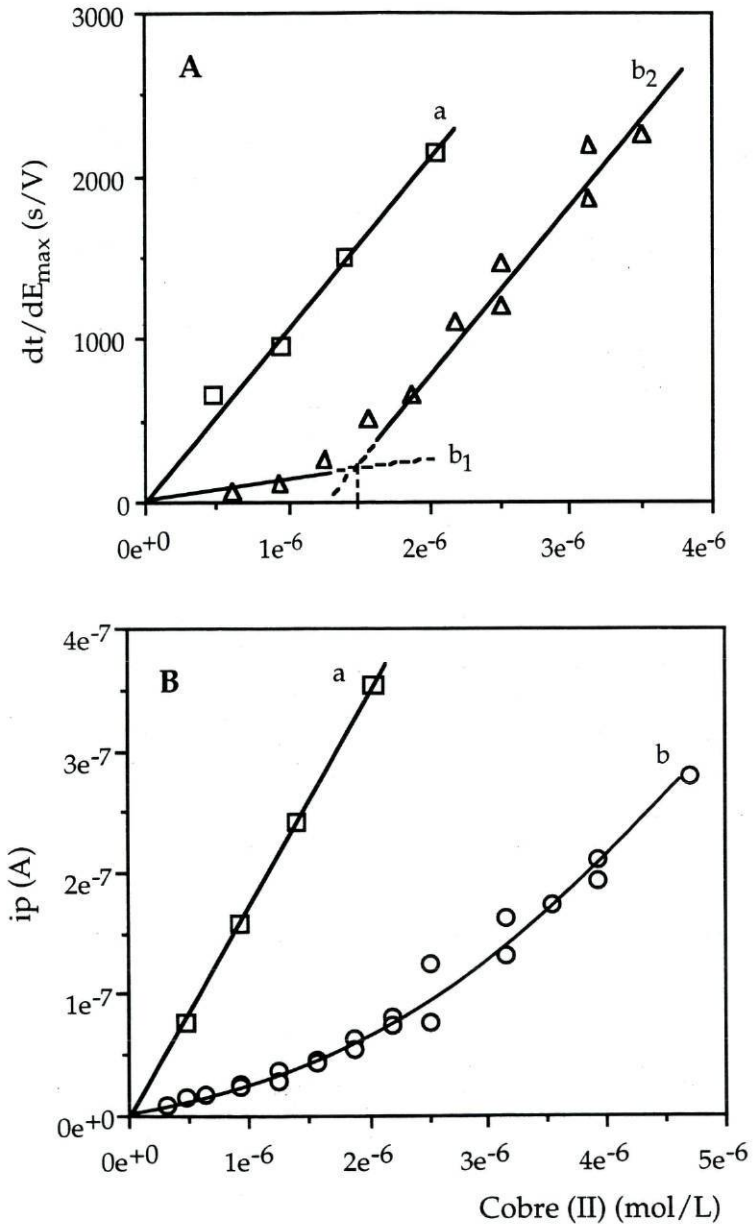


Figura 3.4.13. Variação de $(dt/dE)_{max}$ (**A**) e de i_p (**B**) obtidos por PRA e VRADI, respectivamente, durante a titulação de AH 8,28 x 10^{-5} mol/L com cobre (II): curvas de calibração (□), AH (Δ,○). A figura representa os resultados experimentais de uma de duas experiências efectuadas.

concentrações de cobre(II). As curvas de calibração (curvas a) foram também incluídas nas figuras. A Figura 3.4.13A mostra que, por PRA, foi possível definir dois segmentos de recta, b_1 e b_2, na presença de AH. O declive do segmento b_1 foi menor do que o da curva de calibração, o que se atribuiu ao facto dos coeficientes de difusão dos complexos de cobre-AH serem menores do que o do ião metálico, admitindo que os complexos eram totalmente lábeis. O declive do segmento b_2 foi praticamente idêntico ao da curva de calibração. A intercepção dos segmentos b_1 e b_2 forneceu o valor da concentração de locais de coordenação ocupados pelo cobre(II) nas condições experimentais usadas[1] que foi de *ca.* 1,5 μmol/L, portanto *ca.* 2% da CC determinada por PESC.

Ao contrário do que se observou por PRA, por VRADI (Figura 3.4.13B) não é possível definir uma quebra nítida na curva de titulação, o que se considera uma consequência da interferência dos fenómenos de adsorção dos AH. Este tipo de comportamento encontra-se referido na literatura[3].

Como mostra a Figura 3.4.14 a variação dos valores de E_p ao longo da titulação referida foi maior em VRADI do que em PRA, como já foi discutido na secção 3.4.4.4.

Os dados experimentais obtidos em titulações de AH com cobre(II) foram usados para calcular os valores de log K_{fed} através da equação [49]. No caso das determinações efectuadas por VRADI, os valores de $\{\Delta E_p - [(RT/2F)\ \ln(ip^p/ip^a)]\}$ foram relativamente elevados ($\geq$ 55 mV) em todo o intervalo de concentrações de cobre utilizado ($0{,}63 < [Cu]_t < 2{,}2$ μmol/L, ver Figuras 3.4.13B e 3.4.14). Por este motivo, foi sempre usada a equação [8] para calcular α. No caso da PRA, a equação [8] só foi utilizada quando $[Cu]_t < 0{,}94$ μmol/L e $\{\Delta E_p - [(RT/2F)\ \ln[(dt/dE)^p/(dt/dE)^a]]\} \geq 64$ mV. Nos restantes pontos da titulação, os valores de α foram calculados através das equações [11] e [16] (em que i_p foi substituído por dt/dE) e do balanço material do metal (equação [15]), uma vez que os valores de $\{\Delta E_p - [(RT/2F)\ \ln[(dt/dE)^p/(dt/dE)^a]]\}$ eram inferiores a dez vezes o erro experimental

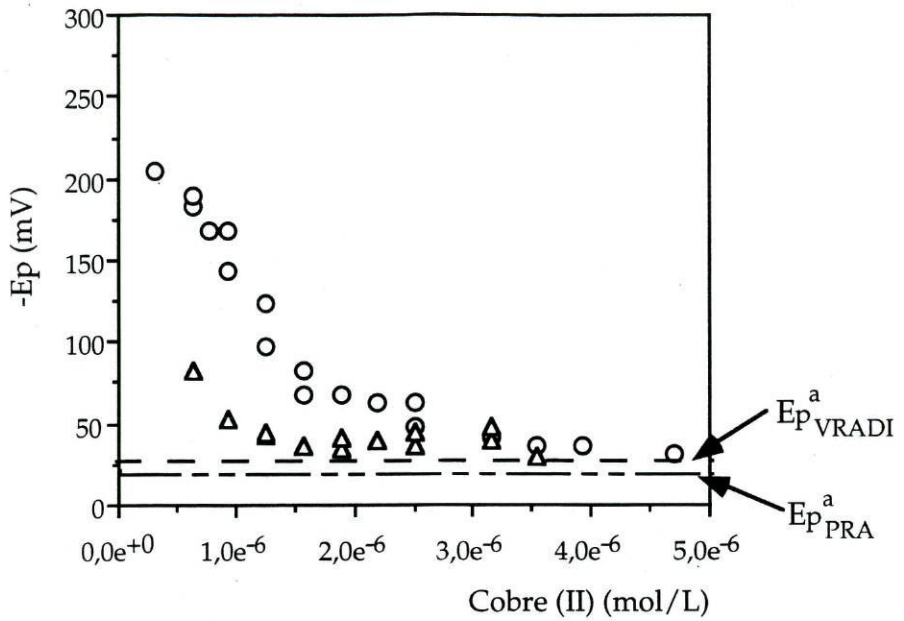


Figura 3.4.14. Variação de E_p obtida por PRA (Δ) e VRADI (O) ao longo da titulação de 8,28 x 10^{-5} mol/L em AH com cobre(II). Os valores de E_p^a obtidos por cada uma das técnicas são também mostrados. A figura representa os resultados experimentais de uma de duas experiências efectuadas.

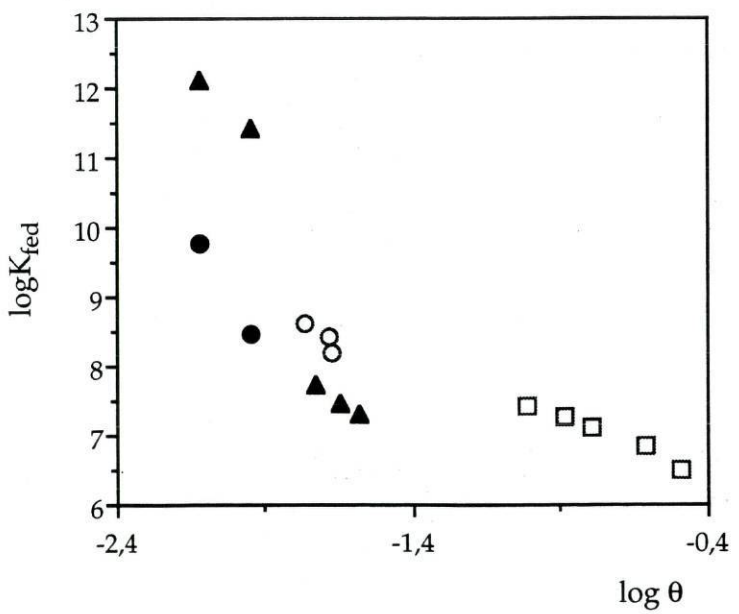


Figura 3.4.15. Comparação dos valores de log K_{fed} obtidos para os complexos de cobre(II)-AH por PESC (□), VRADI (▲) e PRA (●,O). Neste último caso, os valores de log K_{fed} foram calculados a partir das equações [8] (●) e [11], [15] e [16] (O), respectivamente.

associado à medição do potencial (≅ 5 mV). Na Figura 3.4.15 apresentam-se os valores de log K_{fed} em função de log θ (ver equação [44]) obtidos por PRA e por VRADI para soluções com uma concentração $[AH]_t = 8{,}28 \times 10^{-5}$ mol/L e $[Cu]_t$ variáveis no intervalo entre 0,63 e 2,2 μmol/L. Para fins comparativos, os resultados obtidos por PESC para a solução de [AH] $1{,}5 \times 10^{-4}$ mol/L e $[Cu]_t$ entre 2,10 e 3,90 μmol/L foram incluídos na figura.

A Figura 3.4.15 mostra que os valores de log K_{fed} diminuem quando aumenta o valor de θ, como é habitual no caso de ligandos heterogéneos[30], como é o caso dos AH. A figura mostra ainda que os valores da função de log K_{fed} = f (log θ) obtidos por PRA e por PESC se ajustam a uma mesma isotérmica, cuja forma é típica de sistemas químicos envolvendo ligandos poliméricos naturais[13,22,26,31]. Pelo contrário, os valores da mesma função obtidos por VRADI são muito dispares dos restantes, principalmente para os valores de θ mais baixos.

A compatibilidade aceitável observada entre os resultados obtidos por PESC e por PRA sugere que a adsorção dos AH à superfície do eléctrodo não afectou os resultados para o valor de concentração de AH usado (82,8 μmol/L).

3.4.5. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou que os AH utilizados eram marcadamente adsorvidos à superfície do eléctrodo de mercúrio, mesmo a concentrações relativamente baixas e que a adsorção era máxima próximo da zona de potencial de carga nula. Além disso, os AH não apresentaram características electroactivas até -1,0 V.

Apesar disso, para concentrações de AH relativamente baixas (≤ 0,1 mmol/L) os fenómenos de adsorção não interferiram nos parâmetros de complexação cobre(II)-AH determinados por PRA embora tenham interferido acentuadamente nos obtidos por VRADI. Parece, portanto, poder-se concluir que a PRA poderá ser vantajosa, para a determinação de parâmetros de complexação na presença de substâncias surfactantes.

REFERÊNCIAS

1- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 9.

2- J. Buffle, A. Cominoli, F.L. Greter e W Haerdi, *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **February**, 59 (1978).

3- F.L. Greter, J. Buffle e W. Haerdi, *J. Electroanal. Chem.*, **101**, 211 (1979).

4- P.L. Brezonik, P.A. Brauner e W. Stumm, *Wat. Res.*, **10**, 605 (1976).

5- M.C. Montemayor e E. Fatas, *J. Electroanal. Chem.*, **246**, 271 (1988).

6- J. Buffle e A. Cominoli, *J. Electroanal. Chem.*, **121**, 273 (1981).

7- J. Buffle e F.L. Greter, *J. Electroanal. Chem.*, **101**, 231 (1979).

8- T. M. Florence, *Analyst*, **111**, 489 (1986).

9- J. Buffle, A. M. Mota e M. L. S. Simões Gonçalves, *J. Electroanal. Chem.*, **223**, 235 (1987).

10- H.M.V.M. Soares e M.T. Vasconcelos, *Anal. Chim. Acta*, **303**, 255 (1995).

11- H.M.V.M. Soares e M.T. Vasconcelos, *Anal. Chim. Acta*, aceite para publicação em 1995.

12- J. Buffle, "Complexation reaction in aquatic systems: an analytical approach", Ellis Horwood, Chichester,1988, cap. 6.

13- M. Filella, J. Buffle e H. P. van Leeuwen, *Anal. Chim. Acta*, **232**, 209 (1990).

14- J. Buffle, *em* "The determination of trace metals in natural waters", T.S. West e H.W. Nurnberg, Eds., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988, cap. 6.

15- A.M.Mota, J.P. Pinheiro e M.L.S. Gonçalves, *Wat. Res.*, **28**, 1285 (1994).

16- M.G. Bugarin, A.M. Mota, J.P. Pinheiro e M.L.S. Gonçalves, *Anal. Chim. Acta*, **294**, 271 (1994).

17- A.M. Almeida Mota, J. Buffle, S.P. Kounaves e M.L.S.S. Gonçalves, *Anal. Chim. Acta*, **172**, 13 (1985).

18- W. Davison, *J. Electroanal. Chem.*, **87**, 395 (1978).

19- J.R. Tuschall e P.L. Brezonik, *em* "Aquatic and terrestrial humic materials", R.F. Christman e E.T. Gjessing, Eds., Ann Arbor Science, Michigan, 1983, cap.13.

20- T. A. Neubecker e H.E. Allen, *Water Res.*, **17**, 1 (1983).

21- I. Ruzic, *Anal. Chim. Acta*, **140**, 99 (1982).

22- J.P. Pinheiro, A.M. Mota, M.S. Gonçalves e H.P. van Leeuwen, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 2112 (1994).

23- J. Buffle, J.J. Vuilleumier, M.L. Tercier and N. Parthasarathy, *Sci. Total Environ.*, **60**, 75 (1987).

24- Z. Galus, *Pure and Appl. Chem.*, **56**, 635 (1984).

25- E.P. Parry e R.A. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **37**, 1634 (1965).

26- M. Bejarano, A.M. Mota, M.L.S. Gonçalves e L. Madrid, *Sci. Tot. Environ.*, **158**, 9 (1994).

27- J. Wang, "Stripping analysis, principles, instrumentation and applications", VCH Publishers, Florida,1985, cap. 4.

28- J. Labuda, D. Saur e R. Neeb, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **348**, 312 (1994).

29- J. Buffle, A.M. Mota e M.L. Gonçalves, *Portugaliae Electrochimica Acta*, **3**, 293 (1985).

30- J. Buffle e R. S. Altmann, *em* "Aquatic Surface Chemistry", W. Stumm, Ed., John Wiley and Sons, New York, 1987, cap. 13.

31- C.M.S. Botelho, R.A.R. Boaventura e M.L.S.S. Gonçalves, *Sci. Total Environ.*, **149**, 69 (1994).

CAPÍTULO 3.5

Especiação de Cobre em Meios de Cultura da Microalga Marinha Amphidinium carterae e sua Influência na Toxicidade do Metal

3.5.1 INTRODUÇÃO

3.5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.3.1 Optimização do método para determinação de cobre por EAA-AE em amostras de microalgas marinhas

3.5.3.2. Estudo da influência da especiação do cobre(II) na sua toxicidade para *Amphidinium carterae*

3.5.4 CONCLUSÕES

3.5.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Amphidinium carterae* é uma microalga marinha dinoflagelada que faz parte do fitoplâncton presente no litoral norte de Portugal, em particular na zona costeira do Porto, onde desaguam directa ou indirectamente efluentes domésticos e industriais e onde existe um porto de mar importante. Como o primeiro impacto dos metais pesados se faz na base da cadeia trófica, os estudos de especiação *versus* toxicidade a este nível são muito importantes[1].

Metais pesados, como o cobre, são rapidamente adsorvidos à superfície das células e difundem-se lentamente através da membrana celular para o interior das mesmas[2]. Um dos processos de entrada de metais nos sistemas biológicos consiste no transporte, através da membrana citoplasmática, por difusão facilitada: na parte exterior da membrana citoplasmática o metal liga-se, fracamente, a uma molécula receptora formando um complexo hidrofóbico com o metal hidrofílico,

permitindo a difusão deste através da membrana citoplasmática. Uma vez na parte interna da membrana, o metal é libertado para o citoplasma[1, 3]. A fracção de metal que é assimilado pelo microrganismo depende da fracção biodisponível e esta, por sua vez, depende da afinidade relativa do metal para os ligandos presentes em solução e para a molécula receptora.

Para avaliar a biodisponibilidade de espécies metálicas para microrganismos, os ensaios biológicos afiguram-se os melhores métodos, por razões óbvias. No entanto, tais ensaios são normalmente morosos, dispendiosos e pouco precisos. Além disso, fenómenos ligados à actividade biológica mascaram parcialmente os resultados, dificultando ou impossibilitando a sua interpretação. Por isso, é vantajoso complementar a informação biológica com informação de natureza química. A procura de métodos químicos capazes de avaliar a biodisponibilidade das espécies químicas tem vindo a suscitar um interesse crescente na comunidade científica[4-6], sendo as técnicas de superfície, designadamente as electroquímicas (e cromatográficas) as mais usadas para esse fim.

O processo de fixação de metais a microrganismos tem algumas semelhanças com o processo de deposição do metal nas técnicas electroquímicas de redissolução anódica, conforme se ilustra na Figura 3.5.1. Nestas técnicas, a dissociação do complexo ocorre na camada de difusão (δ); o metal, na forma livre, dirige-se ao eléctrodo de trabalho através da camada de difusão e nele se deposita após redução ao estado de oxidação zero[3,4].

As ligações dos iões metálicos às moléculas receptoras da membrana citoplasmática são relativamente fracas[1]. Como nas técnicas de redissolução anódica a labilidade de um dado complexo depende, entre outros parâmetros, do valor do potencial de deposição aplicado, aumentando à medida que este se torna mais negativo, quando se pretende avaliar a biodisponibilidade através de medições de labilidade, o potencial de deposição a utilizar deverá ser o menos negativo possível.

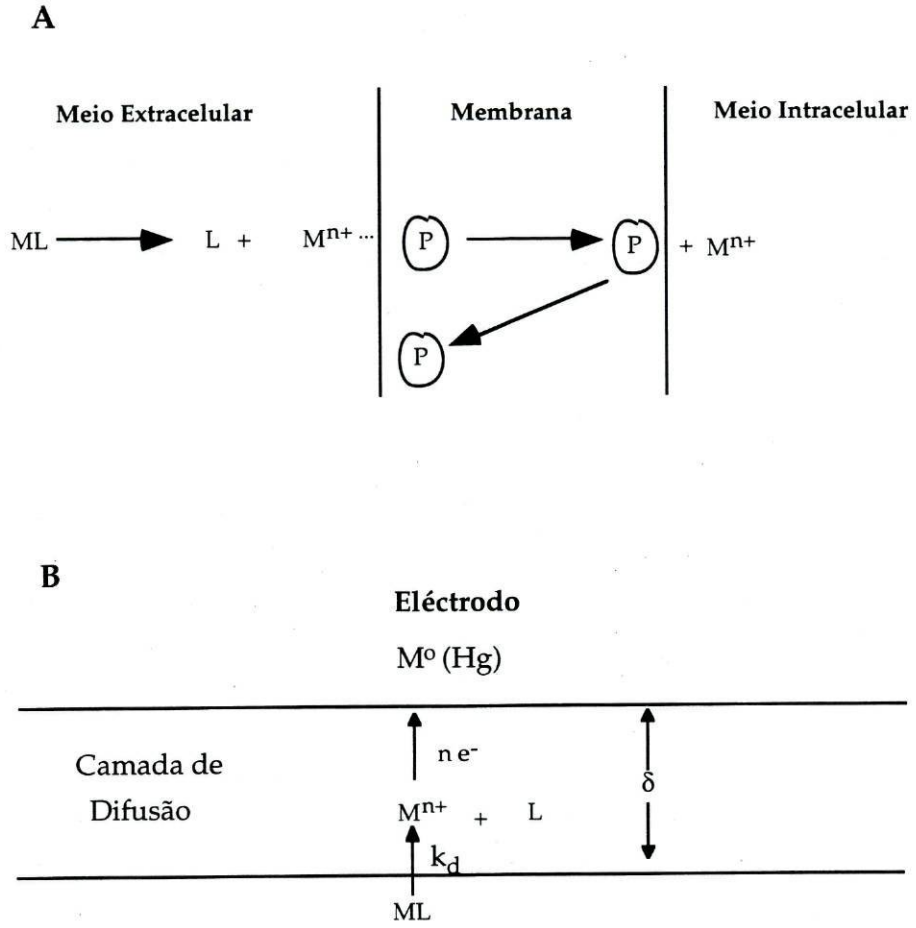


Figura 3.5.1. Comparação entre o transporte do metal, por difusão facilitada, através da membrana celular (**A**) e o processo de deposição do metal nas técnicas electroquímicas de redissolução anódica (**B**). L: ligando existente no meio extracelular, P: ligando biológico. As cargas dos iões, foram omitidas, excepto a do catião metálico, para simplificar. Adaptado das referências[3,4].

Neste capítulo apresentam-se os resultados dum estudo cujo objectivo foi avaliar a influência da especiação do cobre na respectiva toxicidade para culturas de *Amphidinium carterae* desenvolvidas em água do mar sintética, em sistema fechado. Na prossecução desse objectivo, realizaram-se as seguintes determinações de natureza química: (i) especiação computacional, com base em dados de equilíbrio químico, tendo em conta todas as espécies químicas de existência maioritária na água do mar sintética usada como meio de cultura; (ii) labilidade electroquímica do cobre(II) obtida por PRA (E_d = -0,3 V) nos meios de cultura após diferentes períodos de tempo de contacto do

metal com as células, incluindo o tempo zero; (iii) concentrações totais de cobre (e zinco) fixados às microalgas.

Os estudos aqui apresentados inserem-se num projecto interdisciplinar, realizado em colaboração com investigadores do Instituto de Botânica e do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto.

São apresentados alguns resultados de ensaios biológicos, da responsabilidade do grupo acima referido (que, portanto, não fazem parte desta dissertação), para complementar a informação e facilitar a discussão dos resultados.

3.5.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todos os ensaios químicos e biológicos, foram acompanhados de brancos. No texto que se segue os brancos serão designados por *controlos*.

O crescimento das células foi realizado em água do mar sintética, à temperatura de 20 ± 1 °C, com um regime de obscuridade/dia de 12:12 h e com uma densidade de fluxo de fotões de 30 μmol x m^{-2} x s^{-1} (O.M. Lage, comunicação pessoal).

A avaliação do crescimento celular foi realizado em amostras fixadas em formaldeído por contagem do número de células, num contador de partículas da marca Coulter modelo ZM (O.M. Lage, comunicação pessoal).

As células encontravam-se em fase exponencial de crescimento no momento da adição de cobre(II). O efeito do cobre sobre a microalga *Amphidinium carterae* foi estudado para soluções com concentração de EDTA constante, 14,9 μmol/L e concentrações de cobre entre 0,898 e 15,7 μmol/L [preparadas a partir de uma solução 0,160 mmol/L de cloreto de cobre(II) (Lage, comunicação pessoal)]. Efectuaram-se dois tipos de ensaios, ambos a pH = 8 (tamponado com HEPES 25 mmol/L): num deles, que se passa a designar de *situação com pré-equilíbrio*, o

cobre(II) foi adicionado à água do mar sintética que já continha EDTA, 24 horas antes de se adicionar as células a esse meio; no outro, que se passa a designar de *situação sem pré-equilíbrio*, as células foram adicionadas à água do mar sintética (com EDTA) duas horas antes de se adicionar o cobre(II).

A labilidade electroquímica dos complexos de cobre(II) no meio de cultura foi avaliada por PRA a E_d = -0,3 V e t_d = 3 minutos. Como agente oxidante para a fase de redissolução utilizaram-se concentrações de mercúrio(II) de 3,15 ou 3,78 µmol/L (obtida por adição de 31,5 ou 37,8 µL de uma solução 2,0 mmol/L de cloreto de mercúrio(II)).

Paralelamente, quantificou-se o cobre total no meio de cultura e nas células (ver secção 2.2.4.4). Para determinar as concentrações de cobre (e zinco) fixados pelas microalgas marinhas, retiraram-se tomas de 50 mL de culturas. Filtrou-se cada toma através de um filtro de nitrato de celulose com 0,45 µm de porosidade, da marca Millipore, e lavaram-se as microalgas depositadas no filtro com 30 mL de água desionizada. Os filtros foram secos em estufa a temperatura $\leq$ 60 °C e seguidamente atacados com 1 mL de ácido nítrico, em sistema de microondas em vaso fechado com aplicações de 250, 400 e 500 W durante períodos sucessivos de 5 minutos cada. Após o ataque, a amostra era arrefecida, transferida quantitativamente para um balão volumétrico e diluída com água desionizada a um volume conveniente para análise (normalmente 20 mL).

Fizeram-se também simulações computacionais dos equilíbrios químicos (ver secção 2.3.6). Para tal, atendeu-se aos equilíbrios maioritários que se previa existirem no meio de cultura, com base na sua composição química conhecida (ver um exemplo de matriz de dados utilizada e dos respectivos resultados no apêndice 4). Devido à elevada complexidade do meio utilizado, as simulações computacionais envolveram algumas aproximações: (i) as constantes de estabilidade usadas, obtidas na literatura, não foram determinadas exactamente nas condições experimentais deste trabalho; (ii) foram considerados apenas os equilíbrios em sistema homogéneo (fase líquida); (iii) vários equilíbrios (os menos importantes para a

especiação) não foram considerados; (iv) os exudados e células mortas foram ignorados por falta de informação química sobre a sua composição e desempenho como ligandos. Em consequência, os resultados das simulações devem ser considerados apenas uma estimativa aproximada da especiação real do metal no meio de cultura.

3.5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.3.1 Optimização do método para determinação de cobre por EAA-AE em microalgas marinhas

Antes de iniciar as determinações de cobre total em microalgas foi necessário optimizar e/ou testar a ausência de interferências no método analítico.

Optimização do programa de temperaturas do atomizador electrotérmico

Para estabelecer o programa de temperaturas do atomizador electrotérmico a utilizar, começou-se por traçar as rampas de pirólise e de atomização seguindo o processo habitual[7]. Para tal, usou-se uma solução padrão de cobre(II) 0,315 µmol/L em ácido nítrico a 2,3 % (m/v) e uma amostra de microalgas, cuja concentração de cobre foi, posteriormente, quantificada como sendo 0,315 µmol/L. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 3.5.2. e 3.5.3, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos seleccionaram-se as temperaturas 1100 e 1900 °C para temperaturas máximas de pirólise e de atomização, respectivamente. Para temperaturas de pirólise superiores a 1100 °C já se verificava perda do analito e para temperaturas de atomização superiores a 1900 °C não se verificava aumento da sensibilidade e haveria consumos de energia e desgaste da câmara de grafite mais elevados. Outros detalhes do programa final encontram-se na secção 2.2.4.4.

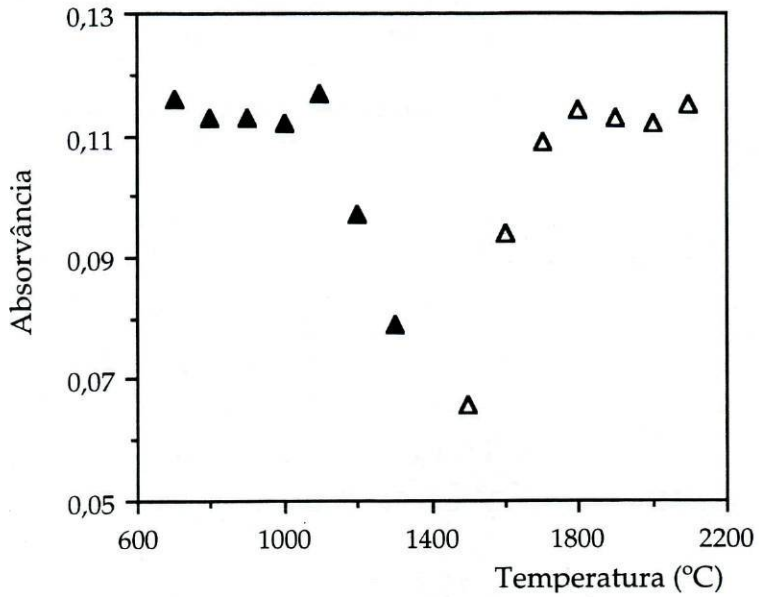


Figura 3.5.2. Estudo das rampas de temperatura de pirólise (▲) (temperatura de atomização 1900 °C durante 5 s) e de atomização (Δ) (temperatura de pirólise 1100 °C durante 20 s) para uma solução padrão de cobre 0,315 µmol/L.

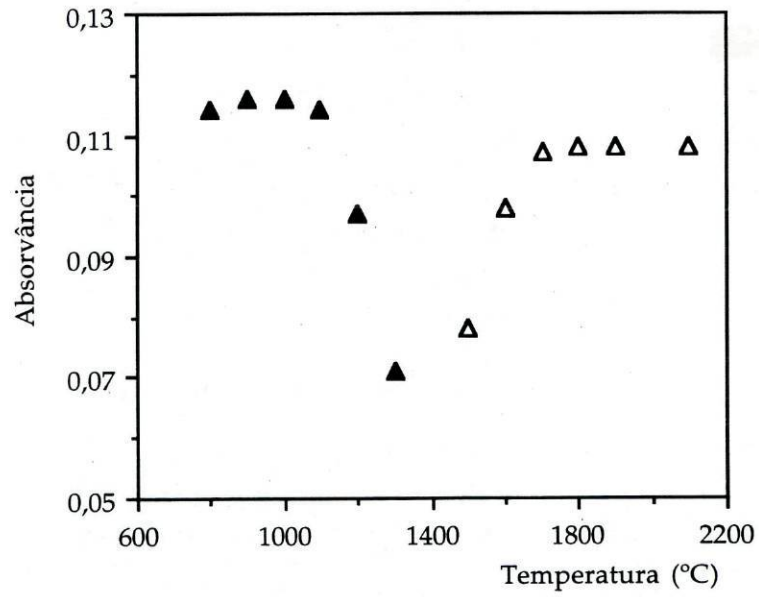


Figura 3.5.3. Estudo das rampas de temperatura de pirólise (▲) (temperatura de atomização 1900 °C durante 5 s) e de atomização (Δ) (temperatura de pirólise 1100 °C durante 20 s) para uma amostra de microalgas, cuja concentração de cobre foi, posteriormente, quantificada em 0,315 µmol/L .

Influência da concentração do ácido nítrico no sinal analítico do cobre

Como o ataque das amostras de microalgas foi efectuado com ácido nítrico, impunha-se fazer um estudo da influência da concentração deste nas condições experimentais usadas. Para tal, analisaram-se soluções padrão de 0,315 µmol/L para concentrações de ácido nítrico variadas entre 0,00 e 4,6 % (m/v) (Figura 3.5.4). Verificou-se que no intervalo entre 0,46 e 4,6 % (m/v), o sinal analítico praticamente não era afectado pela concentração do ácido. Em face destes resultados, nas determinações posteriores, os padrões e o branco foram preparados com uma concentração de ácido nítrico da ordem de 0,46 %.

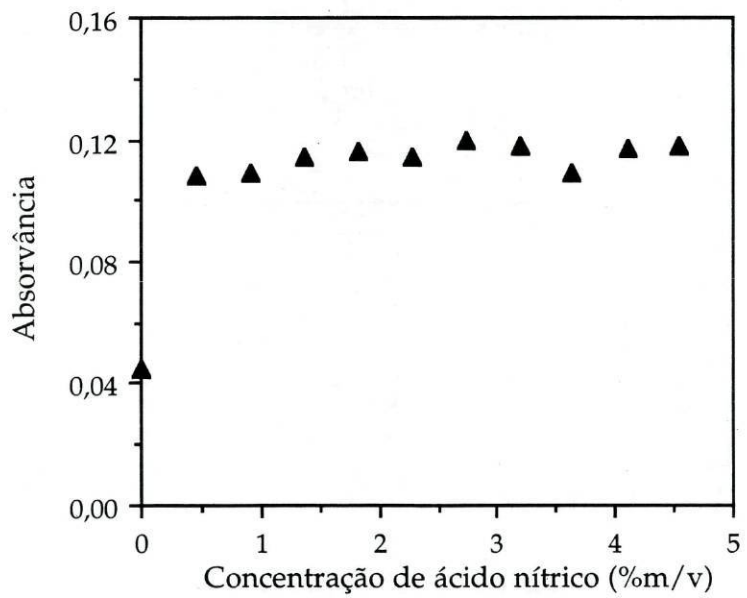


Figura 3.5.4. Estudo da influência da concentração de ácido nítrico no sinal analítico do cobre 0,315 µmol/L (ver programa de temperaturas na secção 2.2.4.4).

Verificação da ausência de outras interferências químicas

Para verificar a ausência de interferências químicas, compararam-se os níveis de cobre em microalgas obtidos pelo método da adição de padrão com os obtidos através de curva de calibração traçada com padrões aquosos acidulados. Os resultados obtidos são

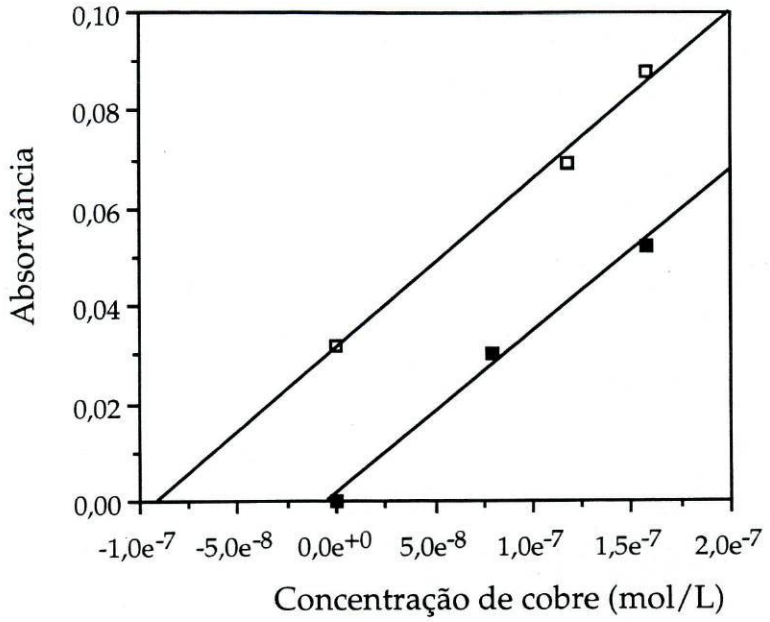


Figura 3.5.5. Comparação dos métodos da curva de calibração (■) e de adição de padrão (□). Equação da recta de calibração: Absorvância= (1 ± 3) x 10^{-3} + (3,3 ± 0,3)x 10^{5} [cobre, mol/L], R = 0,997, P = 0,05, n = 0,03; equação da recta referente ao método de adição do padrão: Absorvância= (3,2 ± 0,3) x 10^{-2} + (3,4 ± 0,2) x 10^{5} [cobre, mol/L], R = 0,998, P = 0,05; n = 3).

apresentados na Figura 3.5.5. Uma vez que os declives das rectas obtidas por adição de padrão, (3,4 ± 0,2) x 10^{5} L/mol, e pela curva de calibração, (3,3 ± 0,3) x 10^{5} L/mol, foram estatisticamente iguais (P= 0,05), concluiu-se que não deveriam existir interferências químicas importantes. Por conseguinte, as determinações passaram a ser realizadas com base na curva de calibração, o que simplificou o procedimento analítico.

3.5.3.2 Estudo da influência da especiação do cobre(II) na sua toxicidade para *Amphidinium carterae*

O efeito tóxico do cobre para culturas de *Amphidinium carterae* foi estudado nas situações com e sem pré-equilíbrio entre cobre(II) e EDTA (descritas na secção 3.5.2). Embora a primeira situação deva ocorrer com maior frequência no meio aquático, a segunda corresponde ao momento da introdução de metais pesados, por exemplo, na forma de efluentes industriais e domésticos. Além disso, a

situação sem pré-equilíbrio corresponde a uma forma tradicional de abordagem em Microbiologia.

Resultados dos estudos biológicos

Em ambos os tipos de experiências foi quantificado o crescimento celular durante um período de dez dias após adição de cobre(II) em concentrações variadas entre 0,898 e 15,7 μmol/L.

Na situação com pré-equilíbrio e para concentrações totais de cobre(II) $\leq$ 7,87 μmol/L, as curvas de crescimento foram sobreponíveis com a do controlo, indicando que não houve efeitos tóxicos. Para a concentração total de cobre(II) de 11,8 μmol/L observou-se apenas um discreto retardamento inicial do crescimento (resultados não mostrados). Na presença de 13,4 μmol/L de cobre(II) total observou-se um retardamento do crescimento nos primeiros quatro dias, seguido de crescimento exponencial (Figura 3.5.6). Este comportamento poderá ser explicado por uma inibição inicial da divisão celular devido ao cobre, a qual foi restabelecida pelas células após resposta metabólica à acção tóxica do metal[8]. De referir que no dinoflagelado *Prorocentrum micans* foram observadas alterações estruturais nos cloroplastos, mitocôndrias e dictiossomas, locais de grande actividade metabólica (nomeadamente fotossíntese, respiração e produção de ATP), que são indicativas de alterações metabólicas[9]. A Figura 3.5.6 mostra que na presença de 15,7 μmol/L de cobre(II) total não houve praticamente crescimento durante toda a experiência (dez dias).

Nas situações sem pré-equilíbrio (resultados não mostrados) e para valores de concentrações totais de cobre(II) de 6,20 e 7,87 μmol/L, verificou-se um retardamento inicial do crescimento semelhante ao observado para a concentração de 11,8 μmol/L em situação de pré-equilíbrio. Para concentrações totais de cobre(II) de 11,8 e 13,4 μmol/L, os perfis de crescimento foram semelhantes ao obtido para a concentração de 13,4 μmol/L em situação com pré-equilíbrio. Para a concentração de 15,7 μmol/L, o perfil de crescimento foi semelhante ao obtido com pré-equilíbrio para a mesma concentração.

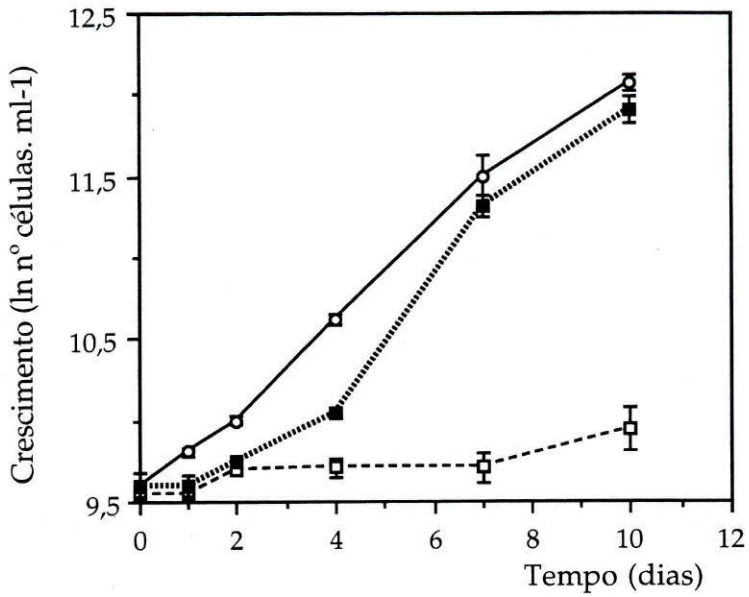


Figura 3.5.6. Influência do cobre(II) no crescimento de *Amphidinium carterae*. Resultados (média e desvio padrão, n = 3) observados a partir do momento da adição de cobre(II). (O) Controlo, (■) 13,4 e (□) 15,7 mmol/L de cobre(II) com pré-equilíbrio (O.M. Lage, comunicação pessoal).

A toxicidade do cobre(II) foi também avaliada através do $^4EC_{50}$ (concentração total de cobre(II) necessária para reduzir o crescimento a 50% do observado no controlo ao fim de 4 dias) tendo sido diferente nas situações sem e com pré-equilíbrio: $^4EC_{50}$ = 13,6 e 15,1 µmol/L, respectivamente.

Na Figura 3.5.7 mostra-se a percentagem de crescimento observada, ao fim de quatro dias de exposição, nas duas situações relativamente ao observado no controlo, com o objectivo de evidenciar a influência do modo de adição do cobre ao meio de cultura (*i.e.* com ou sem pré-equilíbrio) nos efeitos tóxicos respectivos.

Interpretação dos resultados com base na especiação química do metal calculada

A Tabela 3.5.1 mostra como variou a percentagem de cobre(II) (e de outros catiões metálicos presentes no meio) na forma de complexos de EDTA com a concentração total de cobre(II) em situação com

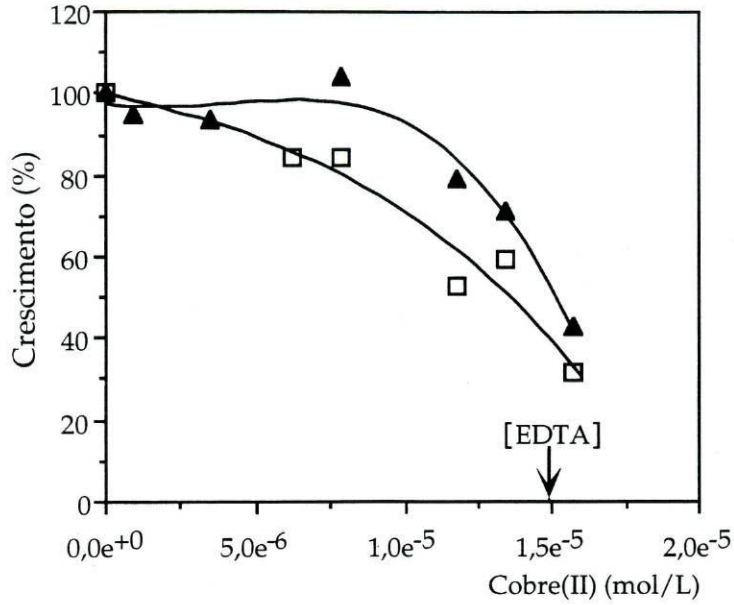


Figura 3.5.7. Variação do crescimento celular ao fim de quatro dias (ver método de cálculo no texto) em função da concentração total de cobre: com (▲) e sem (□) pré-equilíbrio.

pré-equilíbrio. Os dados da Tabela 3.5.1 são complementados com os da Tabela 3.5.2, onde se apresentam as concentrações de cobre(II), manganês(II) e zinco(II) em formas lábeis (*i.e.* livre e complexado com ligandos inorgânicos).

Situação com pré-equilíbrio. Para as concentrações totais de cobre(II) mais baixas ($\leq$ 7,87 µmol/L), não se observou qualquer efeito negativo no crescimento, o que terá resultado da maior parte deste metal ($\geq$ 98,3) se encontrar ligado ao EDTA. Por exemplo, para uma concentração total de cobre(II) de 3,45 µmol/L, a soma do metal livre (49,8 pmol/L) mais o complexado a ligandos inorgânicos era apenas de 24 nmol/L. Efectivamente, o EDTA (14,9 µmol/L) estava em excesso não só relativamente a cobre(II) mas também ao somatório das concentrações de todos os outros metais com afinidade elevada para o EDTA (ferro(III), zinco(II) e manganês(II)), cujo valor era de 12,7 µmol/L. Para concentrações de cobre(II) superiores a 7,87 µmol/L mas inferiores à concentração de EDTA, quer a concentração de cobre(II) livre quer a do metal lábil calculado aumentou exponencialmente com

Tabela 3.5.1. Variação das concentrações dos vários complexos metal-EDTA, obtidas por cálculo computacional com a concentração total de cobre(II) na solução de água do mar sintética contendo 14,9 µmol/L de EDTA.

	[metal-EDTA]/[EDTA]$_t$ (%)						[metal-EDTA]/[metal]$_t$ (%)					
[Cu]$_t$ (µmol/L)	0,898	3,45	7,87	11,8	13,4	15,7	0,898	3,45	7,87	11,8	13,4	15,7
Ca	41,5	27,7	5,90	2,02	1,30	0,772	$6,75\times10^{-2}$	$4,50\times10^{-2}$	$9,59\times10^{-3}$	$3,29\times10^{-3}$	$2,11\times10^{-3}$	$1,26\times10^{-3}$
Mg	2,71	1,81	0,384	0,132	$8,48\times10^{-2}$	$5,04\times10^{-2}$	$8,5\times10^{-4}$	$5,69\times10^{-4}$	$1,21\times10^{-4}$	$4,16\times10^{-5}$	$2,67\times10^{-5}$	$1,59\times10^{-5}$
Cu	6,01	23,1	52,1	72,5	78,5	84,6	99,5	99,3	98,3	91,3	87,1	80,1
Fe	42,3	41,5	37,8	23,4	18,5	13,3	95,9	93,9	85,5	53,0	41,9	30,0
Mn	5,73	4,32	2,12	0,420	0,272	0,163	35,2	26,6	13,0	2,58	1,67	0,999
Zn	1,70	1,69	1,67	1,46	1,35	1,18	99,2	98,8	97,5	85,6	79,1	69,3

Tabela 3.5.2. Logaritmo das concentrações de metal lábil calculadas, na água do mar sintética, para o intervalo de concentrações totais de cobre(II) usado.

$[Cu]_t$ (µmol/L)	0,898	3,45	7,87	11,8	13,4	15,7
Metal			-log $[metal]_{lábil}$			
Mn	5,80	5,75	5,68	5,63	5,62	5,62
Zn	8,68	8,51	8,20	7,44	7,28	7,11
Cu	8,38	7,62	6,88	5,99	5,76	5,50

a respectiva concentração total (ver Figura 3.5.8). À medida que a concentração total de cobre(II) aumentava, o efeito competitivo deste metal pelo EDTA tornava-se progressivamente mais importante, deslocando este ligando de complexos com outros metais (cálcio(II) ≅ magnésio(II) > manganês(II) > ferro(III) > zinco(II)) (Tabelas 3.5.1 e 3.5.2). Porém, o aumento da concentração lábil dos outros metais foi muito menos extensa do que a do cobre.

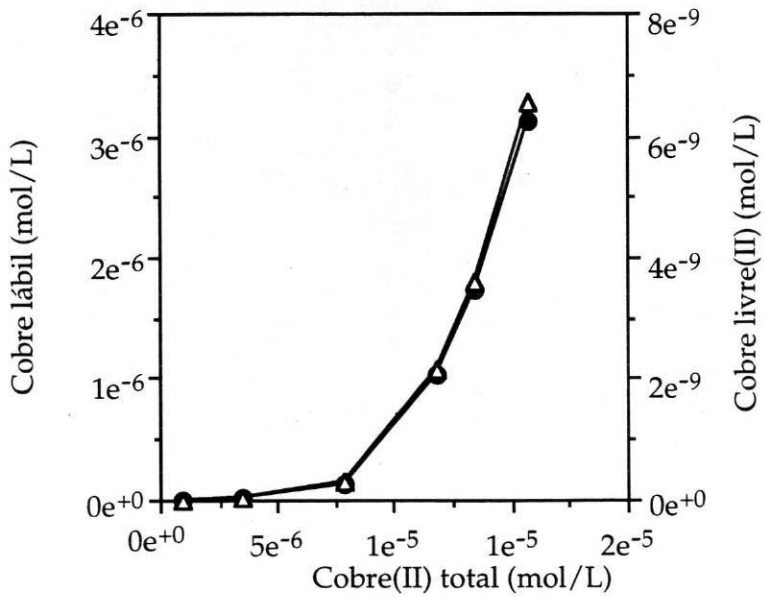


Figura 3.5.8. Variação das concentrações de cobre(II) livre (Δ) e lábil calculados (●), com a concentração total de cobre(II) em água do mar sintética.

Situação sem pré-equilíbrio. A Figura 3.5.7 evidência que, quando o cobre foi adicionado sem pré-equilíbrio a redução do crescimento ocorreu em maior extensão e para níveis de metal mais baixos do que na situação com pré-equilíbrio. Estes resultados foram interpretados do seguinte modo: no momento da adição do cobre(II) ao meio, a maior parte do EDTA encontrava-se ligado aos metais alcalino-terrosos e aos restantes metais pesados. Como as cinéticas de dissociação dos respectivos metais são relativamente lentas[10], num período inicial de contacto do metal com as células, uma fracção apreciável de cobre(II) encontrava-se na forma livre e de complexos inorgânicos, portanto presumivelmente biodisponível. Após o estabelecimento do equilíbrio químico entre as espécies em solução e, dado que o complexo cobre(II)-EDTA é termodinamicamente muito mais estável do que a maioria dos restantes complexos de EDTA[11], a maior parte do cobre(II) passou a estar ligado a este quelante.

Suporte experimental para a interpretação dos resultados acima apresentados foi encontrado nas experiências discutidas a seguir.

Para os meios de cultura que continham 13,4 µmol/L de cobre total, a fracção lábil deste metal foi determinada por PRA a E_d = -0,3 V ao longo das experiências em discussão. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 3.5.9. que mostra que, durante a primeira hora de contacto do metal com as células, a quantidade de cobre lábil na situação sem pré-equilíbrio foi duas a três vezes superior à observada com pré-equilíbrio. Após duas horas de contacto, a concentração de cobre lábil tinha diminuído significativamente, mas mantinha-se superior ao valor observado com pré-equilíbrio. A partir daí, a diferença nos níveis de cobre lábil nas duas situações manteve-se aproximadamente constante até final da experiência (dez dias).

Uma fracção lábil de cobre superior (aproximadamente dupla) na experiência designada sem pré-equilíbrio constitui um resultado interessante e poderá ser o resultado da libertação de exudados para o meio de cultura e/ou da libertação de produtos intracelulares devido à lise celular provocada por efeitos tóxicos do metal. Esta explicação

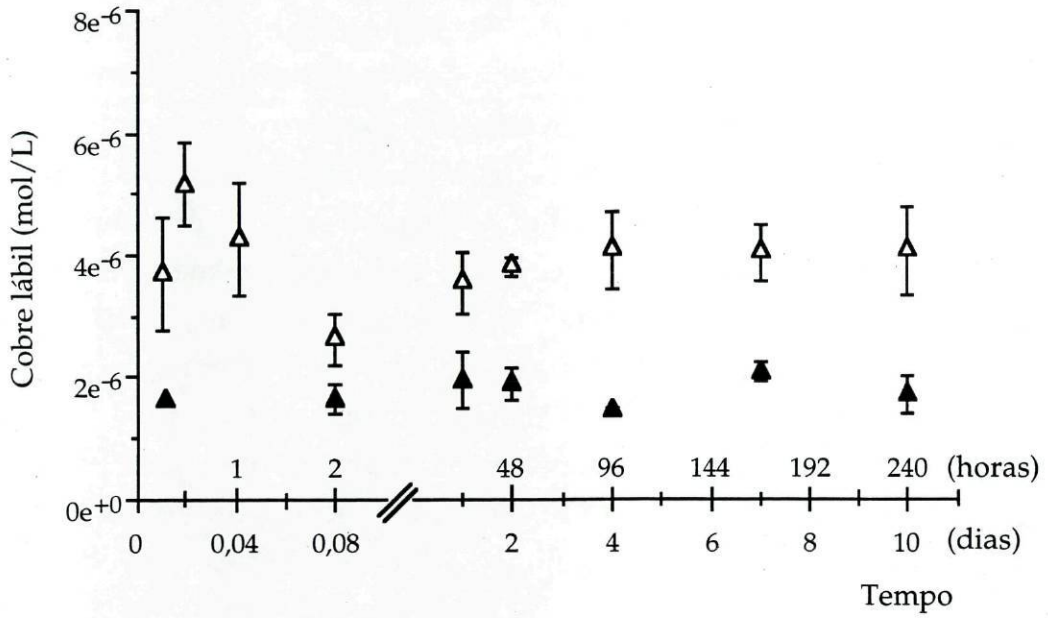


Figura 3.5.9. Variação das concentrações de cobre lábil em situações sem (Δ) e com (▲) pré-equilíbrio, medidos no meio de cultura de *Amphidinium carterae* contendo 13,4 µmol/L de cobre total. Os resultados apresentados (média e desvio padrão de três determinações) foram obtidos por PRA ao E_d = -0,3 V.

implica ainda que os ligandos biológicos formem complexos de cobre mais lábeis do que os de EDTA.

Estudos de labilidade electroquímica

Foram também efectuadas determinações da labilidade electroquímica, por PRA a E_d = -0,3 V, na água do mar sintética (*i.e.* antes da adição dos microrganismos) pré-equilibrada com 7,89, 13,4 e 15,7 µmol/L de cobre(II).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 3.5.3. Por um lado, esta tabela evidência que para o meio de cultura que continha 13,4 µmol/L de cobre(II), a fracção de metal lábil, medida antes de iniciar as experiências de toxicidade, não diferiu significativamente dos observados após quatro dias (Figura 3.5.9). Por outro lado, a tabela mostra que a concentração de cobre lábil experimental foi aproximadamente igual à soma do metal livre com a dos complexos inorgânicos (calculada). Verificou-se, portanto, que nas condições experimentais usadas a percentagem de complexo de EDTA dissociado foi desprezável.

Tabela 3.5.3. Valores de cobre lábil (µmol/L) obtidos por cálculo e por PRA[a] em água do mar sintética na situação com pré-equilíbrio e percentagens de complexos de Cu-EDTA dissociados.

$[Cu]_t$ (µmol/L)	$[Cu]_t$/[EDTA]	[Cu]lábil[b] comput.	[Cu]lábil voltam.	% Cu-EDTA dissociado[c]
7,87	0,53	0,13	0,34 ± 0,03	2,7
13,4	0,90	1,73	1,7 ± 0,2 (1,44 ± 0,08)[d]	0,0
15,7	1,06	3,13	3,4 ± 0,5	2,0

a- Valores médios e desvio padrão, n ≥ 4; *b*- Somatório do metal na forma livre e de complexos inorgânicos; *c*- ([Cu-EDTA]calculado - [Cu]inerte em PRA)/[Cu-EDTA]calculado; *d*- Valor medido no meio de cultura após quatro dias de contacto com os microrganismos.

As concentrações de cobre lábil electroquímico apresentadas na Tabela 3.5.3 foram comparadas com o crescimento celular observado, ao fim de quatro dias, nas culturas com as mesmas concentrações de cobre. Os resultados, patentes na Figura 3.5.10, mostram que a redução do crescimento acompanhou o aumento da concentração de cobre lábil. No entanto, como só se dispõe de três pontos experimentais não

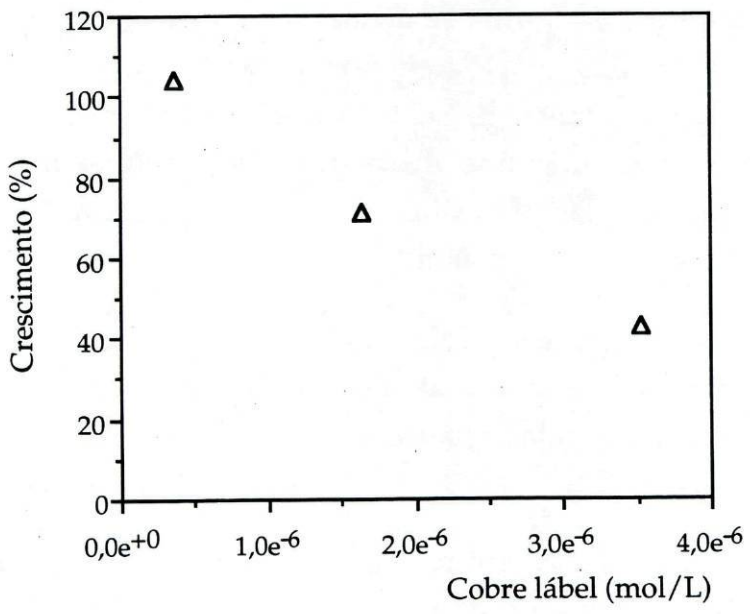


Figura 3.5.10. Variação do crescimento celular em função da concentração de cobre lábil medido por PRA.

se pode ir mais longe na interpretação destes resultados. A existência de uma relação de dependência directa entre a labilidade electroquímica e a biodisponibilidade (toxicidade) do metal tem sido encontrada noutros estudos, *e.g.*[6,12].

Níveis de cobre nas células

As concentrações totais de cobre nas células (e no meio de cultura para controlo de qualidade dos resultados) foram medidas por EAA.

A concentração de cobre no meio de cultura foi praticamente constante ao longo das experiências (resultados não mostrados) em consequência da fracção fixada pelas células ($\leq$ 0,14 µmol/L) ser insignificante ($\leq$1,0 %) para a concentração total de cobre adicionada ($\cong$ 13,4 µmol/L).

Os resultados obtidos nas células são apresentados na Figura 3.5.11, em duas unidades diferentes (juntamente com o crescimento celular):

(i) *moles de cobre por litro de suspensão celular*. O cobre fixado ao conjunto de células existentes por litro de meio de cultura, dá informação sobre o metal da solução que se transferiu para as células. Este, por sua vez, depende do metal biodisponível na solução, da "afinidade" das células para o metal e da "concentração" da suspensão celular (efeito de acção de massa);

(ii) *fentomoles de cobre por célula*. Este dado constitui uma informação directa da quantidade média de metal fixado por cada célula e poderá estar directamente relacionado com o efeito tóxico do metal no microrganismo.

Cobre transferido para a suspensão celular. O metal fixado pelo conjunto de células após duas horas de contacto foi marcadamente diferente nas situações com pré-equilíbrio (três vezes superior ao observado nas células do controlo) e sem pré-equilíbrio (oito vezes

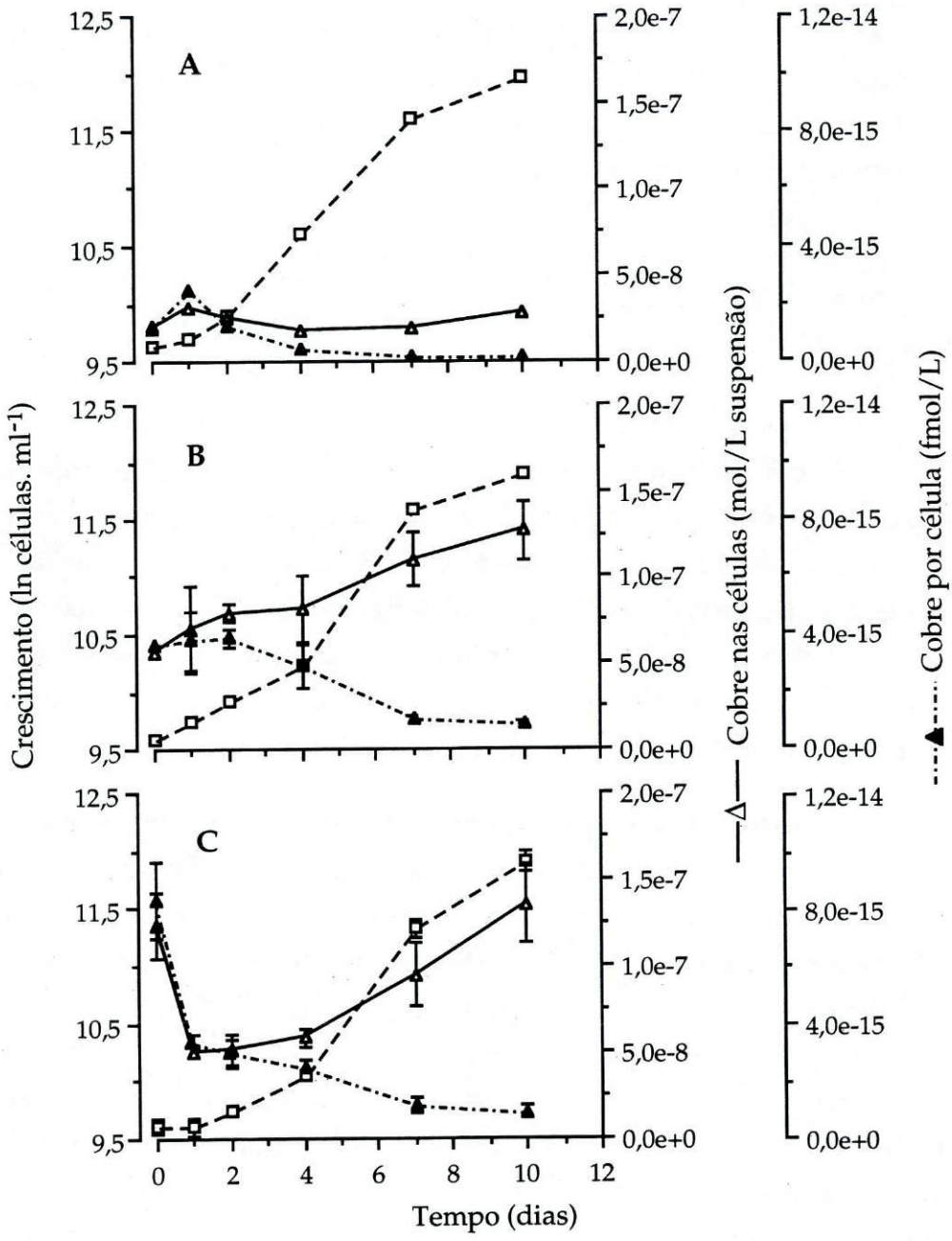


Figura 3.5.11. Comparação dos valores da concentração de cobre nas células (Δ, ▲) e do crescimento celular (□). (**A**) Controlo, (**B**) 13,4 µmol/L de cobre(II) total inicial na solução com pré-equilíbrio e (**C**) a mesma concentração mas sem pré-equilíbrio. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão de três determinações, excepto para o controlo em que apresenta-se apenas a média de dois ensaios.

superior ao do controlo) o que é compatível com a existência de uma fracção de cobre lábil maior neste último caso, no momento da adição do metal à suspensão celular. Na situação com pré-equilíbrio, o cobre fixado pelas células foi crescendo progressivamente, em consequência

do crescimento celular, *i.e.*, do aumento do número de células no meio de cultura. Este aumento da "concentração de ligando" (designado por P na Figura 3.5.1, atrás) provoca um efeito de acção de massa sobre os equilíbrios existentes no meio de cultura (equação [55], sentido 1):

$$M\text{-}L + P \underset{2}{\overset{1}{\rightleftharpoons}} M\text{-}P + L \qquad [55]$$

Na situação sem pré-equilíbrio, a quantidade de metal fixado às células foi relativamente elevada nos primeiros instantes, decrescendo em seguida em consequência, do estabelecimento do equilíbrio químico na solução e provavelmente também devido à acção de mecanismos de resistência das células à toxicidade do metal. Mais tarde (após 3 a 4 dias de contacto) ocorreu um aumento progressivo do metal fixado em consequência do crescimento celular, tal como na situação com pré-equilíbrio.

Um outro aspecto que interessa referir é que a quantidade de cobre transferido para as células na situação com pré-equilíbrio que, por exemplo, foi de 57 nmol/L após 2 horas de contacto, era superior (cerca de 16 vezes) ao cobre(II) livre existente na solução (3,6 nmol/L) mas inferior ao metal lábil (1,73 µmol/L). Logo, a assimilação do metal pelas células implicou a dissociação parcial dos complexos inorgânicos, mas não a dos complexos de EDTA, pelo menos em extensão significativa. Este resultado mostra que a biodisponibilidade do cobre será melhor estimada através da fracção de metal lábil do que através da fracção de metal livre, confirmando resultados anteriores obtidos para outro microrganismo noutro meio[12].

Cobre fixado por célula. Na situação sem pré-equilíbrio, durante as primeiras horas de contacto, os níveis médios de cobre observados por célula foram muito mais elevados (mais do dobro) dos observados com pré-equilíbrio. Depois decresceram marcadamente devido ao equilíbrio que se estabeleceu na solução entre o metal e o EDTA (que deverá ter acarretado a deslocação da equação [55] no sentido 2) e provavelmente também a mecanismos de defesa das células

envolvendo efluxo de cobre. Após um dia de contacto, os níveis médios de cobre celular tornaram-se estatisticamente iguais nas duas situações (com e sem pré-equilíbrio), *ca.* 3,6 fmol/célula, e a partir dessa altura mantiveram-se idênticos nos dois tipos de experiências. A partir do quarto dia verificou-se um decréscimo progressivo da concentração de cobre nas células, sendo esta ao fim de dez dias apenas de *ca.* 0,90 fmol/célula (cerca de quatro vezes menos do que a observada ao fim de quatro dias).

Como a concentração total de cobre na solução não sofreu um decréscimo significativo ao longo da experiência incluindo uma fracção de cobre lábil apreciável, os presentes resultados parecem sugerir que as células encontraram mecanismos eficazes de rejeição do metal. No entanto, também se observou um decréscimo nos níveis de outros metais nas células (resultados não mostrados), o que poderá resultar de alterações fisiológicas nas células provocadas pelo cobre.

Níveis de zinco nas células

Verificou-se, por cálculo (Tabela 3.5.2), que a fracção de zinco lábil aumentou marcadamente (trinta e nove vezes) com o aumento da concentração de cobre na solução. Pôs-se, por isso, a hipótese do efeito tóxico observado poder resultar de efeitos conjuntos de cobre e zinco. Para testar esta hipótese, para as experiências realizadas a níveis totais de cobre(II) de 1,34 (com e sem pré-equilíbrio) e 1,57 μmol/L (com pré-equilíbrio), efectuaram-se também determinações de zinco nas células ao fim de períodos de duas horas, um e dois dias de contacto. As concentrações de zinco encontradas (expressas em nmol zinco/L de suspensão celular) foram todas semelhantes entre si e com as das células do controlo e da ordem de grandeza do limite de detecção do método analítico (89 nmol/L, calculado estatisticamente a partir dos parâmetros de regressão da recta de calibração[13]). Os níveis de zinco eram cerca de dez vezes superiores aos de cobre observados nas células do controlo. Portanto, embora os resultados observados para zinco não mereçam confiança do ponto de vista quantitativo, por estarem abaixo do limite de quantificação da técnica, sugerem que o efeito tóxico observado será devido apenas ao cobre.

3.5.4 CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou que o modo como o cobre(II) entra em contacto com o meio que contém os microrganismos (*i. e.*, se está em formas lábeis ou de quelatos estáveis) influencia o seu efeito tóxico (avaliado pela redução do crescimento celular) mesmo que o meio contenha quelantes fortes, como o EDTA, em excesso, relativamente à concentração do metal.

Por outro lado, a fracção de cobre(II) fixado pelas células foi superior à do metal livre na solução mas inferior à do metal lábil calculado (soma do livre com o ligado a espécies inorgânicas). Esta, por sua vez, foi praticamente coincidente com a fracção lábil medida por PRA a E_d = -0,3 V, quando o metal foi adicionado aos microrganismos maioritariamente na forma de complexos de EDTA (> 80 %).

Porém, e para a mesma concentração de EDTA, quando o cobre(II) foi adicionado às culturas na forma livre, a fracção de metal electroquimicamente lábil foi significativamente maior (dupla quando $[Cu]_t$ = 13,4 μmol/L) da observada quando o metal foi adicionado maioritariamente na forma de complexos de EDTA, evidenciando que a forma em que o metal se encontra quando entra em contacto com os organismos influência o sistema mesmo a longo prazo.

O facto do cobre fixado pelas células ter sido superior ao metal livre na solução, indica que a fracção biodisponível para *Amphidinium carterae* é melhor avaliada através da fracção lábil do que da fracção livre do metal, à semelhança do que se tem verificado para outros microrganismos e noutros meios, *e.g.*[5,12].

REFERÊNCIAS

1- G.M.P. Morrison, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 2.

2- T.M. Florence, *Trac. Trend. Anal. Chem.*, **2**, 162 (1983).

3- T.M. Florence, *em* "Trace element speciation: analytical methods and problems", G.E. Batley, Ed., CRC Press, Florida, 1989, cap. 4.

4- T.M. Florence, G.M. Morrison e J.L. Stauber, *Sci. Total Environ.*, **125**, 1 (1992).

5- D.M.J. Tubbing, W. Admiraal, R.F.M.J. Cleven, M. Iqbal, D. van de Meent e W. Verweij, *Wat. Res.*, **28**, 37 (1994).

6- W. Verweij, R. Glazewski e H. De Haan, *Chem. Speciation Bioavailability*, **4**, 43 (1992).

7- W.J. Price, "Spectrochemical analysis by atomic absorption", Heyden, London, 1979, cap. 7.

8- O.M. Lage, A.M. Parente, H.M.V.M. Soares, M.T.S. Vasconcelos e R. Salema, *Eur. J. Phycol.*, **29**, 253 (1994).

9- O.M. Lage, A.M. Parente e R. Salema, *I Colóquio Franco-Ibérico de Microscopia Electrónica*, 134 (1991).

10- D.R. Turner, M.S. Varney, M. Whitfield, R.F.C. Mantoura e J.P. Riley, *Sci. Total Environ.*, **60**, 17 (1987).

11- D.M. Anderson e F.M.M. Morel, *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 283 (1978).

12- M. Azenha, M.T. Vasconcelos e J.P.S. Cabral, *Environ. Toxicol. Chem.*, **14**, 369 (1994).

13- J.C. Miller e J.V. Miller, "Statistics for analytical chemistry", Ellis Horwood, New York, 1984, cap. 4.

PARTE 4

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Desde a sua introdução por Jagner *et al.* em meados da década de setenta, a PRA tem sido largamente aplicada à determinação da concentração total de metais pesados, mas não a estudos de especiação, nomeadamente, à determinação da fracção lábil do metal num dado meio e à determinação de constantes de formação de complexos.

O presente trabalho evidenciou que a PRA é, em algumas situações, mais adequada que a VRADI para estudos de especiação.

Concretamente, em meios de elevada concentração de cloretos a PRA permite a determinação de cobre a potenciais de deposição menos negativos do que os necessários para a determinação por VRADI. Esta característica é relevante quando se pretende estudar a fracção mais lábil do metal em meios de salinidade elevada. A diferença de comportamento observada entre as duas técnicas de redissolução anódica deve-se à elevada corrente residual ou de fundo que ocorre em VRADI mas não em potenciometria, dado que neste último caso as medições são realizadas a corrente nula.

A PRA exige a presença de um oxidante químico na solução para provocar a redissolução do(s) metal(is) em estudo. O oxidante usado é, frequentemente, o catião mercúrio(II) e impunha-se averiguar se esta espécie não interferia nas características do sinal e, consequentemente, nos resultados de especiação. Para tal, procedeu-se à determinação, por PRA, de constantes de formação de complexos cobre(II)-glicina. Trata-se de um sistema já bem estudado, cujo ligando não é adsorvido à superfície do eléctrodo de mercúrio. Os resultados obtidos foram

concordantes com os fornecidos por VRADI e com outros da literatura, o que permitiu concluir que o catião mercúrio(II) não interferiu nos resultados, nas condições experimentais usadas.

Um outro aspecto importante prende-se com a influência dos fenómenos de adsorção nos resultados obtidos por técnicas de redissolução anódica que utilizam mercúrio no eléctrodo de trabalho. Para estudar este aspecto, em PRA, procedeu-se à determinação da função de equilíbrio diferencial para o sistema cobre(II)-AH, usando para tal uma amostra de AH comercial. O estudo mostrou que os fenómenos de adsorção não interferiram notoriamente nos sinais analíticos obtidos por PRA para concentrações de AH inferiores a 0,1 mmol/L (valor de CC determinado por PESC) e que para concentrações superiores (até 28,3 mmol/L, que foi o valor máximo ensaiado), a interferência não foi muito importante. Em contraste, por VRADI, as interferências ocorreram em todo o intervalo de concentrações de AH usado (entre 23 µmol/l e 28,3 mmol/L). Estes resultados indicaram que a PRA poderá ser mais adequada para estudos de especiação em sistemas aquáticos onde existem, em geral, substâncias surfactantes em concentrações relativamente baixas.

A PRA foi também aplicada à determinação da labilidade de complexos de cobre(II)-AF de origem pedogénica. O estudo abrangeu razões de concentração molar $[AF]_t/(Cu]_t$ entre 89 e 1,6 e mostrou que, nas condições experimentais usadas, a labilidade aumentava com a referida razão entre 8% ($[AF]_t/(Cu]_t = 89$) e 64% ($[AF]_t/(Cu]_t = 6$), embora se tenha verificado um ligeiro decréscimo na labilidade para as razões inferiores.

Finalmente, a PRA foi aplicada à determinação da fracção de cobre(II) lábil em meios de cultura de microalgas marinhas *Amphidinium carterae* que continham 13,4 µmol/L de cobre(II) total. O estudo revelou que essa fracção era duas vezes maior quando o metal tinha sido adicionado ao meio na forma livre, do que quando tinha sido adicionado maioritariamente na forma de complexos de EDTA, embora a concentração deste complexante no meio de cultura fosse

igual nas duas situações. A referida diferença de labilidade electroquímica manteve-se aproximadamente constante durante toda a experiência: dez dias de contacto entre o metal e a cultura de microrganismos. Além disso, na situação de pré-equilíbrio a fracção de cobre(II) lábil coincidiu praticamente com a soma da fracção de metal livre com os respectivos complexos inorgânicos.

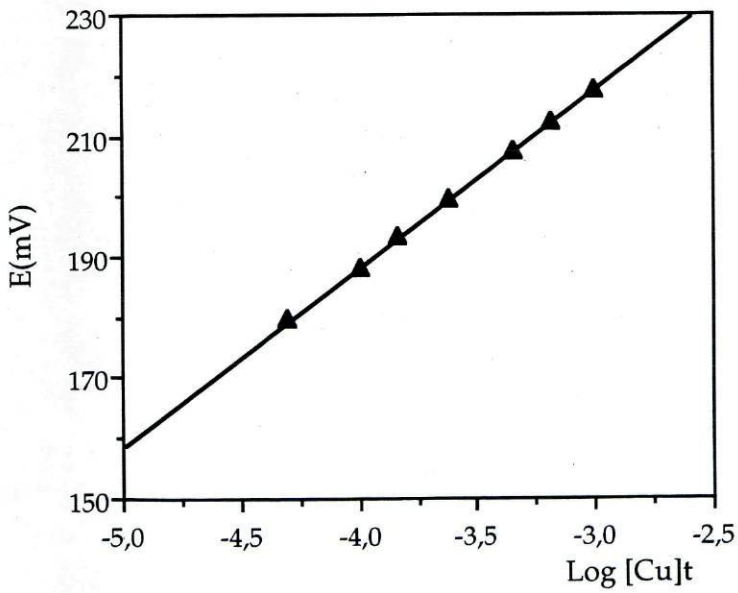
APÊNDICES

APÊNDICE 1

Verificação da Ausência de Complexação Cu(II)-PIPES a pH 6,5

Curva de titulação, por PESC, de PIPES 10 mmol/L em perclorato de sódio 0,5 mol/L com nitrato de cobre(II) 5 mmol/L em perclorato de sódio 0,5 mol/L:

$E\ (mV) = (29{,}0 \pm 0{,}3) \log [Cu]_t + (305 \pm 1)$, $R = 0{,}99995$; $P = 0{,}05$, $n = 7$.

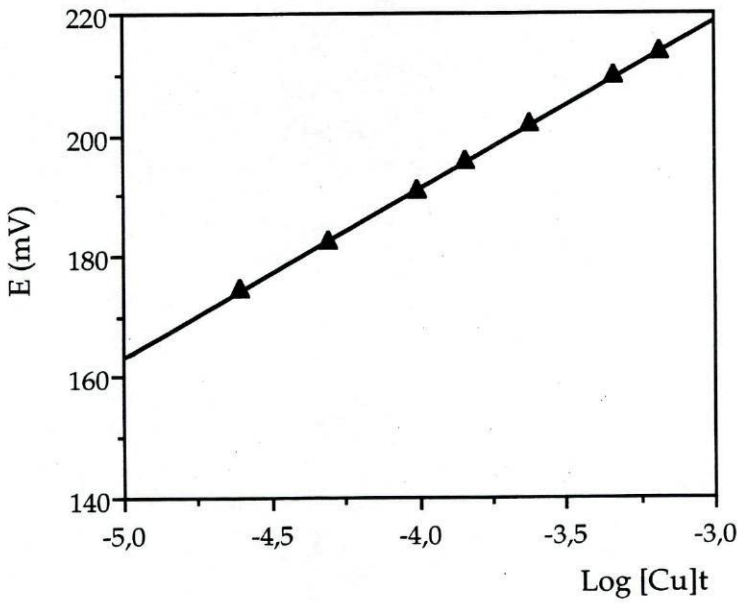


APÊNDICE 2

Verificação da Ausência de Complexação Cu(II)-HEPES a pH 6,5

Curva de titulação, por PESC, de HEPES 25 mmol/L em nitrato de sódio 10 mmol/L com nitrato de cobre(II) 5 mmol/L em nitrato de sódio 10 mmol/L:

$E\ (mV) = (28{,}0 \pm 0{,}3) \log [Cu]_t + (303 \pm 1)$, $R = 0{,}99994$; $P = 0{,}05$, $n = 7$.



APÊNDICE 3

Matriz de Dados Estequiométricos de Equilíbrio Químico e Resultados Obtidos na Especiação de uma Solução 150 mg/L em AF e 3,15 µmol/L em Cobre(II)

Matriz de dados estequiométricos de equilíbrio químico e resultados obtidos na especiação de uma solução 150 mg/L em AF e 3,15 µmol/L em cobre(II).

Espécies[a]	Componentes						
	Cu^{2+}	AF_1[b]	AF_2[b]	H^+	log K	Conc (mol/l)	Ref.
Cu	1	0	0	0	0,00	$6,00e^{-8}$	----
$CuAF_1$	1	1	0	0	5,77	$2,88e^{-6}$	1
$CuAF_2$	1	0	1	0	4,22	$1,95e^{-7}$	1
CuHO	1	0	0	-1	-7,97	$2,03e^{-9}$	2
$Cu_2(HO)_2$	2	0	0	-2	-10,95	$4,04e^{-13}$	2
$Cu(HO)_2$	1	0	0	-2	-13,68	$1,25e^{-8}$	2
$Cu(HO)_3$	1	0	0	-3	-26,30	$9,51e^{-15}$	3
$Cu(HO)_4$	1	0	0	-4	-39,40	$2,39e^{-21}$	3
AF_1	0	1	0	0	0,00	$8.15e^{-5}$	----
AF_2	0	0	1	0	0,00	$1,96e^{-4}$	----
HO	0	0	0	-1	-14,00	$3,16e^{-8}$	4
H	0	0	0	1	0,00	$3,16e^{-7}$	----

Componentes[a]:

	Conc. total (mol/L)	Conc. livre
Cu	$3,15e^{-6}$	$6,00e^{-8}$
AF_1[b]	$8,44e^{-5}$	$8,15e^{-5}$
AF_2[b]	$1,96e^{-4}$	$1,96e^{-4}$
H	$0,00e^{+0}$	$3,16e^{-7}$

a- Para simplificar foram omitidas as cargas nas espécies e componentes apresentados nesta coluna;
b- o valor da carga não é conhecido.

REFERÊNCIAS

1- H.M.V.M. Soares e M. T. S. D. Vasconcelos, *Anal. Chim. Acta*, **293**, 261 (1994).

2- J. Bjerum, G. Schwarzerbach e L.G. Sillén, "Stability constants of metal-ion complexes, with solubility products of inorganic substances, Part II: Inorganic ligands", The Chemical Society, London, 1958.

3- W. Stumm e J. Morgan, "Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters", Wiley, New York, 1981, cap. 6.

4- W. Stumm e J. Morgan, "Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters", Wiley, New York, 1981, cap. 5.

APÊNDICE 4

Matriz de Dados Estequiométricos de Equilíbrio Químico e Resultados Obtidos na Especiação de EDTA 14,9 µmol/l e 13,4 µmol/L de cobre(II)

Matriz de dados estequiométricos de equilíbrio químico e resultados obtidos na especiação de EDTA 14,9 μmol/L e 13,4 μmol/L de cobre(II).

Espécies[a]	Componentes											log K	Conc (mol/l)	Ref.
	Cu^{2+}	Y^{4-} [b]	Cl^-	CO_3^{2-}	SO_4^{2-}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	H^+			
H_2Y	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	16,46	$1,47e^{-15}$	1
HY	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10,23	$8,68e^{-14}$	1
Y	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	$5,11e^{-16}$	---
Cu	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	$3,61e^{-9}$	---
CuY	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18,80	$1,17e^{-5}$	2
CuHY	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	21,80	$1,17e^{-10}$	2
CuHO	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-7,97	$3,87e^{-9}$	3
$Cu(HO)_2$	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-2	-13,68	$7,55e^{-7}$	3
$CuCO_3$	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	6,77	$8,73e^{-7}$	4
$Cu(CO_3)_2$	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	10,01	$6,28e^{-8}$	4
$CuSO_4$	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2,22	$1,01e^{-8}$	5
CuCl	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,931	$1,49e^{-8}$	5
$CuCl_2$	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,79	$5,20e^{-9}$	5
$CuCl_3$	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0,46	$1,18e^{-9}$	5
Cl	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,00	$4,83e^{-1}$	---
Mg	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0,00	$3,97e^{-2}$	---
MgY	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	8,79	$1,26e^{-8}$	2
MgHY	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	12,64	$8,92e^{-13}$	2
$MgCO_3$	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2,20	$2,60e^{-4}$	4
$MgHCO_3$	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	9,80	$1,03e^{-4}$	4,5
$MgSO_4$	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1,01	$6,85e^{-4}$	4
Ca	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,00	$7,71e^{-4}$	---
CaY	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	10,69	$1,93e^{-7}$	2
CaHY	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	13,87	$2,92e^{-12}$	2
$CaCO_3$	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1,89	$2,45e^{-5}$	4
$CaHCO_3$	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	9,88	$2,40e^{-5}$	4,5
$CaSO_4$	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1,03	$1,38e^{-3}$	4
Fe	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,00	$4,28e^{-16}$	---
FeY	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	25,10	$2,75e^{-6}$	2
FeHY	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	26,40	$5,49e^{-13}$	2
$Fe(HO)_2$	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-2	-6,05	$3,81e^{-6}$	6

(Continuação)

Espécies[a]	Componentes											log K	conc (mol/l)	Ref.
	Cu^{2+}	Y^{4-} [b]	Cl^-	CO_3^{2-}	SO_4^{2-}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Fe^{3+}	Mn^{2+}	Zn^{2+}	H^+			
$FeSO_4$	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	2,12	$9,45e^{-1}$	6
CO_3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0,00	$4,10e^{-5}$	---
HCO_3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	9,59	$1,60e^{-3}$	5
H_2CO_3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	15,63	$1,75e^{-5}$	5
SO_4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,00	$1,68e^{-2}$	---
Mn	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0,00	$7,20e^{-7}$	---
MnY	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	14,04	$4,04e^{-8}$	6
MnCl	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0,59	$1,35e^{-6}$	6
$MnCl_2$	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0,26	$3,06e^{-7}$	6
Zn	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0,00	$1,24e^{-8}$	---
ZnY	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	16,50	$2,01e^{-7}$	2
ZnHO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	-10,19	$8,03e^{-11}$	6
ZnCl	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0,72	$3,15e^{-8}$	6
$ZnCl_2$	0	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	0,49	$8,96e^{-9}$	6
HO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-14,00	$1,00e^{-6}$	7
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,00	$1,00e^{-8}$	---

Componentes:[a]	Conc. total (mol/L)	Conc. livre
Cu	$1,34e^{-5}$	$3,61e^{-9}$
Y	$1,49e^{-5}$	$5,11e^{-16}$
Cl	$4,83e^{-1}$	$4,83e^{-1}$
CO_3	$2,07e^{-3}$	$4,10e^{-5}$
SO_4	$2,50e^{-2}$	$1,68e^{-2}$
Mg	$4,72e^{-2}$	$4,00e^{-2}$
Ca	$9,14e^{-3}$	$7,71e^{-3}$
Fe	$6,56e^{-6}$	$4,28e^{-16}$
Mn	$2,42e^{-6}$	$7,20e^{-7}$
Zn	$2,54e^{-7}$	$1,24e^{-8}$
H	$0,00e^{+0}$	$1,00e^{-8}$

a- Para simplificar foram omitidas todas as cargas nas espécies e componentes apresentados nesta coluna ; *b*- Y^{4-} corresponde a uma representação simbólica do EDTA totalmente desprotonado.

REFERÊNCIAS

1- L.G. Sillen e A.E. Martell, "Stability constants of metal-ion complexes", The Chemical Society, London, 1971, vol. 25.

2- A.E. Martell e R.M. Smith, "Critical stability constants, vol. 1: amino acids", Plenum Press, London, 1974.

3- J. Bjerum, G. Schwarzerbach e L.G. Sillén, "Stability constants of metal-ion complexes, with solubility products of inorganic substances, Part II: Inorganic ligands", The Chemical Society, London, 1958.

4- W. Stumm e J. Morgan, "Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters", Wiley, New York, 1981, cap. 6.

5- Erik Högfeldt, "Stability constants of metal-ion complexes. Part A: inorganic ligands", Pergamon Press, New York, 1982.

6- L.G. Sillen e A.E. Martell, "Stability constants of metal-ion complexes", vol. 17, The Chemical Society, London, 1964.

7- W. Stumm e J. Morgan, "Aquatic chemistry, an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters", Wiley, New York, 1981, cap. 5.