

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA PARA DETERMINAÇÃO DE GRUPOS FUNCIONAIS EM SUBSTÂNCIAS HÚMICAS AQUÁTICAS UTILIZANDO FLUXO CONTÍNUO NA ADIÇÃO DO TITULANTE

Kelry Cristina Muniz BARBOSA¹; Ézio SARGENTINI JUNIOR²; Marcos Alexandre BOLSON³; Henrique Alves da SILVA⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq-INPA; ²Orientador CDAM/INPA; ³Co-orientador CDAM/INPA; ⁴Co-orientador UFAM

1. Introdução

A definição de substâncias húmicas aquáticas (SHA) está baseada em métodos cromatográficos de extração. Thurman & Malcolm (1981) definiram SHA como a porção não específica, amorfa, constituída de carbono orgânico dissolvido em pH 2,0 e adsorvente em coluna de resina XAD-8 com altos valores de coeficiente de distribuição. A presença de diferentes grupos funcionais nas SH permite o uso de várias técnicas para obter informações a respeito da funcionalidade e mecanismos de reação das SH no ambiente. Entre os métodos utilizados podem-se citar a espectrometria na região do infravermelho, ultravioleta-visível e ressonância magnética (RMN-C e RMN-H) (Haider *et al.* 1991; Abbt-Braun 1992; Rocha, *et al.* 2000) porém não são capazes de diferenciar os seus grupos funcionais. A técnica de titulação potenciométrica para determinação de grupos funcionais é utilizada por diversos pesquisadores, dentre eles estão, Aleixo e Godinho (1987), Masini (1998) e Zara (1997). A titulação potenciométrica tem sido empregada no estudo de substâncias húmicas, tanto para a determinação de grupos funcionais ácidos, como para estudar a interação com metais (Perdue 1988; Aleixo *et al.* 1992). Na determinação dos grupos funcionais em SH utilizando a titulação potenciométrica utiliza-se a função de Gran modificada. Pode ser utilizada como técnica analítica na caracterização das substâncias húmicas a função de Gran modificada. Segundo Toscano (1999) as funções de Gran modificadas são aplicadas nas determinações dos pontos de equivalência e constantes de ionização de cada grupo ácido em titulação potenciométrica de mistura de ácidos. Este método está baseado na segmentação e linearização da curva de titulação. Considerando a importância foi necessário desenvolver um sistema para caracterização de grupos funcionais em substâncias húmicas aquáticas utilizando titulação potenciométrica automatizado, com fluxo contínuo.

2. Material e Métodos

Foram preparadas soluções de NaOH 0,1 mol L⁻¹, C₆H₈O₇.H₂O 0,01 mol L⁻¹, HCl 0,01 mol L⁻¹ e padronizadas com C₈H₅KO₄ 0,1 mol L⁻¹ usando como indicador fenolftaleína. Foi preparado 250 ml de solução de SH com concentração de 2 g L⁻¹. Em todas as soluções a força iônica foi ajustada usando 0,01 mol L⁻¹ KCl e água deionizada. O sistema de fluxo contínuo é constituído por: uma bomba peristáltica de múltiplos canais da marca Ismatec modelo MC-MS/CA8, equipada com tubos *tygon*; válvulas solenoides de três vias COLE-PARMER modelo 625. E. Bunker CT. Vernon Hill IL; pHmetro HANNA modelo HI 223 eletrodo de referencia Ag/AgCl; agitador magnético e um computador para acionar a válvula e aquisição de dados. Para evitar a carbonatação do NaOH burbulhou-se de gás Argônio 99.999%, White Martins no titulante e no titulado. Para o estudo da vazão da bomba escolheu-se o tubo *tygon* de diâmetro 0,38 mm para fornecer a vazão mais adequada a ser utilizada. Para verificar a estabilidade, tempo de abertura da válvula e vazão da bomba peristáltica, ajustou-se a bomba em quatro velocidades diferentes 18 (vazão 1,16 mL min⁻¹), 36 (vazão 1,42 mL min⁻¹), 50 (vazão 1,63 mL min⁻¹) e 77 (vazão 2,02 mL min⁻¹) e ajustando-se a abertura da válvula para cada velocidade a fim de se obter a passagem de 25 µL por abertura de válvula. O acionamento da válvula foi controlado por um computador usando *software relais timer* (<http://www.kemo-electronic.com/download/RelaisTimer11.exe>). Para aferir a quantidade de 25 µL por abertura de válvula pesou-se a massa de água adicionada pelo sistema em uma balança analítica, fazendo pequenos ajustes no tempo da válvula até obter ≈ 0,0250 g. Para verificar a estabilidade dos tubos *tygon* foram realizados testes de reprodutibilidade (50 medidas de volumes) utilizando tubos novos de diâmetros 0,38mm para verificar a diferença quanto ao volume adicionado levando em consideração o desgaste dos tubos com o decorrer de 24 horas. Foram realizadas titulações de HCl 0,01 mol L⁻¹ e os titulantes SHA 2 g L⁻¹ e C₆H₈O₇.H₂O 0,01 mol L⁻¹ que foram acidificados por HCl 0,1 mol L⁻¹ até o pH 2, para estudar o tempo de estabilização do pH a cada medida e o erro de titulação. Para determinar os pontos de equivalência dos três grupos carboxílicos do ácido cítrico e da concentração de ácido clorídrico foi aplicada a curva de titulação a Função de Gran Modificada. A função de Gran Modificada utilizada foi a descrita nos trabalhos de Aleixo e Godinho, (1987), Aleixo *et al.* (1992) e Masini *et al.* (1998) para os tratamentos dos dados de titulação de ácido cítrico e substância húmica aquática. Foram realizadas três titulações volumétricas de ácido cítrico 0, 01 mol.L⁻¹ usando como titulante NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeito da vazão da bomba peristáltica

Na Tabela 1 estão visualizados os resultados dos experimentos após os ajustes de velocidade e tempo abertura de válvula para pipetagem de 25 µL.

Tabela 1. Resultados obtidos da regulagem das vazões correlacionados com o tempo de abertura de válvula

Vazão (mL min ⁻¹)	Nº de amostra	Volume médio (µL)	Desvio padrão	Abertura da válvula tempo (s)	Volume obtido (mL)	Volume esperado (mL)	Erro relativo (%)
1,16	50	24,8	1.10 ⁻⁴	35,557	1244	1250	0,8
1,42	50	25,2	1.10 ⁻⁴	2,840	1260	1250	0,8
1,63	50	24,4	2.10 ⁻⁴	2,000	1220	1250	2,4
2,02	50	24,7	1.10 ⁻⁴	1,463	1235	1250	1,2

Nas quatro vazões da bomba peristáltica não houve uma variação significativa no desvio padrão das adições o que significa dizer que o sistema mostrou-se bastante preciso nas diferentes rotações da bomba. O erro relativo das adições nas quatro velocidades é pequeno, sendo que as velocidades 18 e 36 foram as que apresentaram menor erro relativo, o que demonstra uma boa exatidão da medida adicionada. O experimento na vazão 1,16 mL min⁻¹ apesar de apresentar um erro pequeno de 0,8%, exigiu um tempo de abertura de válvula de 35,557 s, isto é, um tempo de abertura de válvula grande o que resultará em titulações muito demoradas. A vazão 1,63 mL min⁻¹ apresentou maior erro relativo entre as velocidades sendo assim descartada. O experimento na vazão 2,02 mL min⁻¹ representou o segundo maior erro relativo 1,2% e menor tempo de abertura 1,463 s o que resultará em titulações mais rápidas, porém nessa velocidade haverá um grande desgaste dos tubos tygon devido ao atrito dos roletes da bomba peristáltica no tubo tygon. Entre todas a vazão escolhida foi a vazão 1,42 mL min⁻¹ que apresentou menor erro relativo dos volumes adicionados, pequeno tempo de abertura de válvula e causará um menor desgaste dos tubos tygon.

3.2 Estabilidade do tygon e reprodutibilidade das medidas dos volumes adicionados

Na tabela 2 são apresentados os resultados de média do volume adicionado, desvio padrão e erro relativo no decorrer do experimento nos diferentes tempo de 0, 0,5, 1,2, 3, 4, 5, 24 horas.

Tabela 2. Resultados de reprodutibilidade de volume adicionado (µL) quanto à estabilidade do tubo tygon.

Tempo	0 h	0,5h	1h	2h	3h	4h	5h	24h
Média (n=50)	25,1	25,2	25,2	24,7	24,7	24,7	24,6	24,9
Desvio Padrão	1.10 ⁻⁴	1.10 ⁻⁴	1.10 ⁻⁴	2.10 ⁻⁴	8.10 ⁻⁵	1.10 ⁻⁴	9.10 ⁻⁴	4.10 ⁻⁴
Erro relativo	0,4%	0,8%	0,8%	1,2%	1,2%	1,2%	1,6%	0,4%

Estes resultados mostram que o sistema é reprodutivo nas adições dos volumes adicionados (0,025 mL) nos diferentes tempos de ensaios e sua estabilidade varia 0,4% a 1,6%, o que sugere que o sistema é estável e não necessita de estabilização prévia dos tubos tygon, e conseqüentemente o sistema pode ser utilizados em titulações de grande duração.

3.3 Calibração do sistema de titulação

A Figura 1 mostra o organograma do sistema de titulação com fluxo contínuo na adição do titulante. A calibração do sistema é feita em triplicata através da titulação com NaOH 0,1 mol L⁻¹ como titulante em HCl 0,01 mol L⁻¹ e comparado com os valores teóricos que estão mostrados no Tabela 3.

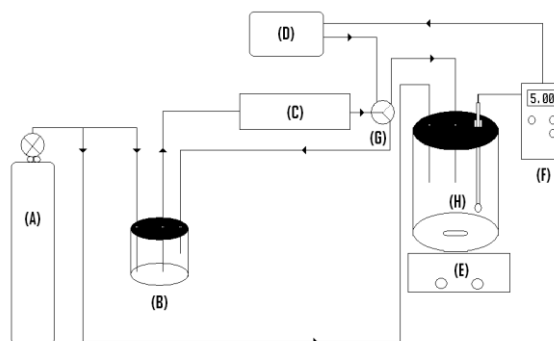


Figura 1. Sistema titulação potenciométrica automática utilizando a bomba peristáltica. (A) Gás argônio (B) Titulante (NaOH) (C) bomba peristáltica; (D) Computador (E) agitador magnético (F) ph - metro (G) válvula solenoide.

Tabela 3. Resultados das titulações de HCl

Experimento	Volume de equivalência (mL)	Média (mL)	Volume de esperado (mL)	Desvio padrão	Erro relativo (%)
1	3,1385				
2	3,2075	3,1650	3,1730	0,0369	0,25
3	3,1494				

Os volumes de equivalência foram obtidos através da função de Gran descrita no trabalho de Aleixo & Godinho (1987) e apresentaram um erro relativo médio de 0,25% em relação ao volume de equivalência esperado e desvio padrão de 0,0369. Este resultado mostra que o erro relativo e desvio padrão da titulação ácido base com base no volume de equivalência esperado, usando o sistema de titulação potenciométrica, estão dentro de valores aceitáveis.

3.4 Titulação potenciométrica utilizando ácido cítrico como referência

Utilizando o sistema proposto foi feita uma titulação com $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 0,01 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹, tendo como base o trabalho de Godinho (1987), modificando apenas a concentração do ácido usada pelo autor de 0,003 mol.L⁻¹ para uma concentração mais concentrada de 0,01 mol.L⁻¹ com objetivo de visualizar o erro de titulação e determinar os grupos funcionais utilizando da função de Gran. Para a validação do método também foram feitos os experimentos com bureta digital, bureta volumétrica e bomba peristáltica, os resultados estão exibidos na Tabela 4. A Figura 2 mostra o comportamento da curva de titulação e os três grupos carboxílicos determinados.

Tabela 4. Comparação das titulações potenciométrica de $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 0,01 mol L⁻¹ e NaOH 0,1 mol L⁻¹

Métodos	Volume Médio (mL)	Volume esperado (mL)	Erro Relativo (%)	Desvio
Bureta digital	6,23	6,1601	1,17	0,0375
Bureta volumétrica	6,16	6,1601	0,10	0,0577
Sistema com fluxo contínuo	6,1072	6,1601	0,86	0,0001

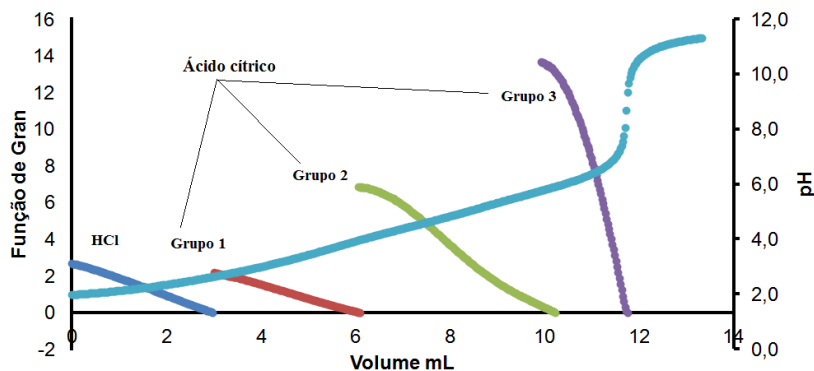


Figura 2. Função de Gran e curva de titulação de ácido cítrico.

Os resultados obtidos na titulação com $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 0,01 mol L⁻¹ com NaOH 0,1 mol L⁻¹ (Tabela 4), determina um erro relativo de 0,86 % do sistema desenvolvido nesse trabalho sendo um bom resultado comparado com o método da bureta digital como dispersor do titulante que foi de 1,17 %, ficando apenas maior do que o erro da bureta volumétrica (0,10 %). O desvio obtido com o sistema proposto foi de 0,0001, sendo esse o menor desvio entre os dispersores do titulante testados. Assim sendo, o sistema apresenta boa precisão e excelente exatidão quando comparado às esses dois equipamentos.

3.6 Determinação dos grupos funcionais de Substância húmica aquática (SHA)

Foram feitas algumas titulações de SHA (0,005 g L⁻¹) obtendo curvas de titulação e não foi possível determinar os grupos funcionais do analito pela Função de Gran Modificada devido a baixa concentração utilizada. Novas titulações de SHA foram preparadas modificando a concentração para 2 g L⁻¹, atingindo o ponto de equivalência em 3,725 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹, e mesmo assim não foi possível a determinação dos grupos funcionais das SHA pelas Funções de Gran Modificadas. Os resultados experimentais são aplicados em planilhas do programa Excel® para determinação matemática da função

de Gran modificada e ainda é necessário fazer pequenas modificações nos algoritmos da planilha que até a confecção desse relatório ainda estão sendo realizadas.

4. Conclusão

O sistema proposto é de fácil montagem, tem custo operacional baixo e automatizado quando comparado com tituladores automáticos e mostrou-se bastante robusto como dispersor do titulante. Fazendo a comparação entre a bureta digital e volumétrica foi a que apresentou menor desvio 0,0001 e mostrou um erro relativo de 0,86%. É necessário ter bastante cuidado quanto às condições do eletrodo do pHmetro, pois este pode induzir a erros, sendo assim necessário fazer o procedimento de calibração utilizando as soluções padrões diariamente. É necessário fazer uma aferição dos volumes adicionados antes de cada titulação pesando-se o volume adicionado pelo sistema utilizando uma balança analítica e se necessário fazer o ajuste do tempo de abertura de válvula para o volume desejado. É aconselhável fazer a aferição pelo menos cinco vezes utilizando a média como volume adicionado.

5. Referências Bibliográficas

- Abbt-Braun, G. 1992. *Spectroscopic characterization of humic substances in ultraviolet and visible region and by infrared spectroscopy*. Springer-Verlag.
- Aleixo, L.M.; Godinho, O.E.S. 1987. Discussão sobre o uso de funções de Gran modificadas em titulações potenciométricas ácido-base. Aplicação a titulação da mistura de ácidos clorídricos e cítricos com base forte. *Química Nova*, 10: 83-90.
- Haider, K.; Spiteller, M.; Reichert, K.; Fild, M. 1991. Derivatization of humic compounds: an analytical approach for bound organic residues. *Intern. J. Environ. Anal. Chem*, 46: 201-211.
- Masini, J.C.; Godinho, O.E.S.; Aleixo, L.M. 1998. Determination of ionizable groups of proteins by potentiometric titration in concentrated solutions of guanidine hydrochloride. *Fresenius J. Anal. Chem*, 360: 104-111.
- Perdue, E.M. 1988. Measurements of binding site concentrations in humic substances. In: Kramer, J.R. & Allen, H.E. (Eds). *Metal speciation: theory, analysis and application*. Lewis Publishers, Inc. Chelsea USA. 135-154.
- Rocha, J.C.; Sargentini Jr, É.; Zara, L.F.; Rosa, A.H.; Santos, A.; Burba, P. 2000. Reduction of mercury (II) by tropical river humic substances (Rio Negro) – A possible process of the mercury cycle in Brazil. *Talanta*, 53: 551-559.
- Toscano, I.A.S. 1999. *Influência das substâncias húmicas aquáticas na determinação de atrazina por imunoenensaio (ELISA)*. Tese de doutorado. Instituto de Química de Araraquara/ Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita filho – UNESP, Araraquara, São Paulo. 107pp.
- Thurman, E.M.; Malcolm, R.L. 1981. Preparative isolative of aquatic substances. *Environ. Sci. Technol*, 15: 463-466.
- Zara, L.F. 1997. *Estudo das interações entre Mn, Ni, Cu, Cd e Pb com ácido húmico aquático utilizando resina fosfato de celulose (FOSCEL)*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química Campus de Araraquara/ Universidade Estadual Paulista– UNESP, Araraquara, São Paulo. 84pp.