

João Vasco Serrano de Almeida

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO
AUTOMÁTICO BASEADO NO CONCEITO SIA PARA A
TITULAÇÃO COLORIMÉTRICA CATALÍTICA DE
MERCÚRIO EM ÁGUAS**



Universidade do Porto

PORTO, 1999

João Vasco Serrano de Almeida

Licenciado em Microbiologia pela Universidade Católica Portuguesa

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCEDIMENTO
AUTOMÁTICO BASEADO NO CONCEITO SIA PARA A
TITULAÇÃO COLORIMÉTRICA CATALÍTICA DE
MERCÚRIO EM ÁGUAS**

*Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Controlo
de Qualidade.*

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 02/09/24
Reg. 1530
Cota

FFM
ALM



Universidade do Porto

PORTO, 1999

Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo Subprograma Ciência e Tecnologia do 2º Quadro Comunitário de Apoio, através da atribuição da Bolsa de Mestrado PRAXIS XXI/BM/12724/97.

À memória da minha avó Manuela

Ao meu avô Eduardo

Agradecimentos

Ao Sr. Prof. Doutor Alberto da Nova Araújo pela orientação deste trabalho. A transmissão de alguns dos seus vastos conhecimentos e saber foram determinantes para a realização deste trabalho.

Ao Sr. Prof. Doutor José Luís Fontes da Costa Lima, à data de início deste trabalho, Director do então Departamento de Química-Física da FFUP, pelo ter aceite/sugerido a realização deste trabalho e por me ter proporcionado e disponibilizado todas as condições e meios necessários à realização deste trabalho.

À Sra. Prof. Doutora Conceição Branco Montenegro, enquanto Directora do Serviço de Química-Física da FFUP, por me ter proporcionado e disponibilizado todas as condições e meios necessários à realização deste trabalho.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia pela atribuição de uma Bolsa de Mestrado.

À Sra. Prof. Doutora Maria Fernanda Borges pela sua orientação científica na síntese do reagente orgânico e pelos seus inextinguíveis ensinamentos, entusiasmo e encorajamento.

Ao Serviço de Química Orgânica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, na pessoa da sua Directora, Prof. Doutora Maria Madalena Pinto, o me ter proporcionado e disponibilizado todos os meios e condições conducentes à síntese do reagente orgânico.

Ao Dr. Agostinho Almeida pela valiosa colaboração na determinação de mercúrio na Absorção Atômica.

A todos quantos integram o Serviço de Química-Física da FFUP, em particular à Carla Matos, Carla Moutinho, Dra. Lúcia e Sra. Teresa, por sempre me terem disponibilizado todo o material de que necessitava, ainda que nem sempre de boa vontade (as "Carlas"), e toda a simpatia.

Ao Rui Cerdeira pela sua infatigável colaboração, encorajamento e amizade em todos os momentos, bem como pelas preciosas sugestões e críticas ao trabalho.

À Goreti Sales pela estonteante frieza com que sempre abordou os problemas decorrentes da realização deste trabalho, bem como pela simpatia e encorajamento.

Ao "Basco" Nestor Zarate Aracama por comigo ter partilhado os bons e maus momentos deste trabalho, bem como pela verdadeira amizade que sempre me ofereceu.

Ao Xiao Jun pelos "milenarios" ensinamentos do difícil Mandarim e de WinBridge™, "válvulas de escape" nos momentos mais "stressantes".

A todos quantos constituem o Serviço de Química Orgânica pelo excelente acolhimento (aquando da síntese do reagente orgânico) e toda a simpatia, em particular à D. Fátima.

Ao Francisco da Química Orgânica pela preciosa colaboração na edição das figuras relativas à síntese do composto orgânico.

À Emília da Química Orgânica por todos os cafés e cigarros que comigo partilhou no difícil e longo mês de Agosto, bem como pelo encorajamento.

À Sra. Engenheira Maria Elisa Soares o meu e sincero e profundo agradecimento pelo constante e inexcedível encorajamento e amizade, bem como pelas valiosas críticas e sugestões ao trabalho.

Ao Pedro Jorge Alves pelo precioso e inexcedível apoio nos terríveis momentos de *crash* informático e pela constante actualização de *software*.

Ao “Arq.” João de Almeida Costa por todo o apoio informático e oportunos *scanners*.

À família, nomeadamente aos avós, pais e tios, devo o meu profundo reconhecimento por toda a compreensão e apoio (diverso) que sempre me manifestaram no decorrer deste trabalho (e não só).

À minha irmã, Ana, pelas correcções ortográficas do trabalho, críticas e sugestões, bem como pelo enorme e constante apoio que sempre me manifestou.

Aos amigos Nuno Tavares, Tiago Freitas, Mário Sá Carneiro e Diogo Bastos pelo encorajamento, por todos os “desvarios” que suportaram e pela companhia nas “noitadas de descompressão”.

À Rita Vilas-Boas pelo carinho e encorajamento que sempre me manifestou.

À Daniela Cervi e à Rita Castro pelo tempo que me “obrigaram” a não dedicar e este trabalho.

A todos os que, de um modo ou outro, contribuíram para a realização deste trabalho.

Índice

Lista de Tabelas e Figuras.....	X
Resumo.....	X
Abstract.....	X
Lista de Abreviaturas.....	X
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. O MERCÚRIO.....	2
1.1. O MERCÚRIO E SUAS PROPRIEDADES.....	2
1.2. FONTES DE MERCÚRIO.....	3
1.3. PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES E APLICAÇÕES DO MERCÚRIO.....	4
1.4. O MERCÚRIO NO AMBIENTE.....	6
1.4.1. O mercúrio no ar.....	8
1.4.2. O mercúrio na água.....	8
1.4.3. O mercúrio no solo e em sedimentos.....	9
1.4.4. Transformação, transporte e distribuição do mercúrio nos vários compartimentos ambientais.....	9
1.4.5. O mercúrio na biota.....	12
1.5. REFERÊNCIAS.....	13
2. O MERCÚRIO COMO ELEMENTO TÓXICO.....	14
2.1. TOXICIDADE DO MERCÚRIO.....	14
2.1.1. VIAS PRINCIPAIS DE EXPOSIÇÃO A MERCÚRIO.....	15
2.2. TOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE MERCÚRIO.....	16
2.2.1. Mercúrio elementar.....	17
2.2.2. Sais inorgânicos de mercúrio.....	18
2.2.3. Compostos orgânicos de mercúrio.....	19
2.3. TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO POR MERCÚRIO.....	22
2.4. O MERCÚRIO E A LEGISLAÇÃO.....	22
2.5. REFERÊNCIAS.....	24
3. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO.....	26
3.1. PROCEDIMENTOS HABITUALMENTE EMPREGUES NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO.....	26
3.2. RECOLHA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MERCÚRIO.....	28
3.3. TRATAMENTO PRÉVIO DAS AMOSTRAS DE MERCÚRIO.....	31
3.3.1. Digestão de amostras de mercúrio.....	31
3.3.2. Pré-concentração de amostras de mercúrio.....	32
3.4. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS DE DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO.....	33
3.4.1. Métodos colorimétricos.....	34
3.4.1.1. Determinação com ditizona.....	34
3.4.1.2. Determinação baseada em complexos aniônicos de mercúrio com iodeto e brometo quando associados a corantes catiónicos.....	35
3.4.1.3. Determinação com corantes AZO.....	35
3.4.1.4. Determinação com compostos de enxofre.....	36
3.4.1.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS À DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE MERCÚRIO.....	36

3.4.1.6. DETERMINAÇÃO BASEADA EM MÉTODOS CATALÍTICOS	37
3.4.2. Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA)	37
3.4.2.1. Espectrofotometria de Absorção Atômica - Atomização em Chama	38
3.4.2.2. Espectrofotometria de Absorção Atômica - Vapor Frio (EAA-VF)	39
3.4.2.3. Espectrofotometria de Absorção Atômica - Atomização Electrotérmica	40
3.4.3. Espectrometria de Fluorescência Atômica (EFA)	41
3.4.4. Espectrometria de Emissão Atômica (EEA)	42
3.4.5. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (EFRX)	43
3.4.6. Espectroscopia de Massa (EM)	43
3.4.7. Análise por Activação Neutrónica (AAN)	44
3.4.8. Métodos baseados em propriedades electroquímicas	46
3.5. PROCEDIMENTOS AUTOMATIZADOS	46
3.5.1. Técnicas de automatização	48
3.5.1.1. Técnicas discretas	48
3.5.1.2. Técnicas de fluxo contínuo	49
3.5.1.2.1. Métodos de fluxo contínuo segmentado	50
3.5.1.2.2. Métodos de fluxo contínuo não segmentado	51
3.5.1.3. Métodos robotizados	52
3.5.2. Princípios de FIA	52
3.5.2.1. A dispersão parcial, como um dos princípios fundamentais de FIA	53
3.5.3. Montagens FIA	55
3.5.4. O conceito SIA	57
3.5.5. Procedimentos automáticos de determinação de mercúrio	59
3.6. REFERÊNCIAS	61
II. OBJECTIVOS	67
Referências	69
III. PARTE EXPERIMENTAL	70
4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	71
4.1. NA SÍNTESE DA TDHB	71
4.1.1. Equipamento	71
4.1.2. Solventes e reagentes	72
4.1.3. Síntese da TDHB	72
4.1.4. Cromatografia	73
4.2. Na determinação de mercúrio	74
4.2.1. Reagentes e soluções	74
4.2.2. Equipamento	76
4.2.3. Construção da montagem SIA	76
4.3. PROCEDIMENTOS GERAIS DE AVALIAÇÃO DA MONTAGEM DESENVOLVIDA	79
4.3.1. Modo de medida dos sinais	79
4.3.2. Modo do traçado das curvas de calibração	79
4.3.3. Cálculo do limite de detecção	79
4.3.4. Cálculo da reprodutibilidade do método	80
4.3.5. Comparação dos resultados obtidos com a EAA-VF	80
4.4. Referências	81
5. RESULTADOS E SUA DISCUSSÃO	82
5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA TDHB	82
5.2. JUSTIFICAÇÃO DA MONTAGEM SIA	85
5.3. OPTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE Hg	90
5.3.1. Optimização das condições operacionais do módulo analítico	91
5.3.2. Optimização das condições químicas	94
5.4. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS	96
5.4.1. Modo de medida dos sinais analíticos	96
5.4.2. Calibração da metodologia proposta	97

5.4.3. Limite de detecção do procedimento	98
5.4.5. Precisão do método proposto	99
5.4.6. Exactidão do método proposto, por comparação dos resultados obtidos com os obtidos através da EAA-VF.....	99
5.5. REFERÊNCIAS.....	101
IV. CONCLUSÕES GERAIS.....	102
ANEXOS.....	104
ANEXO 1	105
Programa de controlo do sistema SIA	105

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1.1.1: Algumas propriedades físicas e químicas do mercúrio.....	3
Tabela 1.3.1: Principais utilizações de mercúrio.....	4
Figura 1.4.1: Distribuição ambiental de mercúrio.....	7
Figura 1.4.4.1: Transporte entre os diversos compartimentos ambientais e transformação de compostos de mercúrio. Representação esquemática das mais importantes transformações e vias de distribuição nos compartimentos ambientais ar, água e sedimentos.....	10
Tabela 2.1.1.1: Estimativa da média diária de retenção de mercúrio em população não exposta ocupacionalmente ao mercúrio.....	16
Figura 2.2.3.1: Mecanismo proposto para a entrada e distribuição dos compostos orgânicos de mercúrio no organismo humano.....	20
Figura 2.2.3.2: Entrada do metilmercúrio na corrente sanguínea por conjugação com a cisteína.....	20
Tabela 2.4.1: Valores legislados para mercúrio em águas naturais e residuais.....	23
Tabela 3.3.1.1: Procedimentos de digestão.....	31
Tabela 3.5.1: Classificação das diversas técnicas de automatização.....	48
Figura 3.5.3.1: Esquema de uma montagem FIA comum.....	56
Figura 3.5.4.1: Esquema de uma montagem SIA comum.....	58
Figura 4.2.3.1: Esquema da montagem SIA desenvolvida.....	78
Figura 5.1.1: Mecanismo proposto para a formação de iminas, por reacção de uma cetona com uma amina primária.....	83
Figura 5.1.2: Esquema da síntese da tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona.....	84
Figura 5.1.3: Estrutura modelizada (PC Model) da tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona.....	84
Tabela 5.1.1: Resultados referentes ao ponto de fusão, espectrofotometria de IV, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e de Espectrometria de Massa obtidos na análise da TDHB sintetizada, após a sua purificação.....	85
Figura 5.2.1: Esquema da montagem SIA desenvolvida.....	87
Figura 5.2.2: Exemplo de vários sinais obtidos na determinação de mercúrio através da metodologia desenvolvida.....	88

Figura 5.2.3: Espectros de absorvência das várias soluções transportadas ao longo do sistema SIA desenvolvido.....	90
Figura 5.3.1.1: Efeito da variação do t_{act} na concentração de mercúrio, cujo sinal analítico se distingue do sinal do branco.....	92
Figura 5.3.1.2: Efeito da variação do caudal na concentração de mercúrio, cujo sinal analítico se distingue do sinal do branco.....	93
Tabela 5.3.1.1: Condições instrumentais otimizadas e utilizadas na realização das determinações de mercúrio.....	94
Tabela 5.3.2.1: Concentrações das várias espécies químicas, presentes em solução. São apresentadas as concentrações utilizadas inicialmente (descritas) e as concentrações resultantes da otimização.....	95
Figura 5.4.2.1: Calibração da metodologia proposta por injeção dos padrões de 0,0; 1,5; 3,0; 4,5; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0 μ gHg/L.....	98
Tabela 5.4.6.1: Resultados obtidos na medição de 10 amostras de águas naturais e residuais através da metodologia proposta e por EAA-VF (μ gHg/L). Apresenta-se igualmente o erro relativo de cada determinação.....	100
Figura 5.4.6.1: Correlação dos valores obtidos por EAA e pela montagem SIA desenvolvida.....	100

Resumo

Neste trabalho desenvolveu-se uma montagem baseada no conceito SIA para a determinação colorimétrica catalítica de mercúrio em águas. O procedimento de determinação baseia-se na reacção de oxidação da tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona (TDHB) pelo peróxido de hidrogénio e catalisada pelo cobre. A TDHB utilizada como reagente titulante, foi sintetizada.

A metodologia desenvolvida é adequada ao controlo de qualidade do mercúrio em águas, na medida em que o limite de detecção do procedimento ($1,0\mu\text{g/L}$) permite efectuar a determinação de mercúrio nas concentrações máximas admissíveis pela legislação portuguesa.

Os resultados obtidos com este procedimento revelaram-se reprodutíveis, tendo-se obtido coeficientes de variação inferiores a 5%. A análise comparativa dos resultados obtidos com os obtidos por Espectrofotometria de Absorção Atómica com geração de vapor frio, revelou uma correlação satisfatória ($R^2=0,9985$) e a não existência de diferenças significativas entre ambas as metodologias, do ponto de vista estatístico.

Através do sistema desenvolvido, determinou-se a concentração de mercúrio de um conjunto de amostras de água. Todas as etapas analíticas ocorreram em circuito fechado, o que minimizava os riscos tóxicos e de contaminação externa. Adicionalmente apenas era consumida uma quantidade reduzida de amostra ($2,39\text{mL}$) e reagentes ($23,38\mu\text{g}$ de TDHB).

A montagem desenvolvida demonstrou toda a versatilidade dos sistemas SIA, na medida em que era possível implementar e desenvolver novas metodologias partindo do mesmo sistema. Na construção da montagem foram empregues materiais e equipamentos de custo reduzido e acessíveis à maioria dos laboratórios de controlo de qualidade.

Abstract

A SIA manifold for the catalytic colourimetric determination of mercury in waters was developed. The determination is based on the 4,4'-dihydroxybenzopyenone thiosemicarbazone (TDHB) oxidation by hydrogen peroxide, and catalysed by copper. The TDHB used, as titrating reagent, was synthesized.

The developed methodology is suitable for the water quality control concerning to mercury, as the procedure detection limit ($1,0\mu\text{g/L}$) allows the mercury determination at the maximum concentration level, settled in portuguese legislation.

The results obtained with this procedure showed reproducibility, with deviation coefficients lower than 5%. The comparative study of the obtained results with those obtained by cold vapour Atomic Absorption Spectrophotometry revealed satisfactory correlation ($R^2=0,9985$) and the non-existence of significative statistical differences between both methodologies.

The mercury determination in a group of water samples was possible throughout the developed SIA manifold. All the analytical procedures occurred in closed tubing, which reduced toxic and external contamination effects. Additionally, only a small amount of sample ($2,39\text{mL}$) and reactives ($23,38\mu\text{g}$ TDHB) was consumed.

The developed SIA manifold's versatility became evident, as it was possible to couple and develop other methodologies on the manifold. All the materials and equipment used in the manifold are not expensive and accessible to the majority of the quality control laboratories.

Lista de Abreviaturas

AAN	Análise por Activação Neutrónica
CC	Cromatografia em Coluna
CCF	Cromatografia em Camada Fina
DL	Decreto-Lei
EAA	Espectrofotometria de Absorção Atómica
EAA-VF	Espectrofotometria de Absorção Atómica com geração de vapor frio
<i>ed.</i>	edição
Ed.	editor(es)
EEA	Espectrometria de Emissão Atómica
EFA	Espectrometria de Fluorescência Atómica
EFA-VF	Espectrometria de Fluorescência Atómica com geração de vapor frio
EFRX	Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X
EM	Espectroscopia de Massa
<i>et al.</i>	e colaboradores
FIA	Análise por Injecção em Fluxo
<i>i. e.</i>	isto é
ICP	Espectrometria de Emissão por Plasma
ICP-MS	Espectroscopia de Massa com Fonte de Plasma Induzido
IV	Infravermelho
m/m	massa/massa
m/z	massa/carga
MCFA	Análise por Injecção em Fluxo Contínuo Monossegmentado
p.	página(s)
PF	Ponto de Fusão
pH	potencial de hidrogénio

ppb	partes por bilião
ppm	partes por milhão
ppt	partes por trilião
PTFE	politetrafluoretileno
SFA	Análise por Fluxo Segmentado
SIA	Análise por Injecção Sequencial
TDHB	tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona
TF	temperatura de fusão
v/v	volume/volume
VMA	Valor Máximo Admissível
VMR	Valor Máximo Recomendado
<i>vs.</i>	<i>versus</i>

I. INTRODUÇÃO

1. O MERCÚRIO

Neste capítulo são apresentadas algumas das propriedades do mercúrio, suas fontes e aplicações e é efectuada uma referência à sua distribuição ambiental.

1.1. O MERCÚRIO E SUAS PROPRIEDADES

O mercúrio, cuja designação latina é *hydrargyrum* (que significa prata líquida), também conhecido como *quicksilver* (literalmente "prata viva") é um dos elementos pertencentes ao grupo conhecido como metais de transição. Na classificação periódica dos elementos integra o Grupo IIB. O mercúrio tem propriedades físicas e químicas pouco usuais (tabela 1.1.1), que o distinguem dos outros metais, sendo o único que se apresenta na fase líquida à temperatura ambiente^[1]. Este líquido denso, cor de prata e brilhante, tem uma pressão de vapor relativamente elevada para um metal, pelo que é ligeiramente volátil à temperatura ambiente^[2], e expande-se uniformemente com aumentos de temperatura^[3].

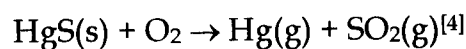
O mercúrio predomina na natureza na sua forma elementar. Sob o ponto de vista químico existe em dois estados de oxidação (+1 e +2), combinado na forma inorgânica com elementos como cloro, enxofre ou oxigénio^[1,4]. Combina-se em compostos organomercurados, após ligação com o carbono ou com grupos funcionais -SH. Outra das propriedades importantes é a capacidade para rapidamente formar soluções ou ligas com a maioria dos metais, amálgamas, excepto com ferro^[2,5].

Tabela 1.1.1: Algumas propriedades físicas e químicas do mercúrio. Adaptada de Budavari^[2].

Símbolo Químico	Hg
Massa atômica relativa	200,59
Número atômico	80
Números de oxidação	+1 e +2
Ponto de fusão	-38,87°C
Ponto de ebulição	+356,72°C
Pressão de vapor (25°C)	2x10 ⁻³ mm
Massa específica (25°C)	13,534g/cm ³
Capacidade térmica a pressão constante (25°C)	6,687cal/mol ^o
Calor de vaporização (25°C)	14,652kcal/mol
Tensão superficial (25°C)	484dynes/cm
Resistividade eléctrica (20°C)	95,76mohm/cm
Solubilidade em água (25°C)	0,28mmol/L

1.2. FONTES DE MERCÚRIO

O mercúrio é um elemento ubíquo que ocorre naturalmente em rochas, solos, águas e poeiras vulcânicas^[1]. O cinábrio (sulfureto de mercúrio vermelho) é o principal minério comercial de mercúrio^[5-6], já que contém cerca de 86,2% de mercúrio^[6]. O mercúrio pode ser obtido por ustulação do cinábrio ao ar com subsequente condensação do vapor de mercúrio libertado. Este processo pode ser traduzido pela seguinte equação química:



A produção mundial anual de mercúrio a partir do cinábrio cifra-se em 11.500 toneladas, estando os recursos mundiais estimados em 275.000 toneladas^[5]. Estima-se que as rochas continentais contêm uma

média de 80 partes por bilião (ppb), ou ligeiramente menos, deste elemento. Frequentemente, o carvão fóssil e a lenhite contêm mercúrio em níveis de 100 ppb, ou mesmo mais.

1.3. PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES E APLICAÇÕES DO MERCÚRIO

O mercúrio é empregue em centenas de aplicações, muitas das quais tiram partido da suas propriedades físicas e químicas pouco usuais, anteriormente descritas (tabela 1.3.1).

Tabela 1.3.1: Principais utilizações de mercúrio. Adaptada de Stein *et al.*^[1].

Nome	Forma	Utilização
Mercúrio	Metálico ou elementar	Produção cloroalcalina
		Enchimentos dentais
		Extracção minéria de ouro
		Equipamentos eléctricos (baterias, interruptores)
		Instrumentos (termómetros, barómetros)
Ião mercúrico	Inorgânico (Hg ²⁺)	Equipamentos eléctricos (baterias, lâmpadas)
		Produtos protecção da pele
		Produtos medicinais
Ião mercurioso	Inorgânico (Hg ²⁺)	Equipamentos eléctricos (baterias)
		Produtos medicinais
Ião fenilmercúrio	Orgânico (C ₆ H ₅ Hg ⁺)	Fungicidas
		Pigmentos (tintas)

A sua elevada tensão superficial, volume de expansão uniforme e incapacidade de molhar e aderir ao vidro, tornam-no muito útil em instrumentos de medida, tais como barómetros, hidrómetros, termómetros e pirómetros^[1-2]. Por ser um líquido bom condutor de electricidade é muito utilizado em interruptores eléctricos^[2-3]. A sua baixa resistividade eléctrica e elevada condutividade térmica tornam-no

um útil arrefecedor^[1]. Tirando partido das suas propriedades electroluminescentes e fotoluminescentes, o mercúrio é igualmente muito utilizado em lâmpadas fluorescentes, em lâmpadas de arco de mercúrio para produção de raios ultravioleta^[2], e em lâmpadas de mercúrio utilizadas para iluminação de ruas^[3].

O mercúrio encontra larga aplicação em baterias: o óxido mercúrico está presente numa pasta em baterias de "células de mercúrio" tais como as que são utilizadas em aparelhos de audição; quando a bateria opera e a corrente flui, é produzido mercúrio elementar. As baterias dos vulgares *flashes* contêm mercúrio como um constituinte menor no eléctrodo de zinco, para evitar a sua corrosão, e assim, aumentar o tempo de vida do produto. A utilização de mercúrio em material de uso doméstico, como o anteriormente referido, tem sido reduzida e, em breve, deverá ser totalmente eliminada. Esta acção decorre do reconhecimento que, deste modo, se eliminaria metade do mercúrio no lixo, cuja incineração constitui uma das principais fontes de poluição ambiental de mercúrio^[3].

Também tem sido explorada a capacidade do mercúrio em formar amálgamas com a maioria dos metais. Até ao século XIX, os objectos eram revestidos com ouro (dourados) ou prata (prateados), por polimento dos mesmos com uma amálgama de mercúrio e do metal precioso, sendo depois aquecido o objecto para evaporar o mercúrio^[3]. Da mesma forma, os espelhos eram feitos por aplicação de uma amálgama de mercúrio - estanho ao vidro^[2]. Ao trabalhar alguns depósitos de minério, pequenas quantidades de ouro e prata elementar são extraídas de quantidades muito maiores de escória por adição de mercúrio elementar à mistura. A amálgama formada é então aquecida para extrair o mercúrio. Este procedimento de extracção é, de modo

pouco cuidado, actualmente levado a cabo em grande escala no Brasil para produzir ouro, dele resultando uma substancial contaminação do ar e do próprio rio Amazonas^[3,7]. A “amalgama dental”, que tem uma consistência inicial pastosa e é utilizada para preencher cavidades nos dentes, resulta da combinação de proporções (m/m) aproximadamente iguais de mercúrio líquido e uma mistura que contém prata e estanho^[3].

A utilização industrial de mercúrio é também elevada. Um fluxo de mercúrio é utilizado como cátodo no processo electrolítico industrial de produção de NaOH (e de cloro) a partir de soluções de NaCl. O sódio reduzido solubiliza-se no mercúrio e é removido da solução de NaCl sem ter reagido no meio aquoso^[3,8].

Devido às suas qualidades anti-sépticas e conservantes, alguns compostos fenilmercurados são utilizados em fábricas de papel como limicidas e como retardadores do envelhecimento do papel^[3,5]. Os compostos fenilmercurados encontram aplicação na preservação de tintas, enquanto nas latas, e para prevenir o aparecimento do mildio após aplicação da tinta de látex, especialmente em áreas húmidas^[3]. Por outro lado, compostos alquilmercurados foram utilizados como fungicidas das sementes. Destes compostos referidos, os alquilmercurados tendem a resistir à degradação e são geralmente considerados uma maior ameaça para o ambiente do que os compostos arilmercurados ou inorgânicos^[5].

1.4. O MERCÚRIO NO AMBIENTE

O mercúrio é peculiar entre os tóxicos ambientais, na medida em que a contribuição humana de Hg para o ambiente (emissões

antropogénicas) é de menor significado quando comparada com as fontes naturais (emissões biogénicas). Na verdade, a emissão de mercúrio por fontes biogénicas é cerca de 4 vezes superior à emissão resultante de actividades de cariz antropogénico^[1]. As emissões biogénicas ocorrem principalmente por evaporação da litosfera e da hidrosfera, apesar de alguns autores^[3] considerarem como principal fonte de mercúrio biogénico os gases e partículas resultantes da actividade vulcânica. No que respeita às emissões antropogénicas (figura 1.4.1) cerca de 80% ocorre directamente para a atmosfera, cerca de 15% para o solo e apenas 5% para a água^[1]. Estas emissões resultam da presença de muitos produtos de utilização comum, anteriormente referidos.

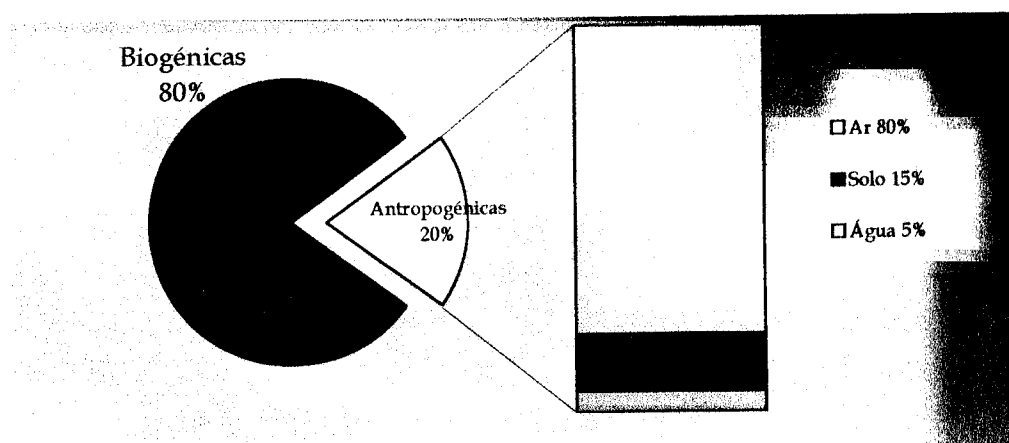


Figura 1.4.1: Distribuição ambiental de mercúrio. Adaptada de Stein *et al.*^[1].

Apesar de ser consensual a proporção entre as emissões biogénicas e antropogénicas, não existe consenso relativamente à variação da contribuição das emissões antropogénicas nas cargas totais globais de mercúrio ao longo do tempo, já que alguns autores pensam que se tem verificado um aumento das emissões antropogénicas, enquanto outros consideram que esta contribuição se tem mantido estável^[1]. Contudo, a enorme mobilidade do mercúrio pelos vários compartimentos

ambientais justificam uma referência mais detalhada quanto à distribuição e à dinâmica que lhe está associada.

1.4.1. O mercúrio no ar

Conforme anteriormente referido, cerca de 80% das emissões antropogénicas de mercúrio ocorrem para o ar. Estas emissões ocorrem, fundamentalmente, na forma de mercúrio elementar, e resultam, principalmente, da combustão de carvão e do crude, os quais contêm sempre quantidades vestigiais do elemento (podendo alguns carvões conter centenas de partes por milhão, ppm). Constituem igualmente fontes importantes, as resultantes da exploração e fundição mineira, e da incineração de resíduos sólidos^[1,3]. A emissão de mercúrio por incineração de resíduos sólidos, onde surgem produtos tais como baterias e termómetros, aumentou consideravelmente no século XX, rivalizando actualmente na contribuição para a atmosfera com a atribuída à actividade vulcânica^[3].

No ar, uma proporção elevada de mercúrio encontra-se no estado de vapor, estando apenas uma pequena fracção ligado a partículas atmosféricas^[3,5]. Este mercúrio atmosférico é capaz de transpor longas distâncias antes de se depositar sobre o solo ou sobre as águas^[3].

1.4.2. O mercúrio na água

As emissões antropogénicas de mercúrio ocorrem por descarga directa de efluentes industriais^[1] (por exemplo de indústrias cloroalcalinas^[5] e produtoras de acetaldeído^[9]). Em Portugal, este fenómeno é sentido na Ria de Aveiro, onde uma unidade industrial cloroalcalina é responsável pela contaminação da Ria com mercúrio^[8].

À contaminação provocada por esta unidade acresce ainda a contribuição das águas residuais domésticas. Por vezes, os efluentes domésticos contêm até 10 vezes mais mercúrio do que o que é tipicamente encontrado em águas naturais^[5]. As emissões biogénicas de mercúrio para o meio aquático são devidas a processos naturais, de entre os quais se realçam a desintegração e a decomposição das rochas e dos minerais, cujos lixiviados afluem a sistemas de água^[3,8]. A inundação de algumas áreas vegetais pode originar a libertação de mercúrio para a água^[3]. A actividade humana pode acelerar alguns destes processos.

1.4.3. O mercúrio no solo e em sedimentos

Cerca de 15% das emissões antropogénicas de mercúrio ocorrem para o solo, por aplicação directa de fertilizantes agrícolas e fungicidas, e por resíduos sólidos municipais (tais como as já referidas baterias e termómetros). No solo, o mercúrio pode ser retido de modo permanente sobretudo em terrenos argilosos^[5]. O mercúrio presente nos sedimentos pode também ter origem na adsorção do HgS que se forma nas águas naturais^[1,3]. Os sedimentos desempenham um papel extremamente relevante na distribuição de mercúrio, já que constituem os principais reservatórios de remoção e da biotransformação de mercúrio do ciclo global^[1].

1.4.4. Transformação, transporte e distribuição do mercúrio nos vários compartimentos ambientais

O transporte e distribuição de mercúrio é um processo dinâmico que ocorre simultaneamente nos vários meios ambientais. Os processos e reacções que controlam a distribuição dos compostos de mercúrio nos

sistemas ambientais são, principalmente, a metilação/desmetilação, a oxidação/redução, a precipitação/dissolução e a adsorção/dessorção. Da actividade humana decorrem, indirectamente, fenómenos como a crescente libertação de oxidantes para a atmosfera e a acidificação da chuva e dos lagos, que influenciam a distribuição do mercúrio no ambiente, *i. e.*, o seu ciclo global^[1]. Assim, um acréscimo na concentração de mercúrio atmosférico pode provocar um aumento da sua concentração noutros meios, tais como água, solo e biota. As relações que se estabelecem entre o mercúrio presente nos vários compartimentos ambientais estão expressas de modo reduzido na figura 1.4.4.1.

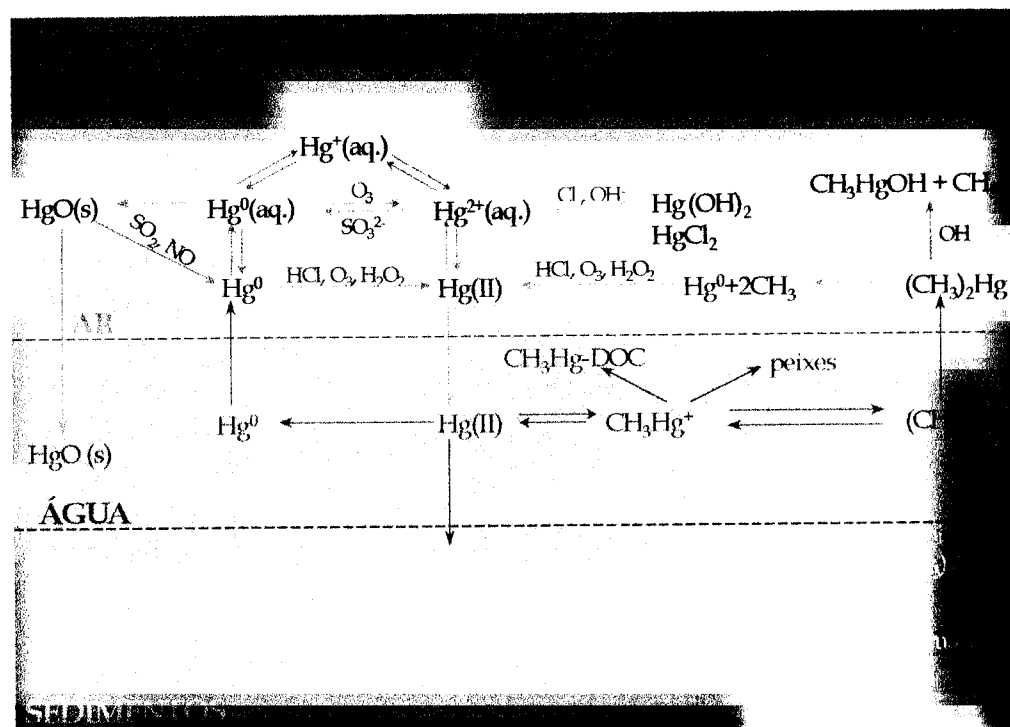


Figura 1.4.4.1: Transporte entre os diversos compartimentos ambientais e transformação de compostos de mercúrio. Representação esquemática das mais importantes transformações e vias de distribuição nos compartimentos ambientais ar, água e sedimentos. As linhas tracejadas representam as "fronteiras" entre os compartimentos ambientais. Adaptada de Stein *et al.*^[1]. Legenda: DOC - Carbono orgânico dissolvido.

Após ser libertado para atmosfera, o mercúrio elementar é oxidado, principalmente pelo O_3 , a $Hg(II)$ que, subsequentemente, intervém em reacções de complexação, especialmente com cloro, formando-se $HgCl_2$ ^[1]. O mercúrio depositado na água e no solo, é oxidado a $Hg(II)$. Uma vez oxidado, pode ser transformado em compostos de metilmercúrio, que são dos compostos de mercúrio mais importantes devido à sua elevada toxicidade. No processo de formação destes compostos, estão envolvidas bactérias anaeróbias sintetizadoras de metano, presentes nos sedimentos^[5]. A produção destes compostos é favorecida em águas e sedimentos onde exista défice de oxigénio, e realiza-se através da metilação do mercúrio inorgânico. O agente metilante é a metilcobalamina, um análogo da vitamina B_{12} e um intermediário na síntese de metano presente nestas bactérias^[3,5]. Devido à sua volatilidade, o dimetilmercúrio evapora-se rapidamente da água para a atmosfera, onde pode ser convertido a mercúrio elementar e a metano, através dum processo fotolítico, ou ser oxidado por um radical hidróxido^[1]. Contudo, sob condições ácidas, predomina a formação de monometilmercúrio^[3,5], espécie que pode ser absorvida por peixes^[1,3], entrando dessa forma na cadeia alimentar. Alternativamente, o monometilmercúrio pode ligar-se a carbono orgânico dissolvido^[1]. A desmetilação biológica envolve a hidrólise da ligação mercúrio - carbono, resultando $Hg(II)$ e metano. O $Hg(II)$ é, então, reduzido a mercúrio elementar, com subsequente volatilização deste. Os complexos inorgânicos de mercúrio formam-se em ambientes favoráveis a que ocorra oxidação. A formação destes complexos é importante já que podem aumentar a solubilidade de mercúrio. Estes complexos ficam sujeitos à oxidação a $Hg(II)$, o que pode levar à formação de metilmercúrio. Em condições redutoras, e na presença de agentes complexantes, como H_2S , forma-se HgS , que precipita e deposita-se em sedimentos^[1,3], motivo pelo qual os sedimentos são

considerados um importante reservatório de mercúrio^[1]. Pensa-se que o fluxo de mercúrio da água e do solo para a atmosfera, excede o fluxo de deposição, pelo que a atmosfera contribui com quantidades menores de mercúrio para o seu ciclo global.

1.4.5. O mercúrio na biota

A maior parte do mercúrio presente em humanos, está na forma de metilmercúrio, sobretudo originário do peixe ingerido na dieta. As quantidades de mercúrio ingeridas por esta via constituem uma preocupação maior quando comparadas com a quantidade atribuível à ingestão de água. Paradoxalmente, o mercúrio presente no peixe ingerido tem origem habitual em água fresca. Este paradoxo encontra explicação no facto de o mercúrio ser capaz de se bioacumular pelo facto de os processos de absorção do elemento serem muito mais rápidos que os processos de eliminação^[8].

Estima-se que, pelo menos 80% do mercúrio existente nos peixes está na forma de metilmercúrio. Os peixes absorvem o metilmercúrio dissolvido nas águas (que posteriormente atravessa as brânquias) ou através da sua dieta. A razão entre a quantidade de metilmercúrio existente no músculo do peixe e o que está dissolvido na água em que o peixe nada é frequentemente cerca de um milhão para um e pode exceder dez milhões para um. Muitos outros organismos aquáticos também promovem esta bioconcentração: por exemplo, ostras e mexilhões podem conter níveis de mercúrio 100.000 vezes maiores do que os encontrados na água em que vivem^[3]. Nos lagos de águas ácidas, o conteúdo de mercúrio nos peixes é geralmente superior, provavelmente porque a metilação do mercúrio, é mais célere a pH mais reduzido.

1.5. REFERÊNCIAS

- [1] E.D. Stein, Y. Cohen e A.M. Winer, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26 (1), 1 (1996).
- [2] S. Budavari (Ed.), *The Merck Index*, 11th ed., Merck & Co., Inc., Rahway, New Jersey, USA, 1989, p. 838-843.
- [3] C. Baird, *Environmental Chemistry*, W. H. Freeman and Company, USA, 1995, p. 287-290, 347-365, 384-391.
- [4] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <http://www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/tfacts46.html>, ToxFAQs - Mercury (1995).
- [5] S.E. Manahan, *Environmental Chemistry* 6th ed., Lewis Publishers, USA, 1994, p. 184-185, 315, 561-562, 676-677.
- [6] M.D. Mateo, R. Forteza, V. Cerdá, G. Lacort, M. Roura e M. Baucells, *Química Analítica*, 7 (2), 117 (1988).
- [7] W.L. Clevenger, B.W. Smith e J.D. Winefordner, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27 (1), 1 (1997).
- [8] M.E. Pereira e A.C. Duarte, *Indústria da Água*, 24, 47 (1997).
- [9] M. Ilyuschchenko, S. Bulatkulov e S. Heaven, Ecogeochemical Consequences of Contamination of the Nura River in Central Kazakhstan by Mercury-containing Wastewater from Acetaldehyde Production, in M. Stoeppler (Ed.), *Sampling and Sample Preparation - A Practical Guide for Analyst Chemists*, Springer, Heidelberg, 1997, p. 287-288.

2. O MERCÚRIO COMO ELEMENTO TÓXICO

Seguidamente referem-se alguns dos aspectos relacionados com a toxicidade do mercúrio.

2.1. TOXICIDADE DO MERCÚRIO

O mercúrio é considerado um dos metais mais tóxicos que ocorrem no ambiente^[1-2]. A sua toxicidade é há muito conhecida, tendo sido presumivelmente considerada na contabilização dos seis meses de esperança de vida dos escravos e condenados utilizados pelos Romanos na escavação das minas de mercúrio^[3]. Contudo, a maioria dos estudos relativos à toxicidade do mercúrio surgiram após o acidente de Minamata no Japão ocorrido entre 1953 e 1960^[4-6]. Este acidente resultou da contaminação da água da baía de Minamata com efluentes industriais contendo mercúrio inorgânico^[7]. O mercúrio, por acção dos microrganismos anaeróbios, presentes no fundo da baía e em sedimentos, foi biotransformado a metilmercúrio, forma em que se bioacumulou nos peixes. Da ingestão deste peixe contaminado, resultou o envenenamento e morte de algumas dezenas de pessoas^[7-9]. Outro grave incidente relacionado com metilmercúrio ocorreu no Iraque, em 1972, onde reconhecidamente mais de 6.000 pessoas foram expostas a metilmercúrio, tendo morrido mais de 500^[7]. O metilmercúrio tinha sido utilizado como fungicida aplicado a sementes de trigo e cevada, posteriormente cultivadas e utilizadas no fabrico de pão^[7,9]. Actualmente, as contaminações ambientais envolvendo mercúrio continuam a ocorrer frequentemente^[6,10], sendo este um factor de preocupação devido aos efeitos tóxicos nefastos que daí possam advir.

As propriedades biológicas do mercúrio devem-se, em grande parte, ao facto de ele rapidamente estabelecer ligações covalentes com enxofre^[1,5,7,9,11]. Quando o enxofre está na forma de grupos sulfidrilo, o ião mercúrico substitui o hidrogénio para formar mercaptidos, X-Hg-SR e Hg(SR)₂, em que X é um radical electronegativo e R a proteína. Mercaptidos do tipo RHg-SR' são formados a partir de compostos orgânicos de mercúrio. Mesmo em baixas concentrações, os compostos de mercúrio são deste modo capazes de inactivar enzimas e interferir com o metabolismo e função celular^[1,9]. O mercúrio pode igualmente reagir com outros grupos de importância fisiológica tais como fosforil, carboxil^[9,11], amida e amina.^[9]

2.1.1. VIAS PRINCIPAIS DE EXPOSIÇÃO A MERCÚRIO

As vias principais de exposição humana ao mercúrio dependem da forma em que este está presente (tabela 2.1.1.1). Normalmente, diferenciam-se três formas: mercúrio elementar, sais de mercúrio inorgânico e mercúrio orgânico, sendo todas elas tóxicas^[7,9]. Constituem formas mais tóxicas o mercúrio elementar e o metilmercúrio^[4], por inalação e por consumo de peixe contaminado, respectivamente^[3,4,12]. A inalação de vapor de mercúrio está geralmente associada a uma exposição ocupacional^[9], já que o ar de áreas não contaminadas contém cerca de 2,4 partes por trilião, ppt, de mercúrio^[12]. Contudo, a libertação de vapor de mercúrio, no decorrer de tratamentos médicos que envolvam amálgamas dentais ou na mastigação de alimentos que arrastam o enchimento dental, constitui também uma via comum de exposição a mercúrio elementar^[3,9,12].

Os sais inorgânicos de mercúrio, são principalmente provenientes de alimentos (que não peixe), constituindo o peixe, a água e o ar fontes

secundárias^[4]. A *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* dos Estados Unidos da América estimou níveis de risco mínimo, abaixo dos quais não se espera que ocorram efeitos tóxicos, de ingestão de água e alimentos com mercúrio orgânico e inorgânico. Assim, para exposições a mercúrio inorgânico e a mercúrio orgânico por ingestão de água (durante um período menor que 14 dias) esses valores foram estimados em 0,014 µg/L e 0,00027 µg/L, respectivamente. Para a ingestão de mercúrio inorgânico em alimentos (por um período superior a 14 dias) foi estimado em 0,063 ppm^[12].

Tabela 2.1.1.1: Estimativa da média diária de retenção de mercúrio em população não exposta ocupacionalmente ao mercúrio. Adaptada de Hardman *et al.*^[9].

Vias principais de exposição ao mercúrio	Média diária estimada de retenção de compostos mercuriais (µgHg/dia)		
	Mercúrio elementar	Sais inorgânicos de mercúrio	Metilmercúrio
Ar	0,024	0,001	0,0064
Alimentos	Peixe	0,0	2,3
	Excepto peixe	0,0	0,0
Água potável	0,0	0,0035	0,0
Amálgamas dentais	3-17	0,0	0,0
Total	3-17	0,3	2,31

2.2. TOXICIDADE DOS COMPOSTOS DE MERCÚRIO

Os mecanismos de absorção, biotransformação, distribuição e excreção de mercúrio dependem da forma em que este está presente, o que condicionará os seus efeitos tóxicos. Deste modo, é de todo conveniente efectuar, separadamente o estudo dos diversos compostos de mercúrio com expressão toxicológica.

2.2.1. Mercúrio elementar

A via principal de exposição dos seres humanos ao mercúrio elementar ocorre fundamentalmente por inalação. O mercúrio inalado difunde-se rapidamente através das membranas alveolares e é parcialmente oxidado a Hg(II) nos eritrócitos (num processo provavelmente mediado por catalases). Pensa-se que estas espécies de Hg(II) são as responsáveis pelos efeitos tóxicos após breve inalação de vapor de mercúrio. Contudo, uma fracção, na forma elementar, é transportada pelos eritrócitos a outros tecidos corporais. Dado que é lipossolúvel, rapidamente atravessa a barreira hemato-encefálica para o sistema nervoso central^[7,9,11]. Quando ingerido, o mercúrio metálico não é particularmente tóxico^[1,9], já que é fracamente absorvido pelo tracto gastrointestinal^[8,10-11], estimando-se cerca de 0,01%^[11].

Os sintomas apresentados após breve exposição ao mercúrio elementar incluem sabor metálico e um sentimento de opressão no peito, fraqueza, arrepios, tosse, dispneia, náuseas, vómitos e diarreia. O desenvolvimento de pneumonia intersticial com grave comprometimento da função respiratória decorre do facto de os pulmões constituírem a porta de entrada do mercúrio, pelo que são igualmente susceptíveis ao seu efeito tóxico. A recuperação pode ser completa, ou deixar sequelas como a fibrose intersticial residual^[9].

Relativamente à exposição crónica a vapor de mercúrio, os principais efeitos verificam-se ao nível do sistema nervoso central^[7,9,11]. Os primeiros sintomas não são específicos e estão ausentes alterações de comportamento^[9,11]. Com continuada exposição ao vapor de mercúrio, os sintomas tornam-se mais característicos, podendo progredir para tremores crónicos generalizados por todo o corpo e com manifestações

de violentos espasmos das extremidades. Registam-se adicionalmente alterações do foro psicológico, como mudanças de comportamento e personalidade, perda de memória, acrescida excitabilidade, depressão severa e mesmo delírio e alucinação^[11]. A tríade excitabilidade acrescida, tremores e gengivite foi, historicamente, reconhecida como a principal manifestação de exposição ao vapor de mercúrio, quando se utilizava nitrato de mercúrio na indústria das peles, feltros e chapéus^[1,9,11].

2.2.2. Sais inorgânicos de mercúrio

Quando ingeridos em alimentos ou na água, os sais inorgânicos de mercúrio, nas formas Hg(I) e Hg(II), são fracamente absorvidos pelo tracto gastrointestinal, apenas cerca de 7% do total, acumulando-se principalmente nos rins^[7,11]. A taxa de distribuição dos sais de mercúrio no sangue: células/plasma, pode variar entre 2 (em casos de elevada exposição) e menos que 1. A principal via de excreção é renal, apesar de inicialmente predominar a excreção através das fezes^[11]. O tempo de meia-vida do mercúrio no organismo é cerca de 40 dias^[7,11].

Os compostos inorgânicos de mercúrio podem provocar toxicidade aguda grave. A precipitação das proteínas das membranas mucosas, por sais de mercúrio resulta numa aparência cinzenta da mucosa da boca, faringe e intestino, causando dor intensa que pode ser acompanhada por vômitos. O efeito corrosivo local, do mercúrio inorgânico iónico na mucosa intestinal, resulta em hematoquesia evidenciada pelo encrustamento da mucosa nas fezes. Pode ocorrer um choque hipovolémico ou morte, na ausência de tratamento adequado. A toxicidade sistémica pode iniciar-se poucas horas após a exposição ao mercúrio e durar vários dias. O efeito tóxico sistémico mais grave de

mercúrio inorgânico, e frequentemente encontrado, exerce-se sobre o aparelho urinário. A necrose tubular renal ocorre mesmo após breve exposição. A exposição prolongada a mercúrio inorgânico é seguida de lesão renal. Relativamente aos compostos de mercúrio Hg(II), os sais de mercúrio Hg(I), como o cloreto de mercúrio, "calomel", são menos tóxicos e menos corrosivos, provavelmente, por serem menos solúveis. O complexo sintoma denominado acrodinia (doença rosa) ocorre, geralmente, após exposição crónica a cloreto de mercúrio (utilizado em tempos como pó de dentes) e consiste num eritema das extremidades, peito e face com fotofobia, diaforese, anorexia, taquicardia e obstipação ou diarreia^[1,9].

2.2.3. Compostos orgânicos de mercúrio

Os compostos orgânicos de mercúrio são os mais absorvidos pelo tracto gastrointestinal (cerca de 90-95%), pois são mais lipossolúveis e menos corrosivos que os sais inorgânicos de mercúrio. Na corrente sanguínea, distribuem-se por todo o organismo, especialmente pelo cérebro e em particular pelo córtex posterior^[7,11]. No fígado os compostos organomercuriais conjugam-se com a glutathione, sendo o conjugado secretado para a bile. Já na vesícula biliar, este conjugado pode ser reabsorvido novamente para a corrente sanguínea, num processo conhecido como recirculação entero-hepática (figura 2.2.3.1) ou, alternativamente, pode entrar no tracto intestinal^[7,9,11]. O metilmercúrio pode igualmente ser absorvido por conjugação com a cisteína (figura 2.2.3.2), já que forma um complexo semelhante à metionina e que é reconhecido pelas proteínas transportadoras das células capilares^[9].

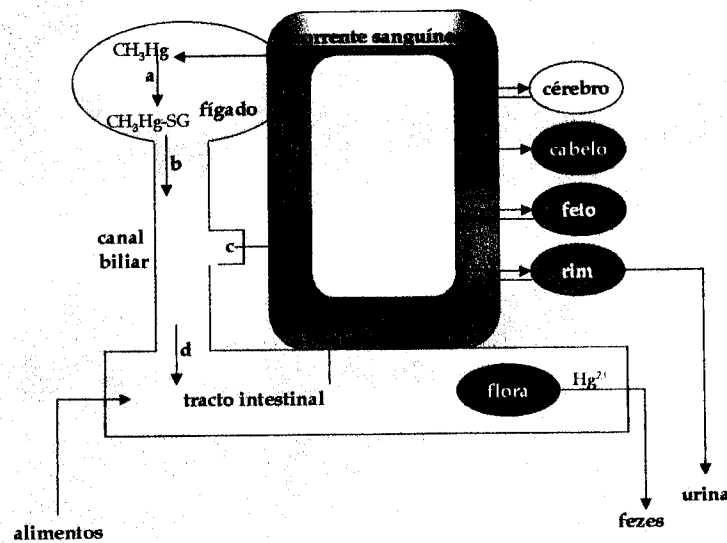


Figura 2.2.3.1: Mecanismo proposto para a entrada e distribuição dos compostos orgânicos de mercúrio no organismo humano. Adaptado de Hardman *et al.*^[9].

- Conjugação com glutatona (GSH);
 - Secreção do conjugado ($\text{CH}_3\text{-Hg-SG}$) para a bile;
 - Reabsorção pela vesícula biliar;
 - O Hg que não é reabsorvido penetra no trato intestinal.
- } Recirculação entero-hepática

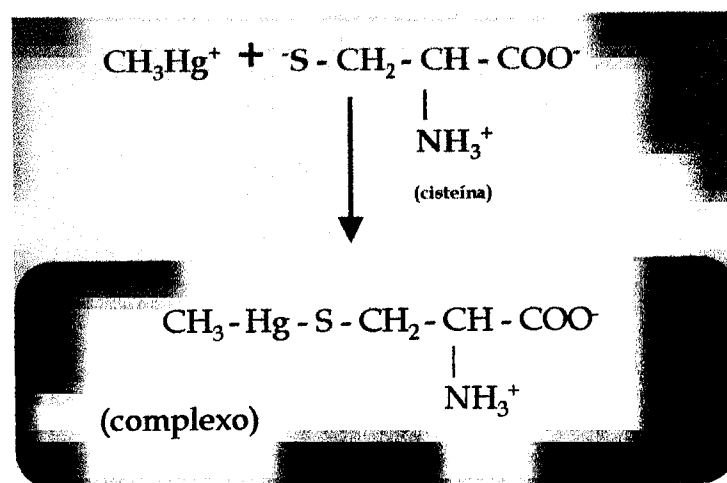


Figura 2.2.3.2: Entrada do metilmercúrio na corrente sanguínea por conjugação com a cisteína. Adaptada de Hardman *et al.*^[9].

O metilmercúrio sofre biotransformação a compostos de Hg(II) nos tecidos, por clivagem da ligação carbono-mercúrio^[9,11]; esta clivagem é bastante lenta e pensa-se que o mercúrio inorgânico formado não desempenha um papel importante na toxicidade do metilmercúrio^[9]. Os compostos contendo grupos arilo (por exemplo: fenilo) são convertidos a mercúrio inorgânico mais rapidamente que os compostos com grupos alquilo (por exemplo: metilo) de cadeia curta^[11], porque, geralmente, a ligação carbono-mercúrio é instável^[9], sendo a sua toxicidade semelhante aos compostos inorgânicos^[7,9]. A taxa células/plasma é cerca de 10 para o metilmercúrio^[11]. Cerca de 90% do metilmercúrio é excretado nas fezes^[7,11] sob a forma de um conjugado com glutational^[9]. O tempo de meia-vida do metilmercúrio é cerca de 70 dias^[7,11].

De entre os compostos orgânicos de mercúrio, o metilmercúrio é especialmente tóxico e esteve na base das mais graves exposições acidentais. Os sintomas da exposição a metilmercúrio são principalmente de origem neurológica e consistem em perturbação visual, ataxia, parestesia, neurastenia, perda auditiva, disartira, deterioração mental, tremor muscular, desordens de movimento, e em exposições graves, paralisia e morte^[2,9]. Determinadas regiões do cérebro revelaram ser particularmente sensíveis ao efeito tóxico do metilmercúrio, nomeadamente o córtex cerebral (especialmente o córtex visual) e a camada granular do cerebelo^[9].

Os efeitos do metilmercúrio no feto podem ocorrer mesmo quando a mãe é assintomática. De facto, todas as formas de mercúrio atravessam a placenta, acedendo ao feto. A concentração de mercúrio em certos tecidos do feto, como os eritrócitos, é superior à do tecido materno^[9,11]. O gradiente positivo materno-fetal e acrescida concentração de

mercúrio nos eritrócitos do feto, promovem a toxicidade fetal do mercúrio, especialmente após exposição a compostos alquilmercurados^[11]. Neste âmbito, observou-se retardamento mental e défices neuromusculares^[9].

2.3. TRATAMENTO DO ENVENENAMENTO POR MERCÚRIO

O envenenamento por mercúrio elementar ou inorgânico é habitualmente tratado com um agente quelante como o dimercaptopropanol (BAL - *British Anti-Lewisite*) ou a penicilamina. Contudo, estes agentes quelantes não são eficazes no tratamento de envenenamento por compostos alquilmercurados. No caso de ocorrer falha renal, a hemodiálise deve ser o tratamento prescrito^[7,9,11].

2.4. O MERCÚRIO E A LEGISLAÇÃO

O Decreto-Lei nº 236/98^[13], no seu Anexo XIX, inclui o mercúrio e os seus compostos na Lista I de famílias de grupos de substâncias. Esta lista é constituída por substâncias tóxicas, persistentes e bioacumuláveis. O referido DL estabelece as normas e os critérios de qualidade a que devem obedecer as águas naturais e residuais e no seu Anexo VI são apresentados o Valor Máximo Recomendável (VMR) e o Valor Máximo Admissível (VMA) de mercúrio em águas para consumo humano (tabela 2.4.1). O VMA de mercúrio é de 1µg/L, não estando definido nenhum VMR. O mercúrio é um parâmetro do Grupo G3, *i. e.*, com menor frequência de controlo, a qual é determinada em função do número de habitantes servidos pela rede de água. O referido DL, determina ainda, a Espectrometria Atómica como método analítico de referência para a determinação de mercúrio.

Tabela 2.4.1: Valores legislados para mercúrio em águas naturais e residuais.
 Legenda: VMR - Valor Máximo Recomendável; VMA - Valor Máximo Admissível;
 VLE - Valor Limite de Emissão.

Tipo de água (Documento legislativo)	VMR ($\mu\text{g/L}$)	VMA ($\mu\text{g/L}$)	VLE ($\mu\text{g/L}$)
Águas para consumo humano (DL 236/98 ^[13] - Anexo VI)	-	1,0	
Águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano (DL 236/98 ^[13] - Anexo I)	0,5	1,0	
Águas superficiais (DL 236/98 ^[13] - Anexo XXI)	-	1,0	
Águas residuais (DL 236/98 ^[13] - Anexo XVIII)			50
Águas residuais do sector da electrólise dos cloretos alcalinos (Portaria 1033/93 ^[15])	-	50	

No Anexo I do DL nº 236/98 estão descritas as normas de qualidade das águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano. Para as três categorias de água, (A1, A2 e A3, estabelecidas consoante o tratamento a que devem ser sujeitas) o VMR é $0,5\mu\text{g/L}$ e o VMA é de $1,0\mu\text{g/L}$. O método analítico de referência (Anexo III do DL) é a Espectrofotometria de Absorção Atómica sem chama, com vaporização a frio. Neste caso, o mercúrio é novamente considerado um parâmetro do Grupo G3. O Anexo XXI fixa os objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais, sendo o VMA de Hg total $1\mu\text{g/L}$.

No Anexo XVIII do referido DL, são apresentados os Valores Limites de Emissão na descarga de águas residuais, sendo este valor de $50\mu\text{g/L}$ para o Hg total e a Espectrometria Atómica sem chama com vaporização a frio o método analítico de referência (Anexo XXII).

Deve-se ainda referir que este DL veio revogar o Decreto-Lei 74/90^[14] e que relativamente ao mercúrio, os valores estabelecidos não se alteraram, tanto para as águas de consumo como para as águas residuais.

A Portaria nº 1033/93, ^[15], define as normas específicas de descarga de águas residuais do sector da electrólise dos cloretos alcalinos (este sector inclui as indústrias cloroalcalinas, que como referido anteriormente, são uma das fontes emissoras de mercúrio para o ambiente), sendo o VMA de mercúrio rejeitado por estas indústrias de 50µg/L.

2.5. REFERÊNCIAS

- [1] C. Baird, *Environmental Chemistry*, W. H. Freeman and Company, USA, 1995, p. 287-290, 347-365, 384-391.
- [2] S.E. Manahan, *Environmental Chemistry 6th ed.*, Lewis Publishers, USA, 1994, p. 184-185, 315, 561-562, 676-677.
- [3] Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <http://www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/tfacts46.html>, ToxFAQs - Mercury (1995).
- [4] E.D. Stein, Y. Cohen e A.M. Winer, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26 (1), 1 (1996).
- [5] M.D. Mateo, R. Forteza, V. Cerdá, G. Lacort, M. Roura e M. Baucells, *Química Analítica*, 7 (2), 117 (1988).
- [6] M.E. Pereira e A.C. Duarte, *Indústria da Água*, 24, 47 (1997).
- [7] J. Timbrell, *Principles of Biochemical Toxicology 2nd ed.*, Taylor & Francis Ltd., London, 1991, p. 371-374.

- [8] W.L. Clevenger, B.W. Smith e J.D. Winefordner, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27 (1), 1 (1997).
- [9] J.G. Hardman, L.E. Limbird (Ed.-In-Chief), P.B. Molinoff, R.W. Ruddon (Ed.) e A.G. Gilman (Consulting Ed.), *Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics 9th ed.*, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, USA, 1996, p. 1654-1659.
- [10] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <http://www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/alerts/970626.html>, National Alert - A Warning About Continuing Patterns of Metallic Mercury Exposure (1997).
- [11] C.D. Klaassen (Ed.), M.O.Amdur, J. Doull (Ed. emeriti), *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 5th ed.*, McGraw-Hill Companies, Inc., New York, USA, 1996, p. 710-712.
- [12] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <http://www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/ToxProfiles/phs8916.html>, Public Health Statement - Mercury (1990).
- [13] Decreto-Lei nº 236/98, *Diário da República, I Série-A, nº 176/98, 3676* (1998).
- [14] Decreto-Lei nº 74/90, *Diário da República, I Série, nº 55, 980* (1990).
- [15] Portaria nº 1033/93, *Diário da República, I Série-B, nº 242, 5822* (1993).

3. DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

Neste capítulo são abordados alguns dos aspectos relacionados com a determinação de mercúrio.

3.1. PROCEDIMENTOS HABITUALMENTE EMPREGUES NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

Devido à importância atribuída à água, como recurso fundamental e de suporte da vida, é importante o controlo da qualidade da mesma. Às entidades que se dedicam a esta actividade é exigida resposta em tempo útil, o que nem sempre é fácil ou possível (tome-se como exemplo o controlo microbiológico da qualidade da água). Desta forma, as entidades referidas devem encontrar os métodos de análise que melhor se ajustam às suas necessidades. Esta escolha não é fácil e deve ser objecto de enorme reflexão, já que requer um perfeito conhecimento dos problemas analíticos a solucionar^[1], tendo em consideração as necessidades e especificidades próprias de cada situação. Igualmente fundamental é o conhecimento das potencialidades das diferentes técnicas disponíveis e sua aptidão à resolução desses problemas^[1]. Alguns dos aspectos a ponderar, na escolha de um método, incluem: a necessidade e disponibilidade de instrumentação e de pessoal treinado e especializado para determinada técnica; os custos associados; a simplicidade e a celeridade da determinação; o limite de detecção, a linearidade, a precisão, a exactidão e as interferências do método; as possibilidades de automatização do procedimento. Geralmente não existe uma metodologia ideal, mas sim uma solução que representa o melhor compromisso entre estes aspectos de índole prática.

Quando considerada a determinação do mercúrio ambiental, particularmente em águas, a principal dificuldade reside no facto de o mercúrio estar presente em quantidades vestigiais sendo necessário efectuar a sua determinação através de técnicas com elevada sensibilidade.

Segundo Carron e Agemian^[2], as águas doces naturais contêm habitualmente $0,2\mu\text{g/L}$, e só raramente, mais de $0,5\mu\text{g/L}$. Contudo, e de acordo com a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*^[3], os níveis são, habitualmente, inferiores a $0,025\mu\text{g/L}$ em águas, tendo sido detectados níveis superiores a $0,5\mu\text{g/L}$ na água de alguns poços. Stein *et al.*^[4] compilaram os valores de concentração de Hg obtidos por outros autores em vários ambientes aquáticos, variando estes valores entre $0,0005$ e $0,015\mu\text{g/L}$ para águas presumivelmente não contaminadas. Para águas contaminadas com efluentes de indústrias cloroalcalinas e extracção mineira esses valores variam entre $0,0036$ e $0,104\mu\text{g/L}$. Pereira *et al.*^[5] efectuaram compilação semelhante, incluindo valores obtidos em Portugal, mas relativos apenas a ambientes antropogenicamente contaminados com mercúrio. Os valores apresentados variam entre $0,0002$ e $8\mu\text{g/L}$.

Adicionalmente, algumas formas de mercúrio apresentam elevada volatilidade pelo que deve ser dedicado um enorme cuidado na recolha e conservação, digestão e pré-concentração das amostras, quando se pretende objectivar a determinação de mercúrio. Estes procedimentos são fundamentais para o sucesso da determinação, pelo que lhes é devida especial atenção.

3.2. RECOLHA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS DE MERCÚRIO

O procedimento de recolha e a conservação da amostra (caso a análise não seja efectuada imediatamente) são importantes factores na análise ambiental de quantidades vestigiais de determinado elemento^[6]. Conforme anteriormente referido, estes aspectos assumem acrescida importância na análise de mercúrio devido à elevada volatilidade da maioria das suas formas. Deste modo, a prevenção de perdas de mercúrio por volatilização é fundamental não só durante a análise, mas também antes de esta ser efectuada^[6]. Toribara *et al.*^[7], em 1970, utilizando o radioisótopo ^{203}Hg , demonstraram que as perdas de Hg(II) em soluções diluídas ocorrem por redução deste ião a Hg(I) e subsequente dismutação deste a mercúrio metálico e sua volatilização. Shimomura^[8], utilizando o radioisótopo ^{203}Hg , concluiu que a alcalinização, com hidróxido de sódio, ou a adição de um agente redutor a uma solução contendo Hg(II) também favorece as perdas de mercúrio. Estes autores concluíram que estas perdas podem ser evitadas pela adição de reagentes complexantes (como iodeto ou cianeto) ou de agentes oxidantes (sendo a adição de permanganato de potássio em meio ácido bastante eficaz). Adicionalmente, Shimomura demonstrou que o mercúrio vaporizado pode ser recolhido numa solução ácida de permanganato de potássio 0,02mol/L. Este resultado, está em consonância com os resultados obtidos noutros estudos^[9].

Apesar de a volatilização ser a principal causa de perdas de mercúrio em solução^[8,10], a adsorção de mercúrio nas paredes dos recipientes em que a amostra é recolhida, pode também contribuir para as perdas de mercúrio^[11-15]. Christmann e Ingle^[15] apontam como possível mecanismo, as paredes dos recipientes funcionarem como superfícies

de permuta catiónica. A presença de concentrações elevadas de protão impede, contudo, a adsorção do metal. Coyne e Collins^[16] reportaram perdas de mercúrio em amostras de águas naturais armazenadas em recipientes de polietileno e não conservadas (cerca de 80% dos 50µg/L iniciais de mercúrio). A acidificação com ácido nítrico ou sulfúrico (para um pH final de 1) foi apresentada como a única solução para reduzir estas perdas. Contudo, o ácido deveria ser colocado no recipiente antes de se realizar a amostragem. Na sequência deste estudo, Rosain e Wai^[12] estudaram a conservação de amostras de água contendo mercúrio em recipientes de polietileno, cloreto de polivinilo e vidro macio, sugerindo a conservação das amostras em recipientes que não de cloreto de polivinilo e a acidificação com ácido nítrico até pH final de 0,5. Feldman^[13] sugere a utilização, em recipientes de polietileno de uma mistura de ácido nítrico e dicromato de potássio por forma a obter concentrações finais na amostra de 5% e 0,05% (v/v), respectivamente. O recipiente deve ser tratado antecipadamente e o período de conservação é de pelo menos dez dias. Para recipientes de vidro, sugeriu uma mistura de ácido nítrico e dicromato por forma a obter as concentrações de 5% e 0,01%, respectivamente, sendo a conservação possível até cinco meses. Na sequência destes estudos, Lo e Wai^[14] demonstraram que a adição de ácido nítrico (pH 0,5) evita a absorção do mercúrio nas paredes dos recipientes de polietileno. Adicionalmente, a adição de agentes oxidantes como dicromato de potássio ou Au(III) às soluções diluídas, previne as perdas por volatilização. Deste modo, estes autores sugerem a adição de dicromato de potássio (a pH 0,5) por forma a encontrar-se na concentração de 0,05% (m/m) ou 0,2mg/L de Au(III), como $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, às amostras de água (com 5µg/L de mercúrio), obtendo perdas inferiores a 3% ao fim de 21 dias de conservação em recipientes de polietileno. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Christmann e Ingle^[15]:

uma mistura de HNO_3 5,0% (v/v) e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,01% ou de HNO_3 1,0% (v/v) e $16\mu\text{g/L Au(III)}$ revelaram-se adequados para a conservação de amostras de mercúrio (em concentrações da ordem do $1,0\mu\text{g/L}$ e inferiores) durante pelo menos seis dias. Carron e Agemian^[2] efectuaram o estudo da conservação de mercúrio (em concentrações inferiores a $1\mu\text{g/L}$) em solução em vários recipientes e com várias soluções conservantes. Concluíram que uma mistura de H_2SO_4 1% e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,05% é a mais eficaz na eliminação das perdas de mercúrio. O pyrex[®] e o vidro macio foram os materiais que ofereceram melhores resultados. Seguiram-se, por ordem decrescente, o teflon[®], o polipropileno e o polietileno linear, tendo o polietileno comum apresentado os piores resultados. Estes autores efectuaram igualmente o estudo da lavagem dos recipientes, aspecto importante para o qual já Weiss e Shipman^[17] tinham chamado a atenção. O vidro provou ser o material que é melhor lavado quando comparado com o polietileno e com o polipropileno. A solução de lavagem mais eficaz é ácido nítrico ou crómico concentrado. Após a lavagem o recipiente deve ser imerso em H_2SO_4 1% e assim permanecer uma noite. Mateo *et al.*^[18] recomendam como procedimento de recolha colocar os recipientes de polietileno em ácido nítrico 1,5mol/L durante uma semana, lavando-os com a amostra, *in situ*, pelo menos quatro ou cinco vezes antes de efectuar a recolha. Foram propostos também outros reagentes para a preservação de soluções contendo mercúrio, tais como cisteína^[17] e cloreto de sódio^[19]. Contudo, o procedimento mais consensual recorre a uma mistura de um ácido com um agente oxidante.

O estudo da conservação de soluções contendo metilmercúrio, onde ocorrem igualmente perdas^[20] foi efectuado por Carron e Agemian^[2], tendo chegado à conclusão que a conservação de mercúrio, após adição de ácido e oxidante, é mais eficiente.

3.3. TRATAMENTO PRÉVIO DAS AMOSTRAS DE MERCÚRIO

No que concerne ao tratamento prévio das amostras de mercúrio, há a considerar a digestão e a pré-concentração, procedimentos que, como anteriormente referido, assumem especial importância no sucesso da determinação de mercúrio, devido à volatilidade de algumas das suas formas, bem como às baixas concentrações em que habitualmente se encontra presente.

3.3.1. Digestão de amostras de mercúrio

Várias técnicas analíticas requerem que o mercúrio se encontre dissolvido em solução, na forma de ião mercúrico, Hg(II), por forma a poder ser determinado. Por este motivo, em muitos métodos é frequente a necessidade de recorrer a uma digestão, existindo vários procedimentos para o efeito (tabela 3.3.1.1).

Tabela 3.3.1.1: Procedimentos de digestão. Adaptada de Vandecasteele *et al.*^[21].

Procedimentos de digestão		
Decomposição húmida	Sistemas abertos	
	Sistemas fechados	Aquecimento convencional
		Aquecimento microondas
	Combustão	Sistemas abertos
Baixa temperatura		
Sistemas fechados		Combustão em balão

A destruição da matéria orgânica constitui um problema devido à volatilidade do mercúrio e dos seus compostos covalentes, pelo que, os métodos de digestão por via seca em sistemas abertos não devem ser utilizados. Contudo, no procedimento de combustão em sistema fechado o elemento volatilizado é recolhido em solvente apropriado e

determinado^[21]. As perdas por volatilização devem também ser consideradas em procedimentos de digestão por via húmida^[18,22]. O *Analytical Methods Committee of the Society for Analytical Chemistry*^[22] comparou alguns métodos de digestão, recomendando o ataque das amostras com ácido nítrico e sulfúrico, utilizando um dispositivo próprio, idealizado por Gorsuch. O aproveitamento do destilado bem como do digerido minimiza as perdas de mercúrio. Contudo, em análises de rotina, uma digestão com permanganato pode ser mais conveniente. Actualmente, e para amostras de água, a digestão é normalmente efectuada por uma mistura de ácido e oxidante, parecendo consensual a utilização de uma mistura de ácidos sulfúrico e nítrico e de permanganato de potássio^[6,23].

3.3.2. Pré-concentração de amostras de mercúrio

A pré-concentração é definida como a operação (processo) pela qual a razão entre a concentração ou quantidade de microcomponentes (constituintes em quantidades vestigiais) e macrocomponentes (matriz) aumenta^[24]. Esta operação pode originar um aumento de sensibilidade do método, e atenuar o efeito de determinadas interferências físico-químicas da matriz^[18], contudo, aumenta o tempo de análise e torna o procedimento mais complicado e mais dispendioso^[24]. Existem vários modos de pré-concentração, nomeadamente a extracção, a redução/arejamento, a formação de amálgamas e a diálise, recaindo a sua escolha no método de determinação a utilizar. Os diferentes procedimentos existentes serão apresentados com a descrição das várias técnicas instrumentais de determinação de mercúrio, já que na maioria dos casos, um determinado procedimento foi concebido, e é especialmente adequado a uma determinada técnica. Apesar disso,

algumas técnicas utilizam procedimentos inicialmente aplicados noutras técnicas e que provaram ser eficazes.

3.4. TÉCNICAS INSTRUMENTAIS DE DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

Existe, actualmente, uma enorme diversidade de métodos analíticos de determinação de mercúrio baseados em diferentes técnicas instrumentais, nomeadamente a colorimetria, a Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA), a Espectrometria de Fluorescência Atómica (EFA), a Espectrometria de Emissão Atómica (EEA) e as Espectroscopias de Fluorescência de Raios-X (EFRX) e de Massa (EM). Foram igualmente propostos métodos radioquímicos, por exemplo baseados na Análise por Activação Neutrónica (AAN) e métodos electroquímicos, entre outros. Alguns autores^[6,11,18,23,25-27] apresentaram interessantes revisões destes métodos.

Seguidamente apresentam-se algumas das principais técnicas analíticas de determinação de mercúrio, procurando-se apresentar as suas vantagens e inconvenientes. Para o efeito, e tanto quanto possível, examinam-se aspectos como os custos, a instrumentação necessária, a necessidade de pessoal especializado, a simplicidade, o limite de detecção, a linearidade, a precisão, a exactidão, as interferências e as possibilidades de automatização, por constituírem os factores que geralmente condicionam a selecção de um método em situações práticas. Não se procura efectuar uma pesquisa exhaustiva dos métodos existentes, mas apenas referir os mais utilizados.

3.4.1. Métodos colorimétricos

Entende-se por determinação colorimétrica, aquela que é realizada com base na absorvência de radiação de comprimento de onda no espectro do visível, por uma ou várias espécies em solução. A determinação colorimétrica de mercúrio as vantagens de não exigir equipamento muito sofisticado, existente na maioria dos laboratórios de controlo de qualidade (fotómetro ou espectrofotómetro), nem pessoal altamente especializado para efectuar as determinações. Por outro lado, e por não ser uma técnica tão sensível nem possuir limites de detecção tão baixos como a EAA (por exemplo), frequentemente concretiza-se em procedimentos que incluem etapas de pré-concentração das amostras, o que aumenta o tempo, a complexidade da análise e dificulta a automatização das determinações. Adicionalmente, são susceptíveis a interferências de outros metais pesados que limitam a precisão e a exactidão. Devido ao facto do espectrofotómetro ser um instrumento existente, provavelmente, na quase totalidade dos laboratórios de controlo de qualidade, estes métodos são alvo de uma referência mais detalhada.

3.4.1.1. DETERMINAÇÃO COM DITIZONA

A determinação espectrofotométrica do complexo de mercúrio com ditizona, difeniltiocarbazona, constitui uma metodologia colorimétrica bastante utilizada e bem conhecida^[28-30]. O método apresenta algumas desvantagens: é complicado e laborioso, a insolubilidade do reagente (ditizona) e do complexo de mercúrio requerem a utilização de um solvente orgânico (como o tóxico clorofórmio) para a extracção do mercúrio, falta-lhe selectividade (dado que a ditizona é um quelante relativamente inespecífico) e é sensível à luz. Adicionalmente, o limite

de detecção do método^[30] (100µg/L) não permite a determinação de mercúrio nas quantidades em que habitualmente se encontra presente em águas naturais. Alguns autores procuraram obter limites de detecção mais reduzidos, tendo sido proposta a imobilização da ditizona em suportes vários^[31], efectuando-se, deste modo, a etapa de pré-concentração de mercúrio. Outros autores efectuaram a determinação com ditizona sem a incómoda etapa de extracção^[32-34]. Alguns destes procedimentos permitem obter limites de detecção reduzidos, na ordem de 1µg/L. Apesar disso, são muito afectados por interferências.

3.4.1.2. DETERMINAÇÃO BASEADA EM COMPLEXOS ANIÓNICOS DE MERCÚRIO COM IODETO E BROMETO QUANDO ASSOCIADOS A CORANTES CATIÓNICOS

A extracção de espécies moleculares do tipo $[HgX_n]^{x-n}$, em que X é, geralmente, iodeto ou brometo, para solventes não polares constitui um procedimento eficiente de separação de mercúrio^[29]. Diversos métodos^[35-38] fundamentam-se neste tipo de pré-concentração, sendo o mercúrio determinado com base na extracção do par iónico, e posterior complexação com um corante catiónico, originando um sistema ternário (complexo de associação iónica). Estas metodologias requerem uma extracção para um solvente orgânico como forma de pré-concentração do mercúrio. Contudo, a reacção do mercúrio com ligandos neutros e com corantes aniónicos, concretiza-se pela formação de complexos ternários em fase aquosa^[39].

3.4.1.3. DETERMINAÇÃO COM CORANTES AZO

Os corantes azo podem ser igualmente utilizados na determinação espectrofotométrica de mercúrio^[29]. Entre estes reagentes, os mais

utilizados são o 4-(2-piridilazo)resorcinol^[40] e o 1-(2-piridilazo)-2-naftol^[41]. As determinações efectuadas com estes compostos, geralmente, envolvem uma etapa de extracção^[29] e apresentam reduzida sensibilidade e limites de detecção. Como forma de contornar esta dificuldade, alguns trabalhos^[42-47] relatam a adição de agentes tensoactivos (catiónicos, aniónicos e neutros) a diversos derivados destes compostos, por forma a efectuar a determinação na fase aquosa, sem a incómoda necessidade de recorrer a uma extracção.

3.4.1.4. DETERMINAÇÃO COM COMPOSTOS DE ENXOFRE

Quando se descreveu a toxicidade dos compostos de mercúrio, foi referido que as suas principais propriedades biológicas advêm da sua elevada afinidade com grupos sulfidrilo, constituídos por átomos de enxofre. Esta afinidade concretiza-se em diversos procedimentos colorimétricos^[48-49] fundamentados na reacção de mercúrio com compostos orgânicos de enxofre. Estes compostos apresentam elevada selectividade no que concerne ao mercúrio, motivo pelo qual, geralmente, não é efectuada uma extracção nos procedimentos envolvendo estes compostos.

3.4.1.5. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS ACOPLADOS À DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE MERCÚRIO

Os métodos cromatográficos por vezes surgem associados à determinação colorimétrica de mercúrio, permitindo uma separação do mercúrio de outros metais. Foram propostas, para o efeito, a Cromatografia em Camada Fina^[50] e a Cromatografia Líquida de Alta Resolução^[51]. Esta última foi proposta^[52] para a determinação das diferentes formas em que mercúrio se encontra presente, aspecto de

particular importância, devido aos diferentes efeitos tóxicos das diversas formas de mercúrio.

3.4.1.6. DETERMINAÇÃO BASEADA EM MÉTODOS CATALÍTICOS

A utilização de métodos catalíticos apresenta a vantagem de não necessitar do recurso a etapas de pré-concentração. Contudo, são geralmente susceptíveis a muitas interferências. Diversos métodos cinéticos baseados no efeito catalítico do mercúrio sobre algumas reacções químicas, nomeadamente a reacção de substituição do cianeto no ião hexacianoferrato(II), $[K_4Fe(CN)_6]$, têm sido propostos para a determinação espectrofotométrica de mercúrio^[53-54]. Outros procedimentos cinéticos fundamentam-se no efeito inibidor do Hg(II) na reacção de oxidação da tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona (TDHB), pelo peróxido de hidrogénio, catalisada pelo cobre^[55]. A acção inibidora do mercúrio sobre a peroxidase de rábano bravo, imobilizada em suporte sólido (em células de placa de poliestireno ou em papel cromatográfico), na presença de tioureia está na base de outro procedimento catalítico^[56].

3.4.2. Espectrofotometria de Absorção Atómica (EAA)

A determinação de mercúrio por absorção atómica consiste na medida da intensidade de radiação absorvida pelo vapor de mercúrio elementar e é, normalmente, efectuada a 253,7nm (apesar de a 184,9nm a absorção ser cerca de 30 vezes superior, sofre da interferência de espécies moleculares como o oxigénio)^[18,23]. Nesta determinação empregam-se geralmente três tipos de atomização: atomização em chama, atomização por vapor frio e atomização em câmara de grafite. Nas determinações de mercúrio por EAA, obtêm-se elevadas

sensibilidades e baixos limites de detecção. A instrumentação necessária (dependente do tipo de atomização utilizada) é mais dispendiosa do que a utilizada em determinações colorimétricas, mas menos do que a utilizada em EFA ou AAN. A especialização do pessoal que efectua as determinações é menor do que em espectrofotometria, já que, normalmente, são mais simples devido à quase ausência de tratamentos prévios, o que simplifica a determinação e diminui o tempo de análise.

3.4.2.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA - ATOMIZAÇÃO EM CHAMA

A EAA com atomização em chama, ou EAA convencional, não é um método de eleição para a determinação de mercúrio, pois este tem tendência para formar moléculas estáveis na chama^[25]. Por outro lado, em EAA o limite de detecção do método é condicionado pela baixa eficiência da nebulização e pelo reduzido tempo de permanência do vapor atómico no trajecto da radiação. Os limites de detecção obtidos por este método (cerca de 0,5mg/L) são menos favoráveis que os obtidos com os métodos com atomização modificada.^[6,25,27] A sensibilidade é condicionada pela forte absorção molecular, neste comprimento de onda, dos produtos de combustão.

Como este modo de atomização requer que todo o mercúrio esteja em solução, e na forma de Hg(II), normalmente, efectua-se uma digestão por forma a dissolver todo o mercúrio. A digestão ácida e oxidativa das amostras ou a combustão em frasco de Schöniger são os tratamentos prévios comuns. A extracção prévia do mercúrio para um solvente orgânico pode melhorar a sensibilidade da determinação^[6]. Dos vários tipos de atomização, a atomização em chama apresenta a

vantagem de ser a menos dispendiosa, sendo a que requer menor especialização do operador e permite efectuar as determinações mais rapidamente.

3.4.2.2. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA - VAPOR FRIO (EAA-VF)

Este modo de atomização, introduzido em 1968 por Hatch e Ott^[57], consiste na redução dos iões mercúricos em solução ao estado elementar; a solução é, posteriormente, arejada por uma corrente de ar ou gás inerte, libertando o mercúrio para a fase gasosa (devido à sua elevada pressão de vapor) e arrastando-o para a célula de medida espectrofotométrica, onde é medida a sua absorvência a 253,7nm. Conforme anteriormente referido, a geração de vapor frio requer que o mercúrio em solução esteja na forma de Hg(II), já que os redutores normalmente empregues (cloreto estanoso e borohidreto de sódio) promovem apenas a redução desse ião^[18,25,58]. O SnCl₂ é o agente redutor mais utilizado devido à sua maior estabilidade e natureza reactiva menos violenta^[25]. Apesar disso, apenas reduz o mercúrio inorgânico^[18], daí que seja frequente recorrer a uma digestão da amostra, habitualmente uma mistura de ácido e permanganato^[6,22-23]. O excesso de oxidante (que permanece após a digestão) é removido por adição de um agente redutor como sulfato de hidroxilamónio ou ácido ascórbico. O agente redutor é adicionado imediatamente antes do arejamento^[6]. Inicialmente aplicada à EAA, a geração de vapor frio de mercúrio é actualmente o modo de atomização mais utilizado, quer em EAA, quer em EFA. Tal sucesso deriva dos limites de detecção reduzidos (podendo ser inferiores a 1,0ng/L) que se conseguem obter, da elevada sensibilidade, de ser um método relativamente livre de interferências e de ser necessária instrumentação simples e não muito

dispendiosa^[25]. Quando comparada com a EAA convencional, é muito mais sensível, cerca de 100 a 1000 vezes. As interferências são também menos severas, pois o mercúrio é separado da solução antes da determinação. Para além disso, não apresenta fontes inerentes de interferências dispersantes de radiação, ao contrário do que ocorre em EAA convencional, onde os produtos de combustão da chama absorvem nesta região do espectro^[11]. Contudo, moléculas contendo sulfureto e compostos orgânicos cíclicos interferem nesta determinação pois volatilizam e absorvem a 253,7nm^[6,27]. Também interferem os metais nobres e o cobre^[18,23]. Abdallah *et al.*^[59] estudaram as interferências de brometo, bromato, iodeto, iodato, periodato, sulfuretos, sulfito e tiosulfato, tendo concluído que podem ser eliminadas em meio alcalino, com adição de NaOH. Relataram igualmente a interferência de alguns insecticidas. O vapor de água interfere, não por absorção, mas por deposição nas paredes da célula espectrofotométrica^[18].

3.4.2.3. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA - ATOMIZAÇÃO ELECTROTÉRMICA

A atomização electrotérmica possibilita a obtenção de sensibilidades e limites de detecção comparáveis aos obtidos pela EAA-VF. Todavia, é mais susceptível a interferências diversas^[25], principalmente a ocorrência de absorção molecular devida a outras substâncias moleculares voláteis, com origem na matriz, que absorvam na mesma zona do comprimento de onda do Hg e a dispersão de radiação provocada por fumos e partículas^[23]. Estas interferências devem ser subtraídas às medidas efectuadas, tal como na atomização por chama, o que, em muitos espectrofotómetros, é realizado automaticamente através dum sistema de correcção de fundo (por exemplo utilizando

uma lâmpada de deutério). Outra abordagem na eliminação deste tipo de interferências consiste em separar o mercúrio dos vapores interferentes, seja por arejamento prévio da amostra ou recolhendo-o e concentrando-o, antes da determinação^[18,23]. Esta recolha e concentração pode ser efectuada em amálgamas com ouro ou outros metais nobres (sendo depois libertado por aquecimento), em carvão activado^[18], em resinas quelantes ou numa solução ácida com agente oxidante (habitualmente permanganato).

Quando se emprega a atomização electrotérmica na determinação de elementos voláteis como o mercúrio, podem também ocorrer perdas de analisado durante a secagem e a pirólise (fase de destruição da matriz). Esta dificuldade restringe a temperatura de pirólise a utilizar. Contudo, estas perdas podem ser evitadas recorrendo normalmente ao uso de modificadores de matriz que estabilizam o elemento e permitem realizar o processo sem perdas^[18].

3.4.3. Espectrometria de Fluorescência Atómica (EFA)

Existem vários tipos de luminescência consoante os mecanismos de excitação e desexcitação envolvidos. As transições de fluorescência ressonante envolvem a excitação electrónica de um átomo, por absorção de um fóton, do estado fundamental de energia a um estado superior de energia seguindo-se a emissão de energia radiante no regresso ao estado fundamental. Em EFA as determinações são baseadas neste tipo de fluorescência^[11]. A principal linha de ressonância de mercúrio é a 184,9nm, no entanto, e devido à absorção pelo oxigénio atmosférico as determinações de mercúrio são, geralmente, efectuadas a 253,7nm^[11,60]. Em EFA, e à semelhança do que ocorre em EAA, existem os modos de vaporização em chama e vaporização sem chama. A geração do vapor

frio é a mais utilizada, com as vantagens já descritas anteriormente, *i. e.*, a obtenção de limites de detecção consideravelmente menores, cerca de 100 a 1000 vezes, sendo muito menos afectada por interferências.

A EFA apresenta outras vantagens em relação à EAA: não são utilizadas células fechadas, o que elimina a interferência causada pela deposição de vapor de água nas paredes da célula, não é necessário utilizar um agente exsiccador e não têm significado as interferências por absorção^[6]. Contudo, os efeitos de dispersão da luz por partículas são maiores^[18]. Adicionalmente, o intervalo em que existe a relação linear sinal analítico *vs.* concentração é maior, a sensibilidade é mais elevada e o limite de detecção mais reduzido^[6,11,25,60], como em qualquer outra técnica de luminescência.

Conjuntamente com a EAA-VF, a EFA-VF é a técnica mais utilizada na determinação de mercúrio em concentrações vestigiais, devido ao bom compromisso sensibilidade/custos que oferece.

3.4.4. Espectrometria de Emissão Atômica (EEA)

A espectrometria de emissão atômica (EEA), baseia-se na medição da intensidade da radiação emitida por átomos excitados, previamente vaporizados. A excitação pode ocorrer numa chama ou num plasma. Um plasma é uma massa gasosa electricamente neutra, composta por iões, electrões e partículas neutras, onde se atingem temperaturas extremamente elevadas. São utilizados vários tipos de plasma consoante a fonte de excitação, nomeadamente, os plasmas de descarga^[61], DCP ou ICP, os plasmas de indução por microondas^[62], MIP, e os plasmas de descarga de anel de baixa pressão^[63], RDP. A técnica consiste em arrastar o vapor de mercúrio elementar (geralmente

originado por vapor frio) para o plasma, através de uma corrente de gás (He ou Ar). No plasma, é efectuada uma descarga responsável pela excitação dos átomos. A intensidade da radiação emitida é então medida^[6,25,61].

As determinações por EEA têm a vantagem de utilizar detectores de elevada sensibilidade, capacidade de análise multielementar, larga zona de linearidade e elevada selectividade. Contudo, os limites de detecção dos métodos para a determinação de mercúrio que utilizam a EEA estão condicionados pelo elevado potencial de ionização do mercúrio, tornando difícil a excitação térmica mesmo recorrendo a plasmas. Outra das desvantagens traduz-se na ocorrência de interferências espectrais^[25].

3.4.5. Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (EFRX)

Esta técnica geralmente requer uma etapa de pré-concentração, já que não permite obter sensibilidades adequadas às actuais necessidades (sendo consideravelmente inferior à EAA e AAN). É afectada por um grande número de factores e qualquer correcção de interferências, envolve cálculos. Para além disso, poucos laboratórios estão equipados de forma a poderem efectuar este tipo de análise^[6]. Esta técnica tem como vantagem a capacidade de análise multielementar^[64-65].

3.4.6. Espectroscopia de Massa (EM)

A Espectroscopia de Massa baseia-se na conversão da amostra a um vapor iónico, que é encaminhado para o analisador de massa através de um campo magnético. Deste modo, é efectuada a separação de fragmentos de diferente razão massa/carga^[21,66]. Esta técnica apresenta

as desvantagens de requerer equipamento dispendioso, bem como operadores especializados para efectuar as determinações. Contudo, permite a obtenção de limites de detecção reduzidos, podendo as determinações ser efectuadas com pequenas quantidades de amostras. Adicionalmente, é adequada à determinação em amostras sólidas e tem capacidade de análise multielementar, nomeadamente quando acoplada a ICP^[21]. As técnicas de EEA e EM com plasma permitem, actualmente, obter limites de detecção ao nível dos obtidos por EAA-VF e EFA-VF, com a vantagem adicional de terem capacidade de análise multielementar e a desvantagem de serem muito dispendiosos. Foi proposta a determinação de mercúrio através de ICP-MS^[67].

A aplicação da EM à determinação de compostos organomercurados é possível, devido à presença de seis isótopos abundantes do mercúrio. Deste modo, os espectros que os contêm são facilmente identificáveis, e a identificação é possível com ou sem eliminação da matriz. No entanto, apenas estão disponíveis espectros de alguns compostos^[18].

Estes métodos espectrométricos descritos, apresentam as vantagens de serem adequados à automatização e à combinação com métodos cromatográficos. Os métodos cromatográficos permitem a separação e quantificação das diferentes formas de mercúrio, aspecto de primordial importância, devido aos diferentes efeitos tóxicos das diferentes formas de mercúrio^[25].

3.4.7. Análise por Activação Neutrónica (AAN)

A Análise por Activação baseia-se na produção de um radionúcleo do elemento a analisar, sendo a Análise por Activação Neutrónica a sua variante mais comum. Nesta variante, a amostra, contida num reactor

nuclear, é geralmente irradiada por neutrões de baixa energia (térmicos), que ao ser absorvidos, provocam que o núcleo passe a um estado excitado de energia, originando um radionúcleo. A radiação emitida por estes é medida em detector adequado após um intervalo de tempo variável, dependente do tempo de meia-vida do núcleo. Quase todas as aplicações de AAN baseiam-se na medição da radiação γ [21].

Na determinação de mercúrio, o procedimento concretiza-se na irradiação da amostra - contida num recipiente de quartzo ou polietileno - com neutrões para produzir isótopos radioactivos, medindo imediatamente a sua radiação γ . As reacções mais utilizadas são $^{196}\text{Hg}(n, \gamma) \rightarrow ^{197}\text{Hg}$ e $^{202}\text{Hg}(n, \gamma) \rightarrow ^{203}\text{Hg}$. A primeira permite a detecção de menores quantidades de mercúrio, já que a segunda é mais susceptível a interferências[6]. Contudo, e apesar da radiação inicial do ^{197}Hg ser mais alta, o ^{203}Hg tem uma vida média superior - 47 dias em relação às 65 horas do anterior - pelo que, possibilita a realização das medidas após um período de algumas semanas[18].

A AAN é adequada para a análise de amostras sólidas, já que podem ser irradiadas sem necessidade de as dissolver. Esta é uma importante vantagem relativamente à EM, já que o manuseamento de amostras de mercúrio pode levar a perdas do mesmo, devido à sua volatilidade. As amostras de água podem igualmente ser irradiadas, mas habitualmente é necessário efectuar uma pré-concentração das mesmas.

Apesar de ser um método de grande valor, pelo seu carácter não destrutivo, pela sua sensibilidade, rapidez e ausência da necessidade de um branco e de muitos reagentes[25], a activação neutrónica tem os inconvenientes de requerer um equipamento muito custoso e pouco acessível, pessoal especializado e um largo tempo de análise[18]. Para

além disso, o desvio típico das medidas de AAN é relativamente elevado, devido à necessidade de corrigir os picos sobrepostos de mercúrio e selénio.

3.4.8. Métodos baseados em propriedades electroquímicas

Os métodos baseados em propriedades electroquímicas propostos para a determinação de mercúrio^[68-69], geralmente, são simples e não requerem instrumentação dispendiosa, apesar de não permitirem a obtenção de limites de detecção abaixo do $\mu\text{g/L}$. Para além disso, não oferecem grandes possibilidades de determinação das diferentes formas em que o mercúrio se pode encontrar presente^[25].

Liu *et al.*^[68] monitorizaram a reacção enzimática de hidrólise da ureia, catalisada pela urease (que é inibida por Hg) através dum dispositivo SAW (*Standing Acoustic Wave*) com um par de eléctrodos paralelos. Uma alteração na condutividade do electrólito na solução resulta numa frequência de resposta do SAW/tradutor da impedância da enzima. A utilização de uma sonda electroquímica de glucose permitiu efectuar a determinação de Hg(II), metil-Hg e etil-Hg^[69], com base no efeito inibidor do mercúrio na reacção de degradação de sacarose a glucose, catalisada pela invertase. O decréscimo na concentração de glucose (provocado pela inibição da enzima) foi correlacionado com a concentração de mercúrio.

3.5. PROCEDIMENTOS AUTOMATIZADOS

A automatização analítica tem despertado enorme interesse nas últimas décadas, o que se tem reflectido no aparecimento de diversos

equipamentos comerciais. Este interesse manifesta-se, principalmente, no campo das análises clínicas, onde é imperativo obter um elevado número de dados analíticos o mais rapidamente possível e da forma menos dispendiosa. Todavia, a automatização também se reveste de elevada importância para a indústria, nomeadamente ao nível do controlo de qualidade. Dado que os salários de técnicos especializados representam uma importante parcela dos custos de produção, existe uma tendência para o recurso a trabalhadores não especializados para operar em instrumentação que sendo praticamente autónoma requer intervenção humana mínima^[70].

A automatização apresenta vantagens também ao nível do desempenho da análise química propriamente dita. O tratamento automático de soluções, quando substitui as operações manuais de pipetar, dispensar, misturar e separar, permite uma drástica redução dos volumes de amostra e de reagente, sem prejuízo da reprodutibilidade; deste modo, poupa-se tempo, material e energia^[71]. A maior parte dos sistemas automáticos são controlados por microprocessador. Estes dispositivos pouco dispendiosos no âmbito dos custos laboratoriais tornam possível estender a automatização à aquisição, armazenamento e tratamento de dados. Deste modo, a automatização laboratorial é facilitada pela utilização de computadores pessoais, que são cada vez mais potentes, compactos e baratos. Adicionalmente, podem comunicar com instrumentos científicos, o que permite a implementação de experiências controladas de modo automático^[72]. As técnicas de automatização são, habitualmente, classificadas em três categorias: discretas, fluxo contínuo e robotização, nelas se distinguindo vários métodos (tabela 3.5.1). Contudo, esta classificação não é consensual. A técnica de fluxo contínuo tem sido englobada num conjunto mais vasto de que fazem parte as

cromatografias e a electroforese capilar, embora estas não sejam propriamente consideradas como técnicas de automatização. Também mais recentemente, foi proposta a classificação dos métodos de fluxo contínuo não segmentado em diferentes categorias: injeção em fluxo contínuo (FIA), injeção com interrupção de escoamento, multicomutação e injeção sequencial (SIA)^[73]. A diferença entre estes métodos será aprofundada mais adiante.

Tabela 3.5.1: Classificação das diversas técnicas de automatização.

Categorias de técnicas de automatização	
Discretos	Não centrífugos
	Centrífugos
Fluxo contínuo	Fluxo segmentado (SFA)
	Fluxo monossegmentado (MCFA)
	Fluxo não segmentado (FIA, SIA e multicomutação)
Robotizados	

3.5.1. Técnicas de automatização

Nas seguintes secções são descritos alguns dos aspectos relativos aos diferentes tipos de técnicas de automatização.

3.5.1.1. TÉCNICAS DISCRETAS

Os métodos englobados na automatização discreta assemelham-se, geralmente, a versões mecanizadas dos procedimentos manuais. A amostra é mantida, separadamente, num recipiente no qual ocorrem os diferentes estágios analíticos - como sejam, diluição, adição de reagentes, mistura, aquecimento e medida - necessários à realização da determinação. A amostra é mecanicamente transportada para as diferentes unidades de dispensa de soluções, sendo posteriormente

enviada para o detector, onde um sinal correspondente à concentração da espécie a determinar é obtido e registado^[70-71]. Nestes sistemas, os equilíbrios físico e químico devem ser atingidos antes de efectuar a determinação, excepto se estiverem programados para a realização de determinações cinéticas^[70]. As desvantagens deste tipo de analisadores discretos são a sua complexidade mecânica e elevado custo de operação. Adicionalmente, este equipamento só raramente é utilizado fora do laboratório clínico, já que é concebido para efectuar os testes de bioquímica clínica de rotina^[71]. Contudo, estes métodos adaptam-se facilmente à determinação de vários parâmetros de uma amostra. Adicionalmente, estas metodologias permitem obter um ritmo de amostragem elevado^[70-71].

3.5.1.2. TÉCNICAS DE FLUXO CONTÍNUO

Nos métodos englobados na análise em fluxo contínuo, a concentração da espécie a determinar é medida sem interromper o fluxo de um líquido ou gás^[70]. Esta definição não faz, actualmente, pleno sentido, na medida em que existe, pelo menos, um modo de operação em que o escoamento é interrompido^[73]. As amostras são introduzidas, sucessivamente e em intervalos regulares, num canal, através do qual flui um líquido contendo o reagente. Alternativamente, o reagente pode ser adicionado posteriormente (após injeção da amostra) através de canais auxiliares que confluem no canal principal, num dispositivo denominado confluência. Então, o fluxo passa através da célula de fluxo do sistema de detecção e a corrente emergente é rejeitada. O sinal resultante, contínuo por natureza, é registado. Cada amostra origina um sinal em forma de pico com características - geralmente a altura do pico - relacionáveis com a concentração da espécie a determinar na amostra ^[70].

As operações em fluxo são mais facilmente controláveis no espaço e no tempo, já que a utilização de tubagem fechada impede a evaporação de líquidos, fornece trajectos repetíveis, através dos quais as soluções se movem e cria o ambiente para uma muito reprodutível mistura de componentes e formação dos produtos de reacção. Dado que os escoamentos podem ser misturados, detidos, reiniciados, revertidos, divididos, recombinados e amostrados, enquanto que os tempos de contacto com secções seleccionadas de reagente ou de superfícies sensibilizadas podem ser precisamente controlados, as operações em fluxo tornam-se muito versáteis. A análise em fluxo contínuo permite automatizar, adicionalmente, operações mais complexas como diálise, destilação, extracção por solventes e outro tipo de separações. Por outro lado, as operações em fluxo permitem a utilização de um maior leque de sensores e detectores de uma forma muito mais reprodutível em relação às operações efectuadas de modo convencional^[71]. A abordagem de fluxo contínuo é a forma mais flexível de manusear soluções, pelo que merece ser estudada em maior profundidade.

Há dois tipos de métodos de fluxo contínuo: a Análise por Fluxo Segmentado (SFA) e os métodos de análise em fluxo não segmentado ou monossegmentado. Entre os métodos não segmentados salientam-se, a Análise por Injecção em Fluxo (FIA), a Análise por Injecção Sequencial (SIA) e a Análise por Injecção com paragem de fluxo^[73].

3.5.1.2.1. Métodos de fluxo contínuo segmentado

Nos métodos de fluxo segmentado, as amostras são aspiradas sequencialmente para um percurso tubular e a sua identidade mantida através da delimitação dos volumes amostrados por bolhas de ar

colocados a jusante e a montante, respectivamente. Para minimizar contaminação entre amostras são intercaladas soluções de lavagem entre amostras. A elevada segmentação do escoamento levanta problemas de compressibilidade que, inviabilizam a temporização exacta do escoamento de cada amostra até ao detector. Este aspecto inviabiliza igualmente a realização de medidas reprodutíveis na ausência de equilíbrio físico-químico, o que limita o ritmo de amostragem dos sistemas^[71]. Este tipo de métodos concretizou-se no “Auto Analyser” comercializado pela Technicon[®]^[70].

3.5.1.2.2. Métodos de fluxo contínuo não segmentado

De acordo com Ivaska *et al.*^[73] podem-se identificar três gerações de metodologias de injeção em fluxo de acordo com a constância e direcção de escoamento durante cada determinação:

- a) injeção em fluxo contínuo, na qual as amostras são injectadas num escoamento unidireccional e contínuo de transportador;
- b) injeção com interrupção de fluxo, em que a corrente unidireccional de transportador é mantida até que uma secção adequada da zona de amostra dispersa se posicione no campo de detecção para medição da velocidade de reacção;
- c) injeção sequencial, na qual as zonas da amostra e do reagente são posicionadas numa conduta tubular e misturadas por acção do fluxo reverso da corrente transportadora, sendo, então, enviadas para o detector^[73].



Contudo, os métodos em fluxo contínuo são uma área em plena expansão pelo que é frequente encontrar abordagens diferentes, nomeadamente a multicomutação^[74] e a Análise por Injecção em Fluxo Contínuo Monossegmentado (MCFA)^[75].

3.5.1.3. MÉTODOS ROBOTIZADOS

Os métodos robotizados baseiam-se na utilização de robôs miniaturizados e controlados por microprocessadores que simulam a acção de um operador humano na aplicação de um método analítico. Estes robôs são manipuladores constituídos por braços flexíveis e articulados com várias configurações geométricas possíveis. Os métodos robotizados constituem uma alternativa aos métodos discretos em operações que põem em risco a saúde humana como a utilização de substâncias radioactivas^[70].

3.5.2. Princípios de FIA

Dado que o conceito SIA, por um lado nasceu do desenvolvimento dos sistemas FIA e por outro se rege pelos mesmos princípios fundamentais, é de todo conveniente fazer-lhes referência.

A análise por injecção em fluxo, inicialmente proposta por Ruzicka e Hansen^[76], baseia-se na injecção de uma amostra líquida numa corrente transportadora contínua, em movimento e não segmentada de um líquido apropriado. A amostra injectada forma uma zona, que é então transportada em direcção ao detector que monitoriza de uma forma continuada uma propriedade física relacionada com a espécie a medir^[71]. Os sistemas FIA caracterizam-se pela sua simplicidade, pelo facto de o equipamento necessário não ser dispendioso, pela facilidade

operativa e pela capacidade de obter resultados rápidos, exactos e precisos. O conceito FIA pode ser rapidamente adaptado a qualquer situação analítica de modo eficiente. Por outro lado, o seu modo operativo pode ser directamente modificado pelo operador com vista à optimização técnica do sistema e controlo das variáveis químicas^[70]. Estes atributos vantajosos são, em grande parte, responsáveis pelo enorme desenvolvimento que estes procedimentos atingiram^[77], estando já descritos mais de 8.000 artigos da especialidade^[78].

Básica e essencialmente, poder-se-á afirmar que o conceito FIA se rege por três princípios fundamentais^[70-71]:

- a) injeção directa;
- b) dispersão controlada da zona de amostra;
- c) tempo de operação reprodutível, desde o ponto de injeção até à detecção.

3.5.2.1. A DISPERSÃO PARCIAL, COMO UM DOS PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DE FIA

Nas condições de caudal constante e reprodutível habitualmente envolvidas nos sistemas FIA, a progressiva mistura da amostra intercalada no transportador segue um padrão definido e reprodutível no tempo^[70]. Deste modo, associada à intercalação da amostra surge um gradiente de concentração para os diversos constituintes da amostra, na corrente de transportador, cujo perfil depende do tempo. A dispersão pode ser definida como a variação do perfil de concentração de uma

espécie na zona da amostra no momento de inserção e em determinado ponto do sistema sem interromper o fluxo^[70].

Para a dispersão, contribuem o transporte por convecção e a difusão molecular. Esta última é fundamental, pois atenua os efeitos do primeiro, impedindo assim a diluição mais extensa da zona na corrente de transportador. O perfil de concentração da amostra na zona injectada na corrente de transportador é dependente da contribuição dos vários tipos de transporte no tempo. Imediatamente após a injeção, predomina o transporte por convecção. Após um pequeno intervalo de tempo, a contribuição da difusão molecular torna-se significativa e compete com o transporte por convecção. Se o tempo de transporte for suficientemente longo, a contribuição da difusão pode exceder a do transporte por convecção^[70]. Vários parâmetros físicos podem afectar a dispersão de um sistema FIA. Assim:

- a) A dispersão ou diluição da amostra aumenta com o aumento dos tempos de residência^[70]. Logo, aumentará com a distância percorrida através da tubagem^[71] e, em princípio, aumenta com a diminuição do caudal de escoamento^[70];
- b) A dispersão é afectada pelo volume de amostra injectado. Quanto maior o volume, menor é a dispersão^[70-71];
- c) A forma e dimensão da tubagem influenciam igualmente a dispersão. Assim, para tubos não enrolados, quanto maior o seu comprimento, maior a dispersão. O mesmo ocorre relativamente ao seu diâmetro. No caso de o tubo estar enrolado em forma de hélice, existe uma tendência para a diminuição relativa da diluição ou dispersão da amostra, factor de extrema importância em FIA^[70-71].

Quanto mais enrolado estiver o tubo, menor será a dispersão^[71]. Novamente, quanto menor for o diâmetro do tubo, menor a dispersão^[70];

- d) A inclusão de uma câmara de mistura no sistema de fluxo contínuo gera maior dispersão do que a originada num sistema correspondente sem câmara de mistura^[71].

Contudo, não se deve avaliar a dispersão apenas como um fenómeno físico. Vários factores de que dependem as reacções químicas podem afectar a dispersão. Assim é necessário ter em conta a contribuição da reacção química para o fenómeno da dispersão.

O sinal em FIA (em forma de pico) é o resultado de dois processos cinéticos que ocorrem simultaneamente: o processo físico de dispersão da zona e os processos químicos resultantes das reacções entre as espécies presentes na amostra e no transportador ou no leito do sistema^[71]. O sinal obtido é dependente do comprimento do reactor e da velocidade de escoamento^[70].

3.5.3. Montagens FIA

Uma montagem FIA comum compreende, habitualmente, as seguintes unidades: unidade de propulsão, sistema de injeção, reactor e sistema de detecção (figura 3.5.3.1). Apresentam-se, seguidamente, algumas das características de cada uma destas unidades:

- a) Unidade de propulsão. A unidade propulsora assegura o escoamento, idealmente a caudal constante, de uma ou várias soluções, contendo um reagente dissolvido, ou actuando meramente

como transportador. Esta unidade pode ser uma bomba peristáltica, um sistema gasoso de pressão ou a gravidade^[70];

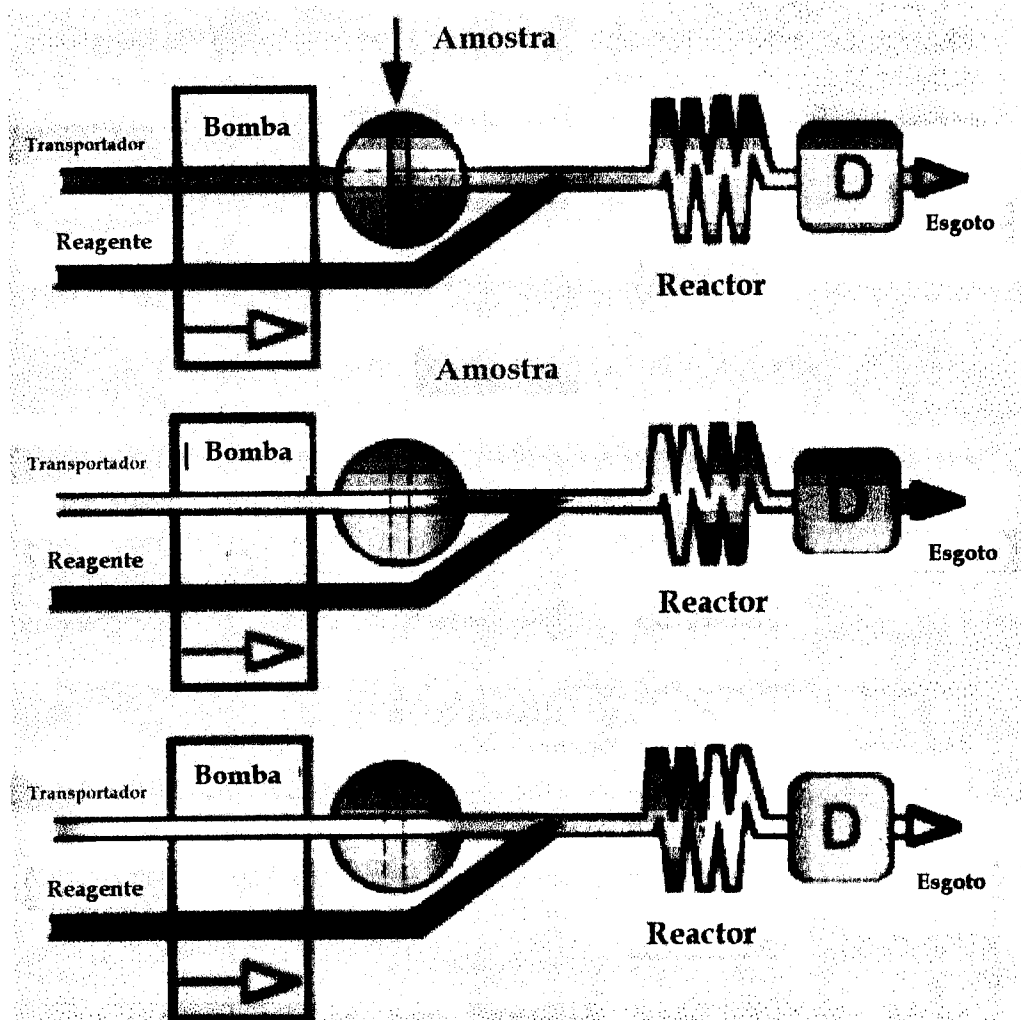


Figura 3.5.3.1: Esquema de uma montagem FIA comum. O reagente é adicionado continuamente à corrente de transportador (topo), o que permite a penetração da zona da amostra (centro). O produto da reação resultante forma um gradiente de concentração correspondente à concentração do elemento a determinar através de todo o comprimento da zona de amostra. Adaptada de Alitea Instruments^[78].
Legenda: D - Detector.

- b) Sistema de injeção. O sistema de injeção deverá permitir a inserção (geralmente através de uma válvula rotativa) reprodutível de um volume de amostra no fluxo, sem o interromper^[70];

- c) Reactor. O reactor é constituído por tubagem e dispositivos especiais, através dos quais se processa o fluxo, e pode ocorrer a reacção. A tubagem pode estar enrolada ou não^[70];
- d) Sistema de detecção. É constituído por uma célula de fluxo colocada num detector, que pode ser, nomeadamente, um eléctrodo selectivo, um espectrofotómetro ou um fluorímetro. É registada, continuamente, uma propriedade física cuja grandeza é relacionável com a concentração da espécie a determinar^[70].

3.5.4. O conceito SIA

A Análise por Injecção Sequencial é uma metodologia de fluxo contínuo, tendo surgido como uma variante de FIA em 1992^[79]. Em SIA é utilizada uma válvula selectora, ao invés da unidade de injecção de amostra (em FIA), através da qual, volumes precisamente medidos de solução transportadora, amostra e reagente são aspirados para uma conduta tubular de armazenagem (*holding coil*) por acção de uma bomba capaz de efectuar movimentos precisamente controlados de rotação bidireccional. Após a primeira etapa de sequenciamento das zonas, no decorrer da qual as zonas de reagente e de amostra são enviadas para o *holding coil*, a válvula é trocada para a posição do detector. Seguidamente, o fluxo é revertido, de forma a que as zonas sejam propulsionadas, através da válvula e do reactor, até ao detector. No decorrer deste movimento, é criado um gradiente de concentrações, no qual as zonas de amostra e de reagente se dispersam mutuamente^[73,80]. Na figura 3.5.4.1 apresenta-se o esquema duma montagem SIA trivial.

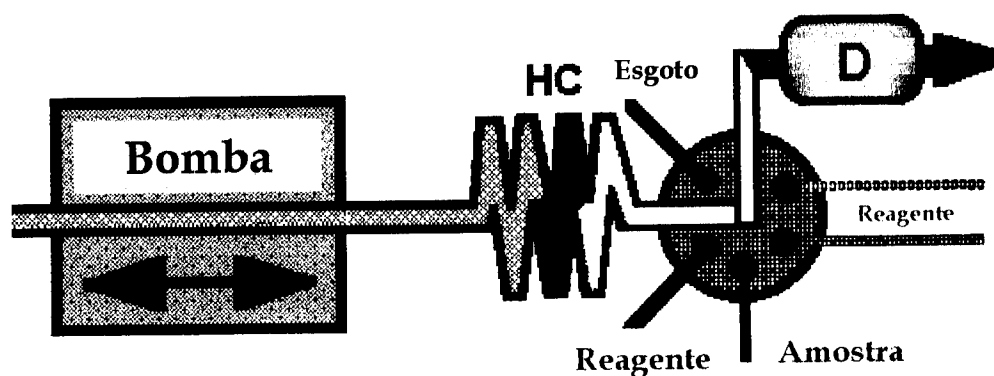


Figura 3.5.4.1: Esquema de uma montagem SIA comum. São aspirados sequencialmente pequenos volumes de amostra e de reagente para o *holding coil*, sendo posteriormente o fluxo revertido e enviado para o detector. Adaptada de Alitea Instruments^[78]. Legenda: D- Detector; HC - *Holding coil*.

Tal como ocorre em FIA, em SIA a injeção da amostra, a dispersão controlada e a temporização reprodutível são os princípios fundamentais característicos desta técnica^[73,80], daí que muito do que foi dito para FIA se aplique em SIA. Contudo, em SIA os mecanismos são muito mais simples já que apenas é utilizado um canal onde se move o líquido^[80]. Apesar disso, os gradientes de concentração formados pela penetração das zonas em fluxo reverso é mais complexo.

O desempenho dos sistemas SIA depende, de uma forma crítica, da aspiração reprodutível de pequenos volumes de líquido, pelo que a unidade de aspiração é particularmente importante em SIA. A este respeito, Ivaska *et al.*^[73] efectuaram um estudo comparativo entre as unidades habitualmente utilizadas: uma bomba de pistão e uma bomba peristáltica. Chegaram à conclusão de que a utilização de uma bomba peristáltica preenche todos os requisitos de SIA, à semelhança do que ocorre com as bombas de pistão, mas com vantagens: o ciclo de aspiração é mais curto, o sistema torna-se mais fácil de configurar,

iniciar e operar, bem como as bombas são de fácil utilização e encontram-se largamente disponíveis^[73].

Em SIA, a frequência de amostragem é habitualmente menor quando comparada com a frequência de amostragem do correspondente método FIA. Tal deve-se à utilização de apenas uma bomba para efectuar a injeção de amostra e de reagente e o seu envio para o sistema de detecção. Contudo, o consumo de reagentes é significativamente menor. Um dos principais atributos dos sistemas SIA é que, uma vez montado, e em contraste com um sistema FIA, não necessita de ser fisicamente reconfigurado, mesmo se parâmetros essenciais como a velocidade de fluxo, o volume de amostra e reagentes e os tempos de reacção tiverem que ser alterados. Todas estas modificações podem ser operadas através do teclado de computador^[73,80]. Mais, os sistemas SIA são extremamente versáteis^[73], na medida em que podem ser adicionados reactores e detectores à válvula selectora, podendo assim ser efectuadas várias determinações bem como várias reacções, sendo o número de portas da válvula o único limite^[80]. Actualmente, já são comercializadas válvulas de 26 portas^[81].

A técnica de SIA, ainda que recente, é, potencialmente, capaz de permitir a realização de todos os ensaios efectuados por FIA. O equipamento é relativamente pouco dispendioso, facilmente automatizado e fácil de adaptar a um método químico particular^[82].

3.5.5. Procedimentos automáticos de determinação de mercúrio

A determinação de mercúrio realizada por diversos sistemas automáticos foi anteriormente proposta por vários autores. O popular

procedimento de determinação baseado na EAA-VF foi modificado por forma a permitir a realização da determinação de mercúrio de uma forma contínua^[83-84]. Este método baseia-se num sistema FIA convencional, diferindo deste, apenas no facto de a inserção da amostra ter sido efectuada continuamente. Neste método modificado realizou-se uma digestão, redução e extracção das amostras. O limite de detecção obtido foi de $0,15\mu\text{g/L}$, com um caudal de amostragem de $180\mu\text{l/min}$. Igualmente conhecida, é a determinação baseada num sistema FIA convencional com detecção EFA-VF^[85], tendo-se obtido um limite de detecção $0,008\text{ng}$ e uma frequência de amostragem de 35 amostras por hora. A monitorização fluorimétrica do amónio libertado na reacção de conversão da ureia, catalisada pela urease e inibida pelo mercúrio, está na base de um procedimento FIA^[86], tendo-se obtido um limite de detecção de $2\mu\text{g/L}$.

Os métodos colorimétricos foram vantajosamente aplicados em montagens FIA, nomeadamente determinados procedimentos catalíticos com paragem do escoamento^[87-88], tendo-se obtido^[87] no melhor dos casos um limite de detecção de $0,025\mu\text{g/L}$ e frequência de 60 amostras por hora. Nestes métodos o escoamento era interrompido pelo período necessário à ocorrência da reacção. Esta é uma das características dos métodos com interrupção do escoamento, que, adicionalmente, permitem a obtenção de sensibilidades mais elevadas^[89].

A utilização de fluxo revertido foi também proposta na determinação de mercúrio^[61]. Neste procedimento, foi efectuada a sua determinação através de um sistema FIA com geração de vapor frio e detecção por EAA. Obteve-se uma frequência de amostragem de 120 amostras por hora e um limite de detecção de $0,050\mu\text{g/L}$.

Igualmente conhecida, é a determinação de mercúrio baseada em sistemas SIA, com as vantagens e inconvenientes anteriormente referidos. Foi recentemente proposto um procedimento SIA com detecção por EAA-VF. O limite de detecção obtido foi de $0,34\mu\text{g/L}$ com um frequência de 30 amostras por hora^[90].

3.6. REFERÊNCIAS

- [1] W. Slavin, *Analytical Chemistry*, 58 (40), 589A (1986).
- [2] J. Carron e H. Agemian, *Analytica Chimica Acta*, 92, 61 (1977).
- [3] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), <http://www.atsdr1.atsdr.cdc.gov:8080/ToxProfiles/phs8916.html>, Public Health Statement - Mercury (1990).
- [4] E.D. Stein, Y. Cohen e A.M. Winer, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26 (1), 1 (1996).
- [5] M.E. Pereira e A.C. Duarte, *Indústria da Água*, 24, 47 (1997).
- [6] S. Chilov, *Talanta*, 22, 205 (1975).
- [7] T.Y. Toribara, C.P. Shields e L. Koval, *Talanta*, 17, 1025 (1970).
- [8] S. Shimomura, *Analytical Sciences*, 5, 633 (1989).
- [9] H. Morita, T. Mitsuhashi, H. Sakurai e S. Shimomura, *Analytica Chimica Acta*, 153, 351 (1983).
- [10] M.H. Bothner e D.E. Robertson, *Analytical Chemistry*, 47 (3), 592 (1975).
- [11] H. Morita, H. Tanaka e S. Shimomura, *Spectrochimica Acta*, 50B (1), 69 (1995).
- [12] R.M. Rosain e C.M. Wai, *Analytica Chimica Acta*, 65, 279 (1973).
- [13] C. Feldman, *Analytical Chemistry*, 46 (1), 99 (1974).
- [14] J.M. Lo e C.M. Wai, *Analytical Chemistry*, 47 (11), 1869 (1975).
- [15] D.R. Christmann e J.D. Ingle, *Analytica Chimica Acta*, 86, 53 (1976).
- [16] R.V. Coyne e J.A. Collins, *Analytical Chemistry*, 44 (6), 1093 (1972).

- [17] H.V. Weiss e H. Shipman, *Analytica Chimica Acta*, 81, 211 (1976).
- [18] M.D. Mateo, R. Forteza, V. Cerdá, G. Lacort, M. Roura e M. Baucells, *Química Analítica (Barcelona)*, 7 (2), 117 (1988).
- [19] M. Ambe e K. Suwabe, *Analytica Chimica Acta*, 92, 55 (1977).
- [20] W.D. Burrows e P.A. Krenkel, *Analytical Chemistry*, 46 (11), 1613 (1974).
- [21] C. Vandecasteele e C.B. Block, *Modern Methods for Trace Element Determination*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1993, p. 10-30, 175-318.
- [22] Analytical Methods Committee, *Analyst*, 90 (1074), 515 (1965).
- [23] A.M. Ure, *Analytica Chimica Acta*, 76, 1 (1975).
- [24] E. Jackwerth, A. Mizuike, Y.A. Zolotov, H. Berndt, R. Höhn e N.M. Kuzmin, *Pure & Applied Chemistry*, 51, 1195 (1979).
- [25] W.L. Clevenger, B.W. Smith e J.D. Winefordner, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27 (1), 1 (1997).
- [26] G.F. Kirkbright, *Analyst*, 96, 609 (1971).
- [27] D.C. Manning, *Atomic Absorption Newsletter*, 9 (5), 97 (1970).
- [28] E.B. Sandell, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, 2nd ed., Interscience Publishers, New York, USA, 1950, p. 441-452.
- [29] Z. Marczenko, *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*, Ellis Horwood, Chichester, England, 1986, p. 371-379.
- [30] American Public Health Association, American Water Works Association e Water Environment Federation, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., American Public Health Association, Washington, USA, 1995, p. (3-78)-(3-90).
- [31] M.N. Abbas, N.B. El-Assy e SH. Abdel-Moniem, *Analytical Letters*, 22 (11&12), 2575 (1989).
- [32] H.B. Singh, B. Kumar, R.L. Sharma e M. Katyal, *Analyst*, 114, 853 (1989).

- [33] K. Ueno, K. Shiraishi, T. Togo, T. Yano, I. Yoshida e H. Kobayashi, *Analytica Chimica Acta*, 105, 289 (1979).
- [34] F. Théraulaz e O.P. Thomas, *Mikrochimica Acta*, 113, 53 (1994).
- [35] A.K. De e B.K. Pal, *Mikrochimica Acta (Wien)*, II, 201 (1979).
- [36] P. Padmaja, N. Balasubramanian e T.V. Ramakrishna, *Talanta*, 41 (2), 255 (1994).
- [37] M. Kamburova, *Talanta*, 40 (5), 719 (1993).
- [38] T. Pérez-Ruiz, J.A. Ortuño e M.C. Torrecillas, *Analytica Chimica Acta*, 165, 275 (1984).
- [39] J.R. Mudakavi, *Analyst*, 109, 1577 (1984).
- [40] Y. Anjaneyulu, P.C. Mouli, M.R.P. Reddy e K.P.C. Sekhar, *Analyst*, 110, 391 (1985).
- [41] B. Raman e V.M. Shinde, *Analyst*, 115, 93 (1990).
- [42] I. Mori, Y. Fujita, K. Fujita, Y. Nakahashi, K. Kato e T. Nakamura, *Analytical Letters*, 21 (12), 2359 (1988).
- [43] R. Saran e T.S.B. Baul, *Talanta*, 41 (9), 1537 (1994).
- [44] W. Fusheng, J. Wanquan, T. Enjiang, Z. Yurui e L. Jing, *Analytical Letters*, 23 (7), 1181 (1990).
- [45] W. Jiang, Y. Zhu, G. Jin e G. Wu, *Analytical Letters*, 29 (12), 2221 (1996).
- [46] W. Fu-sheng, Z. Yu-rui e Y. Fang, *Analytical Letters*, 13 (A17), 1533 (1980).
- [47] C. Shiti e L. Xu, *Talanta*, 39 (10), 1395 (1992).
- [48] E. Beinrohr, K. Blazseková e J. Garaj, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 50, 1661 (1985).
- [49] M.T.M. Zaki, R.M. Abdel-Rahman e A.Y. El-Sayed, *Analytica Chimica Acta*, 307, 127 (1995).
- [50] M. Ajmal, A. Mohammad, N. Fatima e A.H. Khan, *Microchemical Journal*, 39, 361 (1989).
- [51] A.M. Bond e G.G. Wallace, *Analytical Chemistry*, 56, 2085 (1984).

- [52] W. Langseth, *Analytica Chimica Acta*, 185, 249 (1986).
- [53] K.M. Rao, T.S. Reddy e S.B. Rao, *Analyst*, 113, 983 (1988).
- [54] A. Ramesh, *Analyst*, 118, 945 (1993).
- [55] T.R. Saro e D.P. Bendito, *Analytica Chimica Acta*, 182, 163 (1986).
- [56] T.N. Shekhovtsova e S.V. Chernetskaya, *Analytical Letters* 27 (15), 2883 (1994).
- [57] W.R. Hatch e W.L. Ott, *Analytical Chemistry*, 40 (14), 2085 (1968).
- [58] M.C. de Vargas e R.A. Romero, *Atomic Spectroscopy*, 10 (5), 160 (1989).
- [59] A.M. Abdallah, M.M. El-Defrawy e A.E.M. Hassan, *Journal of the Indian Chemical Society*, 69, 699 (1992).
- [60] R.L. Lancione e D.M. Drew, *Spectrochimica Acta*, 40B (1/2), 107 (1985).
- [61] J.C. de Andrade e M.I.M.S. Bueno, *Spectrochimica Acta*, 49B (8), 787 (1994).
- [62] J.F. Camuña-Aguilar, R. Pereiro-Garcia, J.E. Sánchez-Uría e A. Sanz-Medel, *Spectrochimica Acta*, 49B (5), 475 (1994).
- [63] H.Z. Wrembel, *Spectrochimica Acta*, 41B (3), 256 (1986).
- [64] B. Holynska, B. Ostachowicz e D. Wegrzynek, *Spectrochimica Acta*, 51B, 769 (1996).
- [65] H.R. Linder, H.D. Seltner e B. Schreiber, *Analytical Chemistry*, 50 (7), 896 (1978).
- [66] J. McMurry, *Organic Chemistry*, 4th ed., Brooks / Cole Publishing Company, Pacific Grove, USA, 1996, p. 425-433.
- [67] C. Haraldsson, S. Westerlund e P. Öhman, *Analytica Chimica Acta*, 221, 77 (1989).
- [68] D. Liu, A. Yin, K. Chen, K. Ge, L. Nie e S. Yao, *Analytical Letters*, 28 (8), 1323 (1995).
- [69] A. Amine, C. Cremisini e G. Palleschi, *Mikrochimica Acta*, 121, 183 (1995).

- [70] M. Valcárcel, M.D.L. de Castro, *Flow Injection Analysis - Principles and Applications*, Ellis Horwood Limited, Chichester, England, 1987, p. 7-127.
- [71] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis 2nd ed.*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1988, p. 1-85.
- [72] V. Cerdá e G. Ramis, *An Introduction to Laboratory Automation*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 1990, p. 1-6.
- [73] A. Ivaska e J. Ruzicka, *Analyst*, 118, 885 (1993).
- [74] B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima e R.A. Lapa, *Analytica Chimica Acta*, 293, 129 (1994).
- [75] A.N. Araújo, J.A.M. Catita, J.L.F.C. Lima e E.A.G. Zagatto, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 360, 100 (1998).
- [76] J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Analytica Chimica Acta*, 78, 145 (1975).
- [77] J. Ruzicka e E.H. Hansen, *Trends in Analytical Chemistry*, 17 (2), 69 (1998).
- [78] Alitea Instruments, Manufacturer of Flow Injection Analysis Systems, <http://www.flowinjection.com/search.html>, Hansens's Comprehensive Flow Injection Bibliography.
- [79] J. Ruzicka e G.D. Marshall, *Analytica Chimica Acta*, 237, 329 (1990).
- [80] J. Ruzicka, *Analytica Chimica Acta*, 261, 3 (1992).
- [81] Global Fia, <http://www.globalfia.com/>.
- [82] G.D. Christian, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 10(10-12), 769 (1993).
- [83] M. Goto, S. Kumagai e D. Ishii, *Analytical Sciences*, 4, 87 (1988).
- [84] M. Goto, T. Shibakawa, T. Arita e D. Ishii, *Analytica Chimica Acta*, 140, 179 (1982).
- [85] H. Morita, T. Kimoto e S. Shimomura, *Analytical Letters*, 16(A15), 1187 (1983).
- [86] D. Narinesingh, R. Mungal e T.T. Ngo, *Analytica Chimica Acta*, 292, 185 (1994).

- [87] X.J. Peng, Q.K. Mao e J.K. Cheng, *Mikrochimica Acta*, 113, 81 (1994).
- [88] J. Wang e R. He, *Analytica Chimica Acta*, 294, 195 (1994).
- [89] G.D. Christian e J. Ruzicka, *Analytica Chimica Acta*, 261, 11 (1992).
- [90] F.M. Bauzá, A.Ch. Thomas, E. Rubí, R. Forteza e V. Cerdà, *Analytica Chimica Acta*, 355, 203 (1997).

II. OBJECTIVOS

É inegável que os procedimentos analíticos baseados no conceito SIA representam uma poderosa ferramenta de análise, sobretudo quando se pretende obter um elevado ritmo de amostragem, com reduzidos custos e consumo de reagentes. Estas características, aliadas à enorme versatilidade dos sistemas SIA tornam esta técnica extremamente atractiva no que concerne ao controlo de qualidade. Por outro lado, os métodos colorimétricos constituem uma determinação de custo reduzido e relativa simplicidade. Mais, a utilização de reagentes com elevada afinidade para mercúrio, concretizada em procedimentos catalíticos, confere sensibilidade ao procedimento, permitindo assim a determinação do elemento, mesmo quando presente em concentrações vestigiais. Adicionalmente, a implementação vantajosa de procedimentos de titulação em fluxo é igualmente conhecida, quer seja em FIA^[1], quer seja em SIA^[2]. Contudo, a determinação de mercúrio em águas com base numa titulação efectuada em sistema SIA, e tanto quanto é conhecido, ainda não tinha sido proposta e constitui o objectivo deste trabalho.

O procedimento proposto baseia-se na monitorização colorimétrica da reacção de oxidação da tiossemicarbazona da 4,4'-dihidroxobenzofenona (TDHB). É sabido que as soluções amoniacais de TDHB são rapidamente oxidadas a um produto amarelado por acção do peróxido de hidrogénio, na presença do catalisador desta reacção, o ião Cu(II). É igualmente conhecido que o ião Hg(II) inibe esta oxidação, na presença de Cu(II). Deste modo, foi anteriormente efectuada a titulação directa de mercúrio com TDHB, na presença de oxidante, solução tampão e catalisador, num processo conhecido como titulação catalítica por inactivação do substrato. No início da titulação, a TDHB adicionada é consumida por complexação com Hg(II). Uma vez completa a complexação, o excesso de titulante inicia a reacção

indicadora, *i.e.*, a reacção de oxidação pelo peróxido de hidrogénio. O período de pseudo-indução das curvas de titulação correspondentes é directamente proporcional à concentração de mercúrio (II) nas amostras^[3-4].

Contudo, e dado que o reagente orgânico TDHB não é comercializado por nenhuma das empresas da especialidade, houve necessidade de efectuar a sua síntese^[5], o que constituiu um objectivo adicional.

REFERÊNCIAS

- [1] R.H. Taylor, C. Winbo, G.D. Christian e J. Ruzicka, *Talanta*, 39, 789 (1992).
- [2] J.F. van Staden e H. du Plessis, *Analytical Communications*, 34, 147 (1997).
- [3] T.R. Saro e D.P. Bendito, *Analytica Chimica Acta*, 182, 163 (1986).
- [4] M. Márquez, M. Silva e D. Perez-Bendito, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 6(3), 307 (1988).
- [5] F. Toribio, J.M.L. Fernández, D.P. Bendito e M. Valcárcel, *Química Analítica (Espanha)*, I(1), 29 (1982).

III. PARTE EXPERIMENTAL

4. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Seguidamente descrevem-se as condições experimentais, sob as quais, decorreu o trabalho efectuado, bem como se enumeram os procedimentos seguidos. Apresentam-se igualmente os critérios de avaliação da metodologia implementada.

4.1. NA SÍNTESE DA TDHB

Nesta secção descrevem-se as condições gerais sob as quais foi efectuada a síntese da TDHB.

4.1.1. Equipamento

Os solventes foram evaporados com auxílio de pressão reduzida, utilizando um evaporador rotativo Büchi.

As pesagens foram efectuadas em balança Mettler AE 163.

As temperaturas de fusão, TF, foram determinadas em microscópio de pontos de fusão Köfler.

Os espectros no infravermelho foram registados num espectrofotómetro ATI Mattson Genesis Series FTIR.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear, RMN, foram efectuados num aparelho Bruker AMX 300, à temperatura ambiente. O

solvente usado para RMN foi o dimetilsulfóxido hexadeuterado, DMSO-d₆, (Uvasol; Merck), com grau de deuteração superior a 99,0%.

Os espectros de massa foram registados num espectrómetro VG Autospec (impacto electrónico) e foram referidos em m/z (% da intensidade relativa dos fragmentos).

4.1.2. Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes utilizados foram produtos *pro analysi* ou “para síntese”, das empresas Merck, Aldrich e Riedel-deHaën.

4.1.3. Síntese da TDHB

Dissolveu-se a 4,4'-di-hidroxibenzofenona (0,5g; 2,33mmol) em etanol (25mL). Seguidamente adicionou-se uma solução de tiosemicarbazida (0,33g; 3,62mmol) em água quente (25mL). A solução foi acidificada (pH 4,5) com HCl concentrado. Aqueceu-se a mistura em condições de refluxo, com agitação magnética, durante 2 horas. Após reacção, o solvente foi parcialmente evaporado. A solução foi neutralizada com NaOH a 5% e extraída com éter dietílico (3x50mL). As fases etéreas foram reunidas, lavadas com água (3x100mL) e desidratadas com sulfato de sódio anidro. Após evaporação do solvente obteve-se um resíduo branco amarelado (680mg), o qual foi purificado por Cromatografia em Coluna, CC, (gel de sílica; éter de petróleo (60-80°C)/éter dietílico, em diferentes proporções; fracções de aproximadamente 10mL). Com a fase móvel éter de petróleo (60-80°C)/éter dietílico (3:7) verificou-se a eluição da 4,4'-di-hidroxibenzofenona que não reagiu. As fracções contendo predominantemente o composto sintetizado, eluídas com a fase móvel

éter de petróleo (60-80°C)/éter dietílico (2:8), foram reunidas e o solvente evaporado. O resíduo obtido foi cristalizado do sistema éter de petróleo (60-80°C)/éter dietílico, obtendo-se cristais brancos da TDHB (179mg; 27%).

A verificação da pureza dos reagentes foi efectuada por análise comparativa dos dados de ponto de fusão e de infravermelho obtidos experimentalmente e os descritos na literatura. Na espectroscopia do IV, utilizaram-se pastilhas de brometo de potássio (para espectroscopia; Merck) contendo aproximadamente 1% de amostra.

Os critérios de pureza adoptados foram a nitidez e o intervalo de temperatura de fusão e a observação de uma única mancha em Cromatografia em Camada Fina, CCF, fazendo variar a composição da fase móvel.

A evolução da reacção de síntese foi acompanhada por CCF, em diferentes eluentes, e por espectroscopia no IV.

O controlo cromatográfico da reacção e das fracções da coluna foi efectuado por CCF nos sistemas:

- a) gel de sílica; *n*-hexano/acetato de etilo (1:1);
- b) gel de sílica; éter de petróleo (60-80°C)/éter dietílico (2:8);
- c) gel de sílica; éter dietílico.

4.1.4. Cromatografia

Na CCF usou-se como fase estacionária gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Merck) com uma espessura de 0,25mm e placas pré-revestidas de gel de sílica

60 F₂₅₄ (Merck) com uma espessura de 0,2mm. Os cromatogramas foram revelados por acção da luz ultravioleta de 254 e 366nm e/ou vapores de iodo.

No processo de purificação por cromatografia em coluna (CC) usou-se como fase estacionária gel de sílica 60 (0,2-0,5mm; Merck).

4.2. NA DETERMINAÇÃO DE MERCÚRIO

Nesta secção descrevem-se reagentes, material e equipamento utilizado na determinação de mercúrio.

4.2.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram adquiridos às empresas: Merck, Sigma, Aldrich e Riedel-de Haën, e são de qualidade *pro analysi* ou "para análise", excepto referência em contrário.

Todas as soluções diluídas foram preparadas imediatamente antes de ser utilizadas.

Utilizou-se água bidesionizada com uma condutividade inferior a 0,1 μ S/cm (Lab Ion).

As soluções padrão de mercúrio foram preparadas por diluição de soluções comerciais Spectrosol[®], (BDH Chemicals Ltd., Poole, England), com concentração de 1000mg/L de mercúrio.

A TDHB foi armazenada protegida da luz solar, para impedir a sua fotodecomposição. As soluções *stock* de TDHB (0,1% m/v) foram preparadas quinzenalmente por pesagem da TDHB e dissolução em etanol absoluto. As soluções de trabalho de TDHB foram preparadas por diluição de volumes apropriados da solução *stock* em água.

A solução padrão de Cu(II) $7,24 \times 10^{-4}$ mol/L foi preparada por dissolução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água.

As soluções de peróxido de hidrogénio 0,15% (v/v) foram preparadas por diluição em água a partir de uma solução de H_2O_2 a 30% (v/v). Estas soluções foram preparadas diariamente.

A solução tampão (pH 10,2) de amónia-cloreto de amónio foi preparada por mistura de soluções 3,0mol/L NH_3 e 0,90mol/L NH_4Cl . Estas foram obtidas por diluição de uma solução de amónia a 17% e por dissolução de cloreto de amónio em água, respectivamente.

A solução transportadora foi preparada por medição de 468,8 μL de solução de Cu(II), 312,5 μL de solução de H_2O_2 e 625,0 μL de solução tampão. Após adicionados e agitados estes volumes, adicionava-se o Hg e diluía-se até 100mL com água desionizada.

A medição de volumes inferiores a 5mL foi efectuada com micropipetas de volume regulável da marca Gilson, modelos P20, P100, P1000 e P5000, com pontas de plástico descartáveis Gilson.

Todo o material utilizado foi de vidro ou de polietileno, tendo sido previamente imerso em solução diluída de ácido nítrico (HNO_3 15%),

sendo posteriormente lavado com água desionizada e seco. A qualidade de todo o material de vidro graduado utilizado é de Classe A.

4.2.2. Equipamento

As determinações de mercúrio por EAA-VF foram efectuadas em espectrofotómetro Perkin Elmer 3100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). A geração de vapor frio foi realizada num Kit de Geração de Vapor Frio MHS-10 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

A realização dos espectros de absorção foi efectuada em espectrofotómetro de ultravioleta - visível de duplo feixe Hitachi U2000 (Tokyo, Japan).

As pesagens foram efectuadas em balança analítica Mettler AE 163, ou em balança semi-analítica Kern 572 (Kern & Sohn GmbH, D-72458, Albstadt, Germany).

As medições de pH foram efectuadas em decimilivoltímetro pH-Meter E520 (Metrohm Herisau, Switzerland).

4.2.3. Construção da montagem SIA

A montagem SIA (figura 4.2.3.1) foi construída com tubagem de politetrafluoretileno, PTFE, com 0,8mm de diâmetro interno (Omnifit, Cambridge, UK). Foi construído um tubo de reacção de cerca de 2m (conferindo configuração helicoidal ao tubo de PTFE). As ligações entre os diferentes tubos do sistema foi realizada por intermédio de ligadores e terminais Gilson.

A válvula selectora multiposição utilizada foi o modelo Cheminert™ C25-3118E (Valco Europe, Schenk, Switzerland). A impulsão dos líquidos nas tubagens foi assegurado por uma bomba peristáltica Minipuls 3 (Gilson, Villiers-le-Bel, France) de quatro canais. O tubo de impulsão era de policloreto de vinilo com 1,14mm de diâmetro interno (Gilson, Villiers-le-Bel, France). A adição da TDHB à corrente transportadora foi efectuada por intermédio de uma válvula comutadora de três vias, actuada por solenóide, NResearch® 161 T031 (Stow, MA, USA). A detecção era efectuada num espectrofotómetro Jenway 6300 (Jenway Ltd., Essex, England). A célula de fluxo tinha um percurso óptico de 10,00mm e 8µl de volume óptico (Hellma® 178.713QS - Mullheim/Baden, Germany). A unidade de detecção estava conectada a um registador modelo 111 BD (Kipp & Zonen, Delft, The Netherlands).

O funcionamento da válvula selectora, da válvula comutadora e da bomba peristáltica foi controlado por micro-computador (PC Compatível), sendo o envio de instruções efectuado através de uma placa PC - Lab Card PCL-818LS (Advantech®, Taiwan). A bomba peristáltica e a válvula comutadora eram accionadas através dum circuito que funcionava como interruptor digital. O programa de controlo do sistema SIA (anexo 1) foi escrito em Microsoft QBASIC® 4.5 (Microsoft Corporation).

Por outras duas portas da válvula selectora aspiravam-se água desionizada e solução de lavagem de HNO₃ a 15%, por forma a promover a limpeza do tubo da reacção e da célula de fluxo.

Foi desenvolvida uma unidade que permitisse efectuar a geração de vapor frio de mercúrio. Contudo, o desempenho desta unidade não foi

avaliado, e ocorrerá numa segunda fase. Por este motivo, e para avaliar o desempenho da montagem desenvolvida sem a geração de vapor frio, optou-se por adicionar a amostra à solução contendo peróxido de hidrogénio, Cu(II) e tampão.

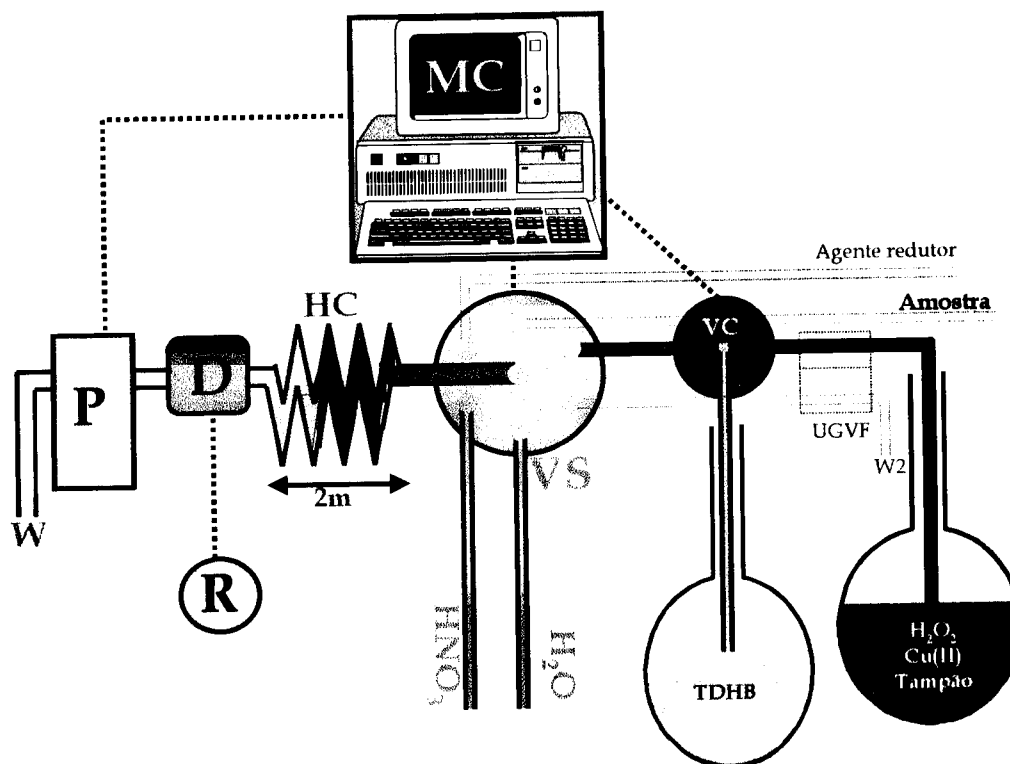


Figura 4.2.3.1: Esquema da montagem SIA desenvolvida. A tracejado cheio são representadas as ligações relativas ao envio de dados. A tracejado mais fino são representados os componentes relativos à geração de vapor frio. Legenda: P - Bomba peristáltica; D - Espectrofotómetro; R - Registador; MC - Computador de controlo do sistema. A este computador foi adicionada a placa de envio de dados; HC - Tubo de reacção; VS - Válvula selectora multiposição; VC - Válvula comutadora solenóide; UGVF - Unidade geradora de vapor frio; W e W2 - Esgoto e esgoto auxiliar.

Para o sistema desenvolvido a relação entre a velocidade de rotação da bomba peristáltica (aspirar; x ; rpm) e o caudal de aspiração (y ; ml/min) era a seguinte:

$$Y = 0,0985x + 0,0741 \quad (R^2 = 0,9987)$$

4.3. PROCEDIMENTOS GERAIS DE AVALIAÇÃO DA MONTAGEM DESENVOLVIDA

Seguidamente, descrevem-se os procedimentos que permitiram avaliar a qualidade dos resultados fornecidos pela metodologia proposta.

4.3.1. Modo de medida dos sinais

Os sinais analíticos foram medidos por determinação da intensidade do sinal analítico na curva de registo da absorvência/tempo. Esta medição era efectuada no ponto da curva correspondente a 490s após o início da determinação. Os valores de altura foram posteriormente convertidos em absorvência, sabendo que 500mV na escala de registo correspondiam a 0,500 unidades de absorvência.

4.3.2. Modo do traçado das curvas de calibração

As curvas de calibração foram estabelecidas por regressão linear do sinal dos padrões em função da concentração de mercúrio nos mesmos, pelo método dos mínimos quadrados. Para o efeito recorreu-se ao programa Microsoft Excel[®] 8.0, que devolvia a equação da recta obtida e, adicionalmente, os valores do coeficiente de correlação.

4.3.3. Cálculo do limite de detecção

O limite de detecção foi calculado de acordo com a expressão^[1-4]:

$$LD = \frac{3 \cdot \delta}{m},$$

em que δ é o desvio padrão dos valores de 20 medidas do branco e m o declive da curva de calibração.

4.3.4. Cálculo da reprodutibilidade do método

A precisão do procedimento foi avaliada, aferindo a reprodutibilidade dos resultados obtidos. Para tal, efectuou-se o cálculo do coeficiente de variação dos valores obtidos para 10 repetições da medida de 2 amostras, uma contendo concentrações de mercúrio na zona superior de resposta linear, e a outra na zona inferior de resposta linear.

4.3.5. Comparação dos resultados obtidos com a EAA-VF

Como forma de avaliar a exactidão do procedimento proposto, efectuaram-se medidas, em triplicado, de um conjunto de 10 amostras de águas pela metodologia proposta e pela EAA-VF. Para cada par de valores obtidos calculou-se o erro relativo de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Erro relativo (\%)} = \frac{(R_{\text{SIA}} - R_{\text{EAA-VF}})}{R_{\text{EAA-VF}}} \times 100,$$

em que R_{SIA} e $R_{\text{EAA-VF}}$ representam o valor de concentração obtido pela metodologia proposta e por EAA-VF, respectivamente.

Com os pares de valores obtidos, traçou-se uma curva em Microsoft Excel[®] 8.0, programa que calculou a equação da curva obtida, bem como o coeficiente de correlação. Este programa permitia efectuar,

igualmente, o cálculo do valor t de Student, para o teste emparelhado, com um intervalo de confiança de 95%.

4.4. REFERÊNCIAS

- [1] M.S. Epstein, Comparison of Detection Limits in Atomic Spectroscopic Methods of Analysis, in L.A. Currie (Ed.), *Detection in Analytical Chemistry*, American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1988, p. 111-112.
- [2] C. Vandecasteele e C.B. Block, *Modern Methods for Trace Element Determination*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1993, p. 68.
- [3] A.G. Howard e P.J. Statham, *Inorganic Trace Analysis: Philosophy and Practice*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1993, p.158.
- [4] Decisão da Comissão 90/515/CEE, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, N° L 286, 33 (1990).

5. RESULTADOS E SUA DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no decurso deste trabalho, bem como se realiza uma discussão dos mesmos.

5.1. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA TDHB

A tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxibenzofenona é um composto orgânico no qual está presente a função imina ($R_2C=NR$). As iminas, ou bases de Schiff, são geralmente obtidas através de uma reacção de condensação, catalisada por ácido, de aminas primárias a aldeídos ou cetonas. No processo de obtenção das iminas ocorre uma adição nucleofílica da amina primária ao grupo carbonilo (figura 5.1.1), com formação de um intermediário tetraédrico, o qual posteriormente origina uma carbinolamina. A protonação do oxigénio da carbinolamina favorece o abandono do grupo hidroxilo e a formação do ião *iminium*. A formação da imina ocorre após transferência do protão do ião referido e conseqüente regeneração do catalisador. A reacção de obtenção de iminas é reversível, sendo a sua velocidade dependente do pH do meio reaccional. Estudos efectuados permitiram verificar que um pH ligeiramente ácido (pH 4 a 5) favorecia a reacção^[1-2].

A síntese da TDHB foi efectuada a partir da 4,4'-di-hidroxibenzofenona e da tiossemicarbazida, de acordo com a técnica anteriormente descrita por Toribio *et al.*^[3] (figura 5.1.2). O procedimento descrito para a caracterização e purificação da TDHB foi, no entanto, modificado [*ver secção 4.1.3.*]. A purificação foi efectuada por cromatografia em coluna e cristalização. A caracterização do composto

foi estabelecida através da análise do produto de síntese, após purificação, por espectrofotometria de IV, por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e por Espectrometria de Massa.

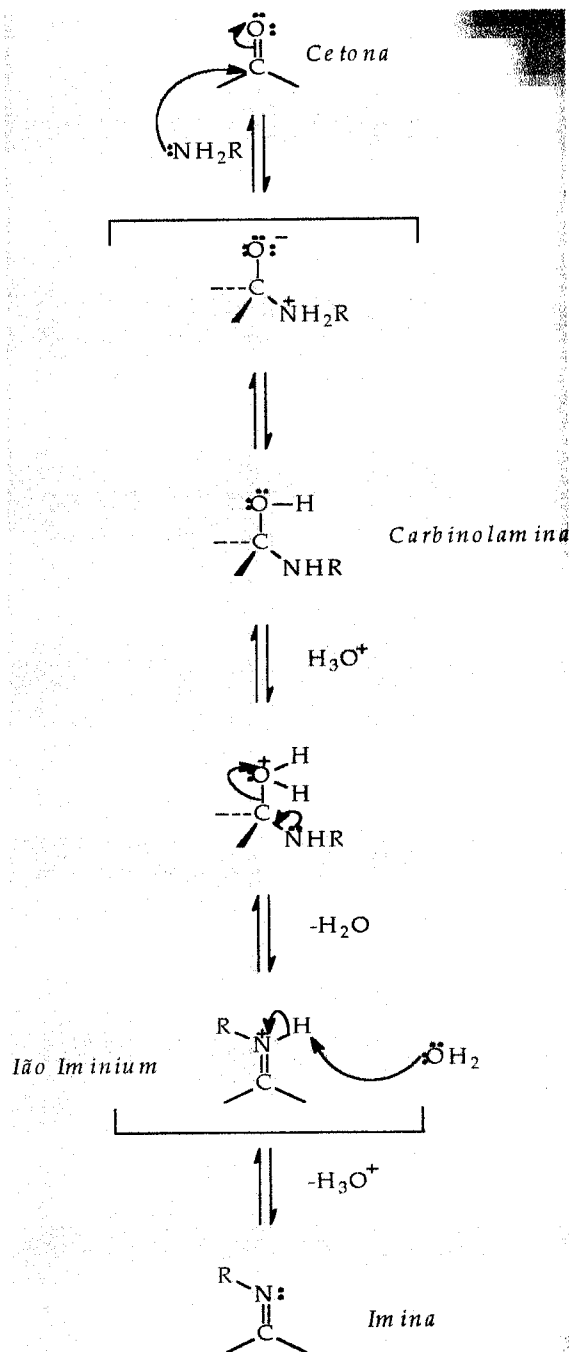


Figura 5.1.1: Mecanismo proposto para a formação de iminas, por reacção de uma cetona com uma amina primária. Adaptada de McMurray^[1].

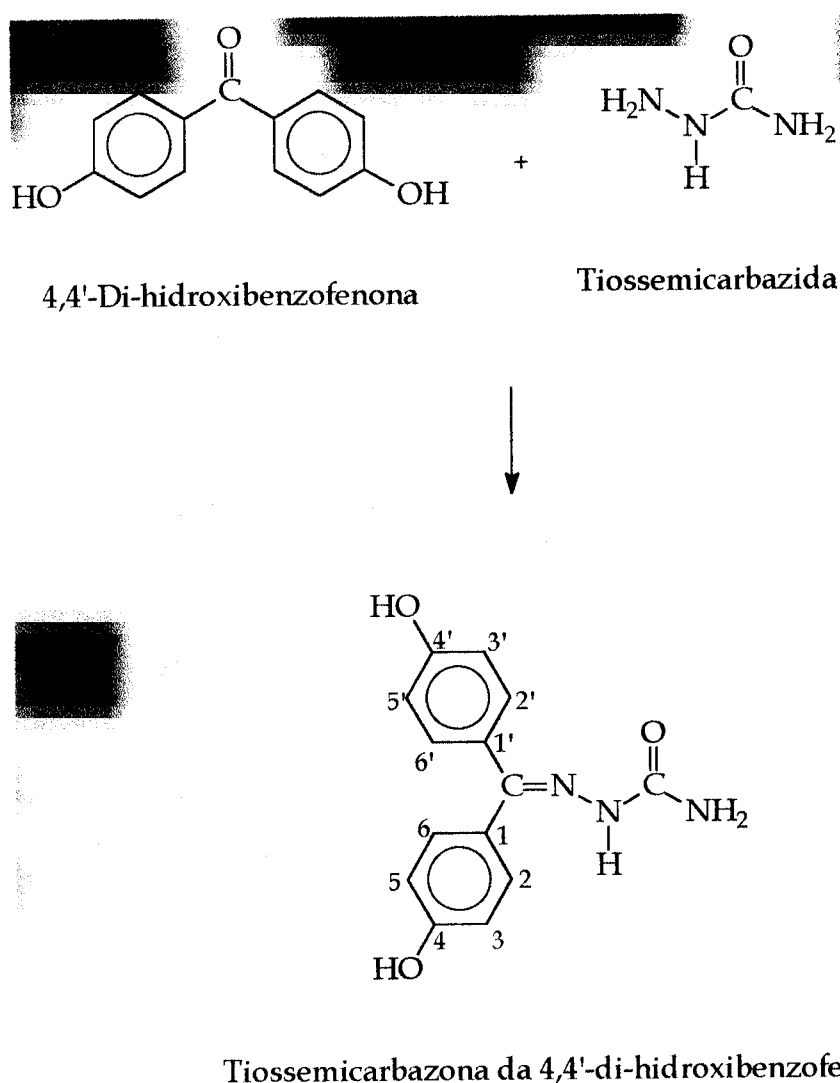


Figura 5.1.2: Esquema da síntese da tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona.

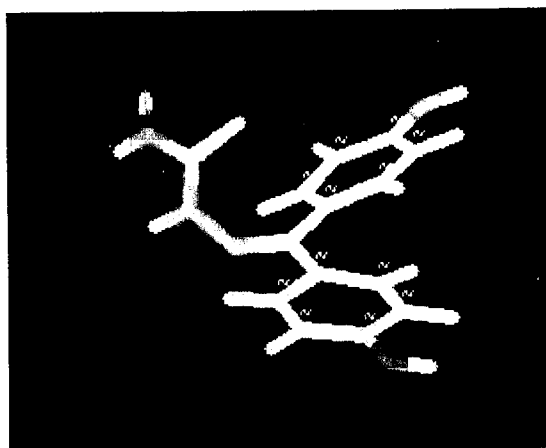


Figura 5.1.3: Estrutura modelizada (PC Model) da tiossemicarbazona da 4,4'-di-hidroxobenzofenona.

A análise dos resultados obtidos (tabela 5.1.1) permitiu confirmar a síntese da TDHB e estabelecer a sua estrutura tridimensional (figura 5.1.3).

Tabela 5.1.1: Resultados referentes ao ponto de fusão, espectrofotometria de IV, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C e de Espectrometria de Massa obtidos na análise da TDHB sintetizada, após a sua purificação. Legenda: PF - Ponto de fusão; Lit. - Literatura; IV-TF - Infravermelho com transformada de Fourier; ν - número de onda, em cm^{-1} ; RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear protónica; δ - deslocamento químico, em ppm; *sl* - singuleto largo; *d* - duplete; J - constante de acoplamento, em Hertz; Ar- - Grupo aromático; RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze; EM-IE - Espectroscopia de Massa por Impacto Electrónico; M^+ - Ião molecular.

PF: 208-212 °C [Lit. ^[3] , 222 °C, H ₂ O]
IV-TF $\nu_{\text{máx.}}$: 3416-3168 (OH, NH ₂ , NH); 1596 (C=N, NH ₂); 1484; 1432; 1320; 1265; 1216; 1159 (C=S); 1088; 836.
RMN ^1H δ : 9,94 (2H; <i>sl</i> ; OH); 8,48 (1H; <i>sl</i> ; NH ₂); 8,30 (1H; <i>sl</i> ; NH); 8,17 (1H; <i>sl</i> ; NH ₂); 7,49 (2H; <i>d</i> ; J= 8,7; H-C _{Ar} -(2 e 6)); 7,10 (2H; <i>d</i> ; J= 8,4; H-C _{Ar} -(2' e 6')); 6,98 (2H; <i>d</i> ; J= 8,4; H-C _{Ar} -(3' e 5')); 6,73 (2H; <i>d</i> ; J= 8,7; H-C _{Ar} -(3 e 5)).
RMN ^{13}C δ : 177,2 (C=S); 159,1 (C-OH); 158,5 (C-OH); 150,0 (C=N); 129,8 (C _{Ar} -(2 e 6)); 129,4 (C _{Ar} -(2' e 6')); 127,7 (C _{Ar} -(1)); 121,6 (C _{Ar} -(1')); 116,4 (C _{Ar} -(3 e 5)); 115,1 (C _{Ar} -(3' e 5')).
EM-IE: 289 (7; [M+2] ⁺); 288 (20; [M+1] ⁺); 287 (57; [M] ⁺); 270 (52); 253 (40); 227 (46; [M-CSNH ₂] ⁺); 212 (100; [M-NHCSNH ₂] ⁺); 197 (37); 185 (13); 152 (10); 134 (19); 120 (27); 93 (19); 65 (42); 60 (20).

5.2. JUSTIFICAÇÃO DA MONTAGEM SIA

O Hg(II) é complexado pela TDHB em meio alcalino, sendo o número de coordenação dependente da concentração e tempo de contacto das duas espécies no meio reaccional. A formação destes complexos tem efeito protector da TDHB relativamente à sua oxidação catalisada pelo Cu(II). Na ausência do ião protector, ocorre oxidação e

deste modo formação da espécie mais absorvente ao comprimento de onda de análise. A aplicação do método da curva de calibração baseado na adição de reagente em excesso (TDHB) a soluções de concentração crescente em Hg(II) é de difícil implementação dada a alteração temporal da estequiometria da reacção com a concentração dos reagentes^[4-5]. Atendendo aos aspectos atrás citados, optou-se pela adição de TDHB às soluções de Hg(II) carregadas pelo agente oxidante e pelo catalisador, verificando-se a partir de que concentração de TDHB se iniciava a formação do produto corado.

Para traduzir de modo automático a metodologia proposta, foi necessário criar um mecanismo que permitisse a adição de volumes crescentes de TDHB. Tal foi conseguido através da utilização de uma válvula comutadora de três vias controlada por micro-computador (figura 5.2.1), através da qual escoavam alternadamente para o tubo de reacção, amostra ou solução reagente. Através do software de controlo (Anexo 1) definiu-se o modo de operação da válvula como uma sequência de ciclos temporais. A quantidade de TDHB adicionada em cada ciclo de actuação da válvula, era definida por dois parâmetros: um parâmetro denominado tempo de activação, t_{act} , que representa a percentagem de tempo que, em cada ciclo, a válvula solenóide se encontrava activada, e um outro parâmetro, *passo*, que representa o acréscimo do t_{act} entre dois ciclos sucessivos (em segundos). Ambos os parâmetros eram introduzidos no conjunto inicial de instruções de definição do procedimento analítico.

Pela outra porta da válvula solenóide era aspirada a solução contendo o peróxido de hidrogénio, o Cu(II), o tampão e a amostra. Após saírem da válvula solenóide, estas soluções escoavam através da válvula selectora para o tubo de reacção. Utilizava-se um tubo de

reação com uma extensão conveniente para que ocorresse interdispersão de ambas as soluções.

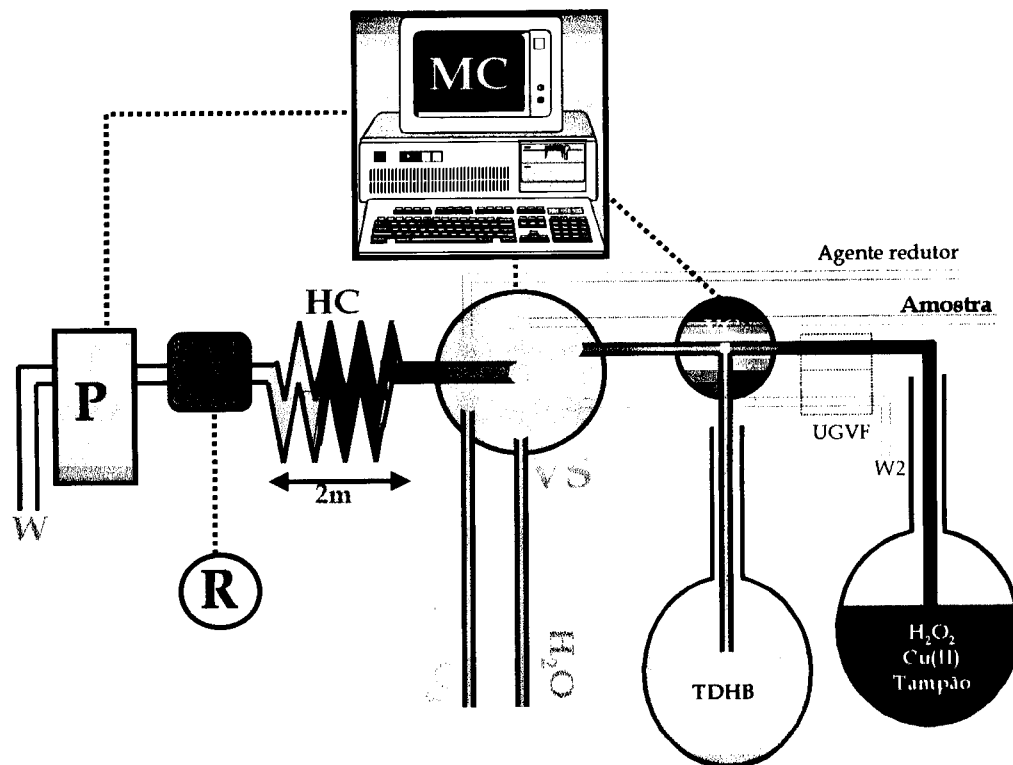


Figura 5.2.1: Esquema da montagem SIA desenvolvida. A tracejado cheio são representadas as ligações relativas ao envio de dados. A tracejado mais fino são representados os componentes relativos à geração de vapor frio. Legenda: P - Bomba peristáltica; D - Espectrofotómetro; R - Registrador; MC - Computador de controlo do sistema. A este computador foi adicionada a placa de envio de dados; HC - Tubo de reacção; VS - Válvula selectora multiposição; VC - Válvula comutadora solenóide; UGVF - Unidade geradora de vapor frio; W e W2 - Esgoto e esgoto auxiliar.

Finalmente, a absorvência das sucessivas secções transversais do escoamento era monitorizada quando da sua passagem pela célula de fluxo. O sinal típico obtido nestas condições, encontra-se representado na figura 5.2.2. O sinal pode ser caracterizado em três componentes temporais. Na primeira, t_1 , que decorre entre o início da adição de TDHB (que ocorre simultaneamente com a injeção de amostra) e a alteração do valor de absorvência. A sua magnitude é proporcional ao

comprimento do tubo de reacção e inversamente proporcional à magnitude do caudal adoptado, ao $t_{act.}$ inicial e ao *passo* entre ciclos.

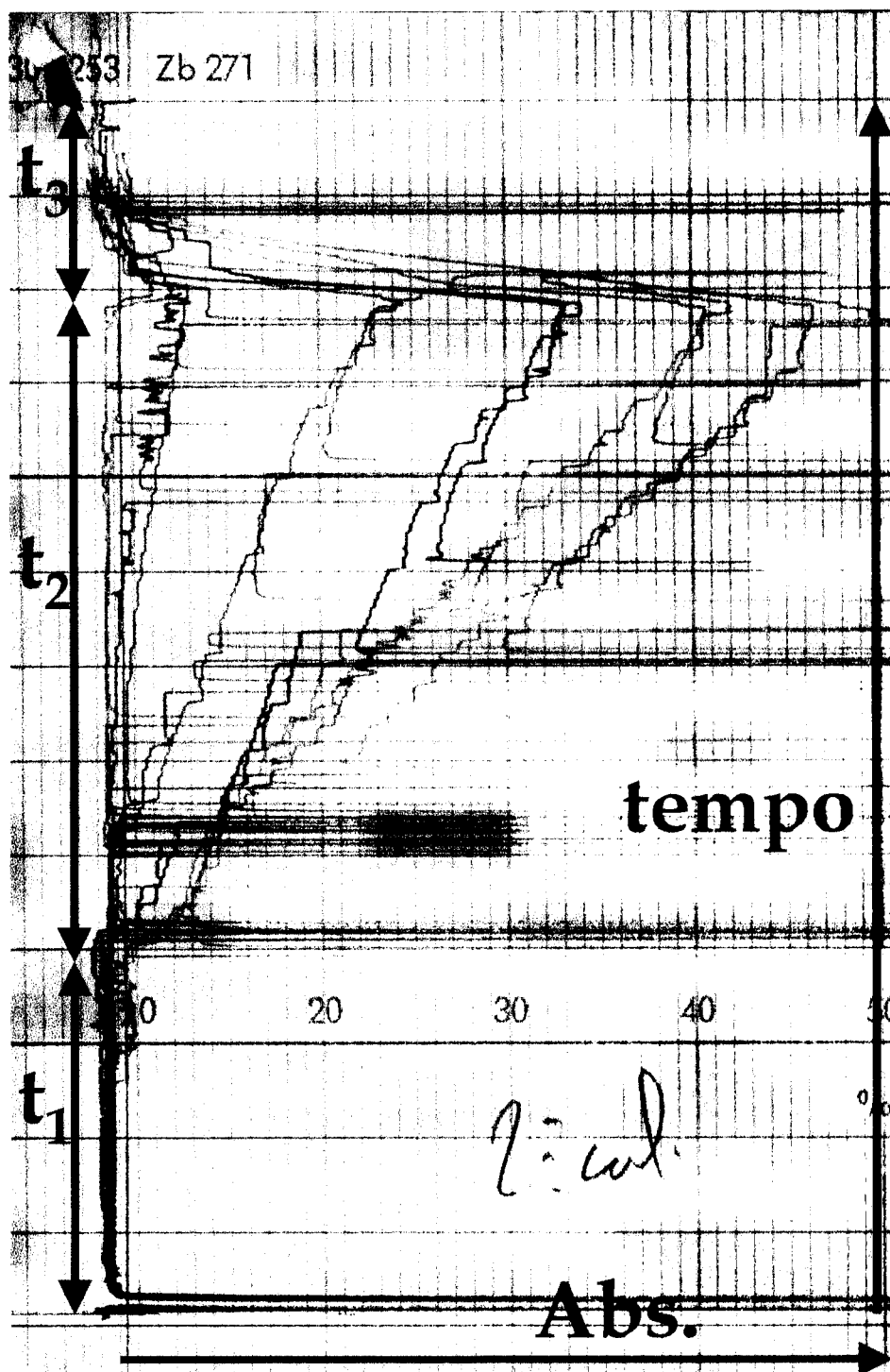


Figura 5.2.2: Exemplo de vários sinais obtidos na determinação de mercúrio através da metodologia desenvolvida, nas condições descritas.

Na segunda componente, t_2 , a oxidação da TDHB em excesso, determina um aumento da absorvência proporcional, do ponto de vista químico, à concentração de TDHB e inversamente proporcional à concentração de Hg(II) na amostra. Sob o ponto de vista hidrodinâmico, é proporcional ao *passo* determinado, ao $t_{act.}$ e ao caudal de aspiração.

Em cada ciclo de activação da válvula solenóide decresce a quantidade de oxidante e catalisador que acede ao tubo de reacção. Assim, quando o $t_{act.}$ é elevado, observa-se uma diminuição da absorvência (t_3), tanto mais acentuada quanto maior o *passo* e menor a concentração de oxidante na solução que acede à válvula.

A optimização do procedimento iniciou-se com o estudo do comprimento de onda a que deveriam ser realizadas as medidas de absorvência. Para o efeito, efectuou-se o registo do espectro das soluções que percorrem o sistema efectuando um varrimento dos comprimentos de onda (figura 5.2.3). As soluções estudadas foram a solução diluída de TDHB, a solução transportadora (contendo Cu(II), H₂O₂, tampão e Hg) e a solução resultante da mistura destas soluções, *i. e.*, a solução contendo a TDHB oxidada. O comprimento de onda ao qual a diferença de absorvência entre a TDHB oxidada e a absorvência das soluções presentes fosse maior, originaria medidas de maior sensibilidade. Seleccionou-se o comprimento de onda de 375nm para efectuar as determinações. Ainda que não corresponda ao comprimento de onda ao qual se observa um máximo de absorvência do produto reaccional, representa um compromisso satisfatório, na medida em que a comprimentos de onda inferiores, começa a sentir-se fortemente a absorvência da solução de TDHB. Procurou-se deste modo, garantir uma margem de segurança nas medições. Este resultado representa uma modificação em relação aos procedimentos descritos por Saro e

Bendito^[4] e por Márquez *et al.*^[5], cujas determinações eram efectuadas a 415nm. Tal pode dever-se ao facto da TDHB sintetizada apresentar características diferentes da obtida por aqueles autores (eventualmente maior grau de pureza).

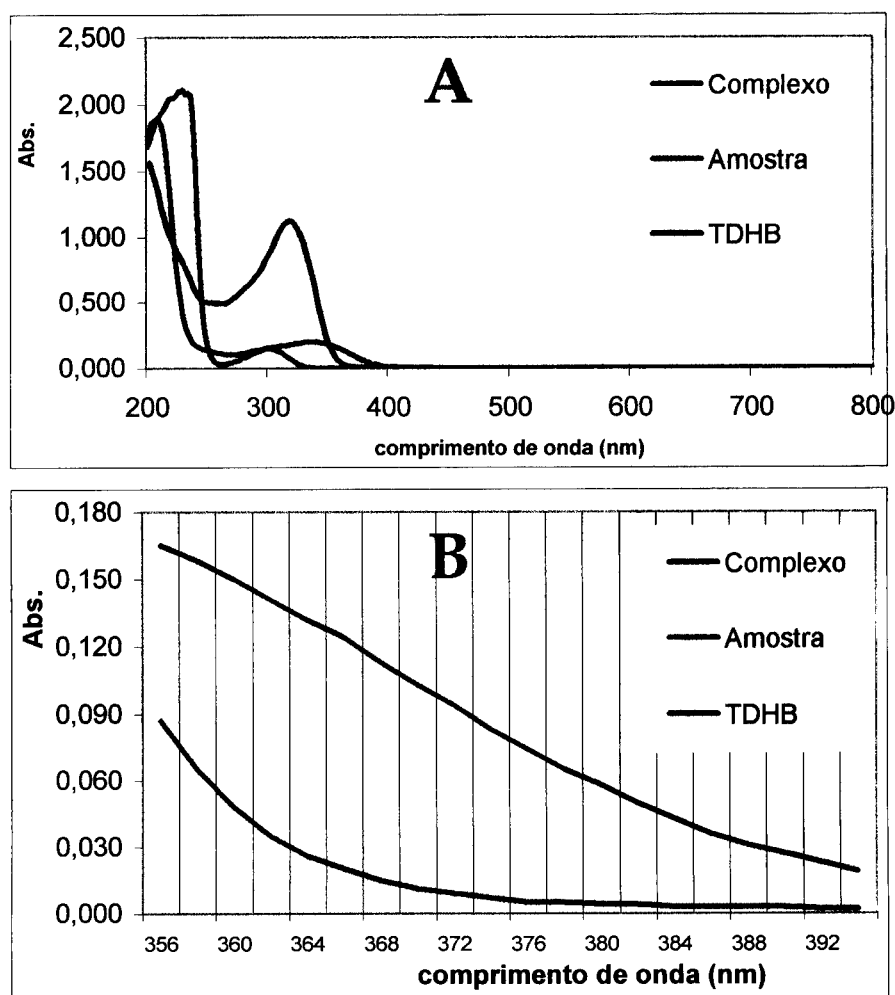


Figura 5.2.3: Espectros de absorvência das várias soluções transportadas ao longo do sistema SIA desenvolvido. A - Varrimento dos comprimentos de onda entre 200 e 800nm. B - Espectro ampliado da zona entre 352 e 396nm de A.

5.3. OPTIMIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DE Hg

Após concluir a implementação da montagem, procedeu-se à optimização da determinação de mercúrio, avaliando a influência das

condições de operação da montagem e químicas na sensibilidade do procedimento analítico. Esta, foi, nesta fase, avaliada através da menor concentração de mercúrio que originava um sinal distinto do sinal gerado pela injeção do branco. Pretendia-se que a metodologia desenvolvida permitisse a determinação de concentrações de mercúrio da ordem do $1\mu\text{g/L}$, valor limite para o controlo de qualidade de águas. Foi, igualmente, tido em conta a duração dos ensaios, na medida em que quanto menor fosse, maior seria a frequência de amostragem.

5.3.1. Optimização das condições operacionais do módulo analítico

Os parâmetros avaliados foram o caudal de aspiração, o t_{act} , o *passo* e o comprimento do tubo reactor. A duração do ensaio foi sempre tida em conta, na medida em que se pretendia obter o maior ritmo de amostragem possível. Inicialmente, fixou-se o ciclo de activação da válvula (t_{act} de 10%, *passo* de 1%) e o comprimento do tubo reactor de 2m. A aspiração era efectuada a um caudal de 1,55mL/min. Nestas condições obtinha-se um sinal muito escalado, com vários “patamares”, reflexo de uma dispersão insuficiente que decorria, quer da adopção de um caudal relativamente elevado quer, sobretudo, de um *passo* elevado, já que os “patamares” eram bem evidentes ao fim de alguns ciclos de operação da válvula. Foi-se então diminuindo o *passo* por forma a que independentemente da TDHB adicionada, a homogeneidade da sua dispersão na zona da amostra se mantivesse em todo o ensaio analítico, evitando a flutuação do sinal. O estudo de valores de *passo* entre 0,01 e 1% permitiu concluir que a diminuição do *passo* para valores até 0,1% originava sinais com menores flutuações. Também a sensibilidade da metodologia aumentava, na medida em que o acréscimo nas quantidades de TDHB adicionada eram menores. Para valores de *passo* inferiores a 0,1%, o sinal tornava-se bastante irregular.

No que concerne ao t_{act} . inicial, efectuaram-se várias determinações para valores compreendidos entre 0,1 e 20%, tendo-se confirmado que com a sua diminuição, diminuía a concentração de mercúrio que originava um sinal distinto do sinal do branco (figura 5.3.1.1).

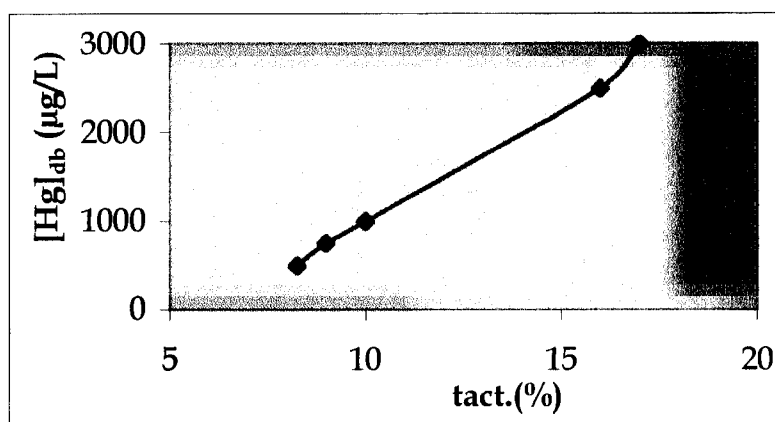


Figura 5.3.1.1: Efeito da variação do t_{act} . na concentração de mercúrio, cujo sinal analítico se distingue do sinal do branco ($[Hg]_{ab}$).

De facto, o efeito inibidor do mercúrio só se faz sentir quando este se encontra presente em quantidades tais que seja capaz de complexar toda a TDHB presente^[4]. Por outro lado, e para valores de t_{act} . menores que 1%, o sinal tornava-se bastante irregular, à semelhança do que ocorria com a adopção de um *passo* inferior a 0,1%. Este fenómeno decorria provavelmente de um comportamento menos reprodutível da válvula solenóide nestas condições. Refira-se, ainda, que a diminuição deste parâmetro (à semelhança do que ocorre com o *passo*) origina um aumento na duração dos ensaios, já que diminui a quantidade de TDHB adicionada. Por este motivo, procurou-se diminuir o comprimento do tubo reactor, tendo-se testado os comprimentos de 1,5m e 0,7m. Contudo, a redução do comprimento, originava sinais bastante flutuantes, sinónimo de que a dispersão era insuficiente. Assim, manteve-se o comprimento em 2m.

A optimização destes parâmetros, por si só, não permitia a determinação de concentrações de mercúrio inferiores a $100\mu\text{g/L}$. Tornou-se então evidente a necessidade da utilização de caudais mais reduzidos, já que a variação do caudal provocava efeitos semelhantes à variação do *passo* e do t_{act} , na medida em que ambos, e até certo ponto, provocavam uma redução na concentração de mercúrio, cujo registo se distinguia do sinal do branco. Foram então efectuados sucessivos ensaios utilizando diversos caudais. Verificou-se que a diminuição do caudal originava um aumento da sensibilidade (figura 5.3.1.2) e do tempo de execução dos ensaios. Da necessidade de estabelecer um compromisso, entre ambos os factores, seleccionou-se o caudal de $0,47\text{mL/min}$, o qual permitia a determinação de concentrações de mercúrio na ordem do $1\mu\text{g/L}$.

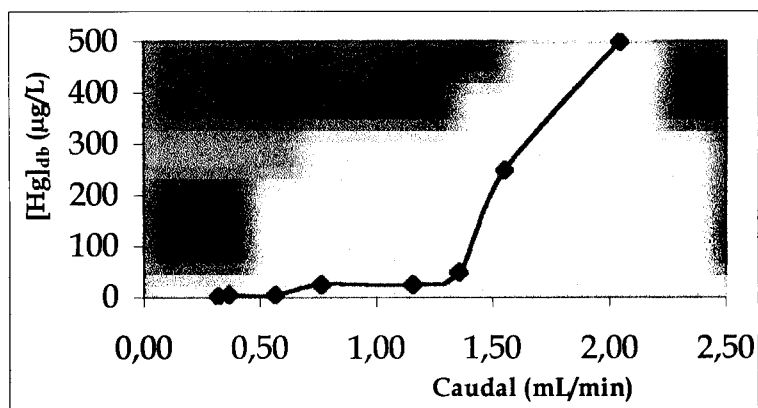


Figura 5.3.1.2: Efeito da variação do caudal na concentração de mercúrio, cujo sinal analítico se distingue do sinal do branco ($[\text{Hg}]_{\text{db}}$).

Esta optimização instrumental resultou no estabelecimento das condições posteriormente utilizadas para efectuar a calibração do procedimento, bem como os estudos de precisão e exactidão da metodologia. Estas condições foram igualmente utilizadas nas determinações de mercúrio efectuadas para diversas amostras (tabela 5.3.1.1).

Tabela 5.3.1.1: Condições instrumentais otimizadas e utilizadas na realização das determinações de mercúrio. O sentido “a” refere-se a aspirar e o sentido “b” a bombear.

Etapa analítica	Tempo (s)	Caudal (mL/min)	Sentido (a ou b)
Adição de TDHB à amostra	400	0,47	a
Transporte de amostra	100	0,47	a
Lavagem com HNO ₃	10	1,16	a
Lavagem com água desionizada	90	1,16	a
$t_{act.} (\%) = 1$ $passo (\%) = 0,3$			

Nas condições anteriormente descritas (tabela 5.3.1.1), gastavam-se 23,38µg de TDHB (1,87mL de uma solução 0,00125%) e 2,39mL de amostra. A metodologia proposta permite uma frequência de 6 amostras por hora, o que se pode considerar satisfatório atendendo ao facto de que este procedimento se baseia numa titulação.

5.3.2. Optimização das condições químicas

Após objectivar as condições instrumentais a utilizar, efectuou-se o estudo da influência das condições químicas, *i. e.*, as concentrações de TDHB, de peróxido de hidrogénio, de cobre e o volume de solução tampão na intensidade do sinal analítico. Partindo da concentração de TDHB de 0,01% descrita na literatura^[5], e com o decorrer da optimização analítica, esta concentração foi sendo reduzida, já que deste modo se reduzia a concentração de mercúrio cuja determinação originava um sinal distinto do sinal do branco. A redução da concentração de TDHB provocava um efeito semelhante à redução do $t_{act.}$, do *passo* e do caudal, anteriormente descritos. Simultaneamente à redução da concentração de TDHB, reduziram-se, proporcionalmente, as concentrações de H₂O₂, Cu(II) e o volume de solução tampão. Desta

redução, resultou a utilização de uma concentração de TDHB de 0,00125%, isto é, uma concentração 8 vezes menor que a inicialmente utilizada. Conseqüentemente, a concentração das restantes espécies era 8 vezes menor em relação às inicialmente utilizadas (tabela 5.3.2.1). A constatação de que a diluição das espécies provocava um aumento de sensibilidade do procedimento pode encontrar explicação no facto de o mercúrio inibir a reacção de oxidação da TDHB, pelo que quanto menor for a quantidade desta espécie, menor será a quantidade de mercúrio necessária para provocar a sua inibição.

Tabela 5.3.2.1: Concentrações das várias espécies químicas, presentes em solução. São apresentadas as concentrações utilizadas inicialmente (descritas) e as concentrações resultantes da optimização.

Concentrações	[TDHB] (m/v)	[Cu(II)] (mol/L)	[H ₂ O ₂] (v/v)	Vol. solução tampão (mL tampão/mL)
Descritas ^[5]	0,01%	1,17×10 ⁻⁵	3,75×10 ⁻³ %	0,05
Optimizadas (Descritas/8)	0,00125 %	1,46×10 ⁻⁶	4,69×10 ⁻⁴ %	6,25×10 ⁻³

Posteriormente, avaliou-se a influência que a variação da concentração de cada uma das espécies provocava na intensidade do sinal analítico. Verificou-se que a redução da concentração de peróxido de hidrogénio ($\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ da concentração optimizada) provocava uma diminuição da intensidade do sinal analítico, com conseqüente perda de sensibilidade. Este efeito devia-se à insuficiente quantidade de peróxido de hidrogénio, o que reduzia a quantidade de TDHB oxidada, com conseqüente diminuição da intensidade do sinal. Quando a sua concentração aumentava (2, 4 e 8 vezes) observava-se um incremento do t_3 , anteriormente definido, *i. e.*, um aumento do tempo que o sinal analítico demorava para atingir a linha de base.

A redução do volume da solução tampão (nas mesmas proporções descritas para o H_2O_2) provocou um efeito semelhante à redução da concentração de peróxido de hidrogénio, ou seja, uma diminuição da intensidade do sinal analítico, reflexo de perda de capacidade de manutenção do pH próximo de 10. Por outro lado, a utilização de volumes superiores aos descritos (nas proporções descritas para o peróxido de hidrogénio) de solução tampão, não provocava nenhum efeito aparente.

A variação da concentração de cobre ($\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 2, 4 e 8 vezes a concentração otimizada), não resultou em nenhum efeito na intensidade do sinal analítico. O cobre encontrava-se presente em excesso, não sendo assim alterada a sua actividade de catalisador da reacção por diminuição da sua concentração.

5.4. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS RESULTADOS OBTIDOS

Finda a optimização do procedimento efectuaram-se as etapas conducentes ao estudo da precisão, da exactidão (por comparação dos resultados com a Espectrofotometria de Absorção Atómica por geração de vapor frio, utilizando um conjunto de amostras de água) e cálculo do limite de detecção do procedimento.

5.4.1. Modo de medida dos sinais analíticos

De acordo com Saro e Bendito^[4], o efeito inibidor de mercúrio só é aparente quando há mercúrio suficiente para complexar toda a TDHB, motivo pelo qual, quando a TDHB está presente em largo excesso, este efeito não é visível. Adicionalmente, e conforme anteriormente referido,

a aplicação do método da curva de calibração baseado na adição de reagente em excesso (TDHB) a soluções de concentração crescente em Hg(II) é de difícil implementação dada a alteração temporal da estequiometria do complexo com a concentração dos reagentes. Contudo, e apesar dos aspectos acima citados, e sob as condições experimentais anteriormente descritas, em determinada zona da curva de registo analítico, existe uma relação linear entre a concentração de mercúrio e a intensidade do sinal analítico. O ponto da curva em que se registaram as alturas corresponde ao período de 490s após o início da determinação. Este foi o instante seleccionado, por ser aquele que permitia a obtenção da melhor correlação entre a intensidade do sinal analítico e a concentração de mercúrio. A intensidade dos sinais analíticos foi medida pelo registo da altura das curvas de absorvência, e subsequentemente convertida em absorvência.

5.4.2. Calibração da metodologia proposta

Após ter estabelecido o modo de medição dos sinais analíticos, efectuaram-se diversas calibrações, por forma a determinar a zona da curva em que existia uma proporcionalidade entre a intensidade do sinal analítico a concentração de mercúrio (figura 5.4.2.1).

Verificou-se que para concentrações de mercúrio superiores a $7,5\mu\text{g/L}$ a intensidade do sinal analítico se mantinha praticamente constante. Por este motivo, o limite superior de linearidade do procedimento situava-se próximo deste valor. Obteve-se uma resposta linear entre a intensidade do sinal analítico e a concentração de mercúrio entre 0 e $7,5\mu\text{g/L}$.

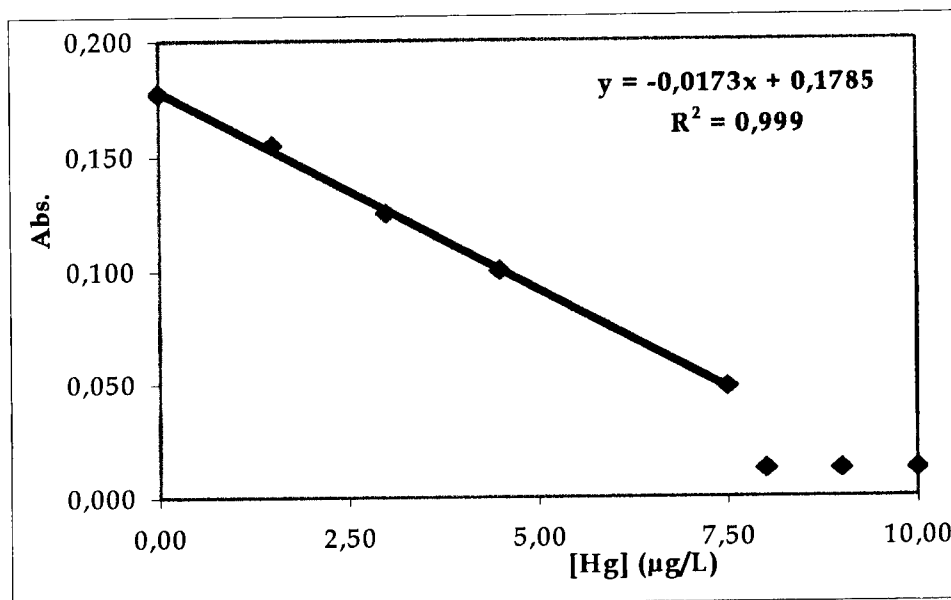


Figura 5.4.2.1: Calibração da metodologia proposta por injeção dos padrões de 0,0; 1,5; 3,0; 4,5; 7,5; 8,0; 9,0 e 10,0µgHg/L. Foi estabelecida de uma correlação entre a concentração de mercúrio e o sinal analítico ($R^2=0,999$; Legenda da figura).

Verificou-se, igualmente, uma elevada correlação entre a concentração de mercúrio e o sinal analítico obtido, para concentrações de mercúrio entre 0 e 7,5µg/L. Nestas condições, a sensibilidade do procedimento (declive da curva de calibração) é de $0,0173(\mu\text{gHg/L})^{-1}$, sendo a correlação ($R^2=0,999$) traduzida pela equação:

$$y = -0,0173x + 0,1785$$

5.4.3. Limite de detecção do procedimento

O limite de detecção do procedimento foi calculado com base nos valores de sinal analítico obtidos para 20 medidas do branco. Obteve-se o valor de 1,0µgHg/L. Este valor pode considerar-se satisfatório, na medida em que serve os intentos propostos, *i. e.*, o controlo da qualidade de águas para consumo humano, cujo VMA é de 1,0µgHg/L. Cumpre-se igualmente o objectivo relativo a águas residuais, cujo VMA

é de 50µg/L. Nestas condições, haveria necessidade de recorrer a uma diluição da amostra.

5.4.5. Precisão do método proposto

A precisão do método proposto foi avaliada aferindo a reprodutibilidade da metodologia em questão. Para o efeito, efectuou-se o cálculo do coeficiente de variação dos valores obtidos em 10 medidas repetidas de 2 amostras, uma com concentrações de mercúrio na zona superior de linearidade e outra na zona inferior de linearidade. No primeiro caso obteve-se um coeficiente de variação de 2,05%, e no segundo caso de 4,50%. Estes resultados não surpreendem, na medida em que quanto menor a concentração de mercúrio determinada, maior será o erro associado a essa medida.

5.4.6. Exactidão do método proposto, por comparação dos resultados obtidos com os obtidos através da EAA-VF

Os resultados obtidos para 10 amostras injectadas no sistema desenvolvido, foram comparados com os fornecidos pela EAA-VF para as mesmas amostras (tabela 5.4.6.1). Estes valores foram correlacionados entre si, por forma a aferir a exactidão do procedimento (figura 5.4.6.1).

O elevado erro obtido na determinação da concentração de mercúrio da amostra D não deve ser desvalorizado. Contudo, esse valor elevado decorre do facto de as concentrações de mercúrio serem bastante reduzidas. Para outras amostras contendo reduzidas concentrações de mercúrio, obtiveram-se erros reduzidos (<10%). De um modo geral, pode-se afirmar os resultados obtidos revelam uma boa concordância

com os valores obtidos pela EAA-VF. Esta constatação é reforçada pela correlação ($R^2=0,9985$) obtida entre o procedimento proposto e a EAA-VF.

Tabela 5.4.6.1: Resultados obtidos na medição de 10 amostras de águas naturais e residuais através da metodologia proposta e por EAA-VF ($\mu\text{Hg/L}$). Apresenta-se igualmente o erro relativo de cada determinação.

Amostra	EAA-VF	SIA	Erro relativo (%)
A	0,43	0,41	-3,47
B	0,46	0,49	6,45
C	0,89	0,82	-8,15
D	1,16	0,79	-32,03
E	1,54	1,68	9,32
F	1,81	1,79	-0,87
G	1,82	1,82	-0,25
H	3,03	3,04	0,39
I	5,33	5,48	2,69
J	10,94	11,23	2,60

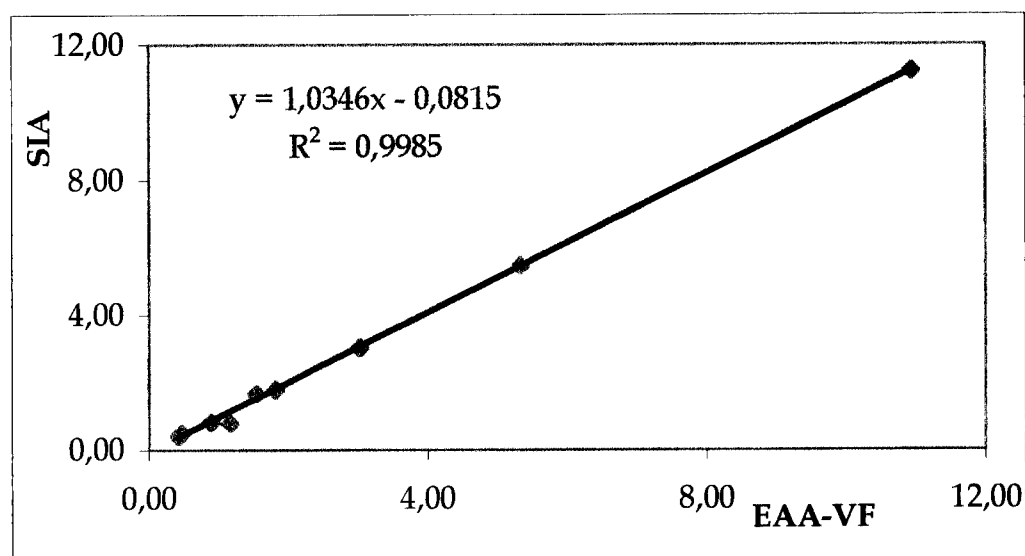


Figura 5.4.6.1: Correlação dos valores obtidos por EAA e pela montagem SIA desenvolvida. Em legenda é apresentada a equação da recta e o valor de R^2 .

Adicionalmente, efectuou-se o teste t de Student emparelhado aos valores obtidos por ambas as metodologias, podendo-se concluir que

não se verificam diferenças significativas entre a metodologia proposta e a EAA-VF, com um intervalo de confiança de 95%.

5.5. REFERÊNCIAS

- [1] J. McMurry, *Organic Chemistry*, 4th ed., Brooks/Cole Publishing Company, Pacific Grove, CA, USA, 1996, p. 733-737.
- [2] G.H. Schmid, *Organic Chemistry*, Mosby, St. Louis, Missouri, USA, 1996, p. 619-624.
- [3] F. Toribio, J.M.L. Fernández, D.P. Bendito e M. Valcárcel, *Química Analítica (Barcelona)*, I (1), 21 (1982).
- [4] T.R. Saro e D.P. Bendito, *Analytica Chimica Acta*, 182, 163 (1986).
- [5] M. Márquez, M. Silva e D. Perez-Bendito, *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 6(3), 307 (1988).

IV. CONCLUSÕES GERAIS

Através de uma montagem de custo reduzido, foi possível automatizar um procedimento de determinação colorimétrica de mercúrio, o que se traduz numa metodologia pouco dispendiosa, e que não requer instrumentação dispendiosa, nomeadamente quando comparada com a Espectrofotometria de Absorção Atómica.

Adicionalmente, os volumes utilizados eram bastante reduzidos, e diminuiu-se o risco de manuseamento de compostos tóxicos e de contaminação externa, na medida em que a determinação se processava em circuito fechado.

A montagem SIA implementada permitia ainda o desenvolvimento e implementação de outras determinações.

O reagente orgânico TDHB foi sintetizado e utilizado na determinação de mercúrio.

O limite de detecção da metodologia proposta permite o controlo de qualidade de águas naturais e residuais, no que concerne ao mercúrio.

Os resultados obtidos pelo método desenvolvido revelaram boa concordância com os obtidos por Espectrofotometria de Absorção Atómica com geração de vapor frio. Adicionalmente, esses resultados revelaram-se reprodutíveis.

ANEXOS

ANEXO 1

Neste anexo é apresentado o programa que foi utilizado para controlar o sistema SIA desenvolvido.

PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA

```

REM *****
REM *
REM *
REM *          João VSA "software"
REM *
REM *
REM *****

```

```

DECLARE SUB porta (p, tesp)
DECLARE SUB aspirar (VEL, T1, p, tact, flag)
DECLARE SUB bombear (VEL, T1, flag)

```

```

10 CLS
port% = &H300
SCREEN 9
COLOR, 8

```

```

REM *****DEFINIÇÃO DO ECRÃ*****

```

```

WINDOW (1000, 1000)-(0, 0)
LINE (0, 0)-(1000, 1000), 14, B
LINE (10, 900)-(990, 985), 14, B
LINE (640, 50)-(965, 320), 14, B
COLOR 14
LOCATE 2, 24: PRINT "PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA"
LOCATE 4, 4: PRINT "POSIÇÃO (1 a 6)"

```

```
LOCATE 4, 25: PRINT "TEMPO (s)"
LOCATE 4, 40: PRINT "CAUDAL (0-45)"
LOCATE 4, 60: PRINT "SENTIDO (a ou b)"
LOCATE 19, 57: PRINT "tempo"
LOCATE 22, 63: PRINT "ciclo"
LOCATE 19, 69: PRINT "posição"
```

```
REM *****CARACTERÍSTICAS DO QUADRO*****
```

```
COLOR 7
```

```
DIM col(4) 'define um vector de colunas para os dados no ecrã
```

```
DATA 10,27,45,65
```

```
FOR c = 1 TO 4
```

```
READ p
```

```
col(c) = p
```

```
NEXT c
```

```
RESTORE
```

```
REM*****INICIALIZAÇÃO DE VARIÁVEIS*****
```

```
DIM qua(15, 4) 'este quadro vai conter os valores das variáveis
```

```
FOR i = 1 TO 15
```

```
FOR K = 1 TO 4
```

```
qua(i, K) = 0
```

```
NEXT K
```

```
NEXT i
```

```
REM*****ENTRADA DE DADOS*****
```

```
klin = 6
```

```
DO
```

```
LOCATE klin, col(1): INPUT " ", dado$
```

```
IF dado$ = "" THEN EXIT DO
```

```
dado = VAL(dado$)
```

```
qua(klin - 5, 1) = dado
```

```
LOCATE klin, col(2): INPUT " ", x
```

```
qua(klin - 5, 2) = x
LOCATE klin, col(3): INPUT " ", y
qua(klin - 5, 3) = y
LOCATE klin, col(4): INPUT " ", B$
  IF LCASE$(B$) = "a" THEN qua(klin - 5, 4) = 1
  IF LCASE$(B$) = "b" THEN qua(klin - 5, 4) = 0
  klin = klin + 1
LOOP
1 BEEP
COLOR 15
LOCATE 18, 5: INPUT "alterar dados? (s/n) ", d$
IF LCASE$(d$) <> "n" AND LCASE$(d$) <> "s" THEN 1
IF LCASE$(d$) = "s" THEN
cont = klin - 1
  GOTO 4000
END IF
LOCATE 19, 5: INPUT "tempo de activação (%)", tact
LOCATE 20, 5: PRINT "número de repetições do ciclo:"
LOCATE 20, 35: INPUT " ", CICLO
LOCATE 20, 35: PRINT " "

REM*****EXECUÇÃO DAS INSTRUÇÕES*****

FOR cic = 1 TO CICLO
LOCATE 23, 64: PRINT cic
FOR lin = 1 TO (klin - 6)
  flag = 0
  p = qua(lin, 1)
  IF lin > 1 OR lin = 1 THEN
    VN = qua(lin, 1)
    VA = qua(lin - 1, 1)
  END IF
  IF VN > VA THEN tresp = (VN - VA) * 80000
  IF VN < VA THEN tresp = ((8 - VA) + VN) * 80000
  CALL porta(p, tresp)
  VEL = qua(lin, 3)
```

```

T1 = qua(lin, 2)
IF qua(lin, 4) = 0 THEN CALL bombear(VEL, T1, flag)
IF qua(lin, 4) = 1 THEN CALL aspirar(VEL, T1, p, tact, flag)
IF flag = 1 THEN 333
NEXT lin
port% = &H300
OUT port% + 3, 17
FOR q = 1 TO 2000: NEXT
OUT port% + 3, 23 - 16
FOR z = 1 TO 9000: NEXT
NEXT cic
333 OUT port% + 3, 23
FOR q = 1 TO 2000: NEXT
OUT port% + 3, 23 - 16
FOR z = 1 TO 9000: NEXT
2 BEEP
LOCATE 22, 5: INPUT "alterar quadro, novo ou sair (a/n/s)? ", n$
IF LCASE$(n$) <> "n" AND LCASE$(n$) <> "a" AND LCASE$(n$) <> "s" THEN 2
IF LCASE$(n$) = "a" THEN 4000
IF LCASE$(n$) = "n" THEN 10
IF LCASE$(n$) = "s" THEN END
STOP

REM*****SUB ROTINA DA PORTA*****
REM*****SUB ROTINA BOMBEAR*****
REM*****SUB ROTINA ASPIRAR*****
REM *****ALTERAÇÃO DE QUADRO*****

4000 FOR hh = 1 TO cont - 5
LOCATE hh + 5, col(1): INPUT " ", dado$
  IF dado$ <> "" THEN
    dado = VAL(dado$)
    qua(hh, 1) = dado
  END IF
LOCATE hh + 5, col(2): INPUT " ", x$
  IF x$ <> "" THEN

```

```
x = VAL(x$)
qua(hh, 2) = x
END IF
LOCATE hh + 5, col(3): INPUT " ", y$
IF y$ <> "" THEN
    y = VAL(y$)
    qua(hh, 3) = y
END IF

LOCATE hh + 5, col(4): INPUT " ", B$
IF B$ <> "" THEN
    IF LCASE$(B$) = "a" THEN qua(hh, 4) = 1
    IF LCASE$(B$) = "b" THEN qua(hh, 4) = 0
END IF
NEXT hh
GOTO 1
```

```
SUB aspirar (VEL, T1, p, tact, flag)
```

```
port% = &H300
```

```
tt = TIMER
```

```
c = 0
```

```
DO
```

```
TENSAO = INT(VEL / 48 * 4096)
```

```
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 16) * 16
```

```
hb% = (TENSAO - lb%) / 16
```

```
OUT port% + 4, lb%
```

```
OUT port% + 5, hb%
```

```
OUT port% + 11, 6
```

```
IF p = 3 THEN
```

```
    c = c + 1
```

```
    LOCATE 20, 65: PRINT c
```

```
    OUT port% + 11, 14
```

```
    FOR i = 1 TO 40000 * tact / 100
```

```
    NEXT i
```

```
    OUT port% + 11, 6
    FOR i = 1 TO 40000 * (100 - tact) / 100
    NEXT i
END IF
IF p = 4 THEN
    c = c + 1
    LOCATE 20, 65: PRINT c
    OUT port% + 11, 22
    FOR i = 1 TO 40000 * tact / 100
    NEXT i
    OUT port% + 11, 6
    FOR i = 1 TO 40000 * (100 - tact) / 100
    NEXT i
tact = tact + .3
END IF

LOCATE 20, 56: PRINT USING "###.##"; TIMER - tt
    IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
        flag = 1
        EXIT DO
    END IF
LOOP WHILE TIMER - tt <= T1
OUT port% + 11, 0
END SUB

SUB bombear (VEL, T1, flag)
port% = &H300

tt = TIMER
DO
TENSAO = INT(VEL / 48 * 4096)
lb% = TENSAO - INT(TENSAO / 16) * 16
hb% = (TENSAO - lb%) / 16
OUT port% + 4, lb%
OUT port% + 5, hb%
OUT port% + 11, 2
```

```
LOCATE 20, 56: PRINT USING "###.##"; TIMER - tt
IF UCASE$(INKEY$) = "P" THEN
flag = 1
EXIT DO
END IF
LOOP WHILE TIMER - tt <= T1
OUT port% + 11, 0
END SUB
```

```
SUB porta (p, tesp)
port% = &H300
LOCATE 20, 71: PRINT p
OUT port% + 3, 23 - p
FOR i = 1 TO 5000: NEXT
OUT port% + 3, 23 - p - 16
FOR G = 1 TO tesp: NEXT
OUT port% + 3, 17
FOR h = 1 TO 2000: NEXT
END SUB
```

