

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE MERCÚRIO EM SEDIMENTOS
E ÁGUAS DOCES EMPREGANDO OS PROCESSOS FLUXO-
BATELADA E MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO**

Oziel Ribeiro Marinho*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA
ANALÍTICA

Orientador: Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis

* Bolsista FAPESP

São Carlos – SP

2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Marinho, Oziel Ribeiro

Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação fotométrica de mercúrio em sedimentos e águas doces empregando os processos fluxo-batelada e multicomutação em fluxo / Oziel Ribeiro Marinho. -- 2019.

111 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador: Boaventura Freire dos Reis

Banca examinadora: Ana Rita de Araújo Nogueira, Pedro Sergio Fadini, Marcos Yassuo Kamogawa, José Roberto Ferreira

Bibliografia

1. Mercúrio. 2. Fotometria. 3. Multicomutação e Fluxo-batelada. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Oziel Ribeiro Marinho, realizada em 19/09/2019:

Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis
USP

Profa. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira
EMBRAPA

Prof. Dr. Pedro Sergio Fadini
UFSCar

Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa
ESALQ/USP

Prof. Dr. José Roberto Ferreira
CENA/USP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À minha amada Rosa,

Símbolo de paciência, compreensão e companheirismo sem você isso tudo seria difícil, mas do seu lado tornou-se realidade.

À minha grande família Ribeiro e Marinho por fazer parte dessa secular instituição aos quais dedico meu saber e minha vida.

Aos meus queridos pais Jonilson e Fátima (in memória), que nos planos do altíssimo sonharam ter uma linda família e hoje compartilham desta grande conquista.

AGRADECIMENTOS

Ao Altíssimo Poderoso Deus pelo dom da vida.

À sociedade brasileira pelos impostos pagos que de forma direta e indiretamente foi retribuído em forma de recurso para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Boaventura Freire dos Reis pela orientação, apoio e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos belos momentos de descontração e regado de belas e inconfundíveis risadas, sua experiência de vida e trajetória profissional são fontes de inspiração.

Ao Prof. Dr. Marcos Yassuo Kamogawa, professor do departamento de química analítica da ESALQ/USP, pelo incentivo e por franquiar o uso do equipamento de CVAAS para as análises de referência.

Ao Prof. Dr. Jose Roberto Ferreira, pesquisador científico no Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, pelas sugestões quanto à metodologia de preparo de amostras para determinação de mercúrio.

Às secretárias da Pós-Graduação da UFSCar, Ariane, Cristina e Luciani pelo pronto atendimento aos trâmites burocráticos.

Ao CENA pela permissão de uso dos equipamentos e da infraestrutura do Laboratório de Química Analítica para a execução de toda parte experimental.

À técnica e amiga Sheila Roberta, pelas “dicas” relacionadas ao manuseio e cuidados com a vidraria e com o preparo cuidadoso das soluções e por toda ajuda proporcionada.

Ao amigo João Geraldo Brancalion, pela colaboração na produção das figuras deste trabalho.

A todos dos outros grupos e Laboratórios do CENA, especialmente à Cláudia Márcia de Freitas Corrêa (Secretária), Aparecida de Fátima Patreze e Liz (Técnicas), pelos momentos de convivência e de alegria.

Ao meu querido amigo Manoel pela cooperação no Laboratório e discussão dos experimentos.

Aos meus queridos pais, que com muito sacrifício, lutaram e sempre me incentivaram a estudar e a todo (as) irmão e irmãs que eu amo de coração.

Ao programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar pela oportunidade da realização deste trabalho.

Especial agradecimento:

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À FAPEAM: O presente trabalho foi realizado com bolsa de estudo concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – edital, n. 010/2015, processo, n. 062.00114/2016.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo biogeoquímico do mercúrio no meio ambiente. Reproduzido do artigo de revisão de Leopold (2010) [11]	2
FIGURA 2. Diagrama Eh-pH do sistema redox Hg-OH. Reproduzido de Takeno (2005) [23]	4
FIGURA 3. Esquema genérico de um sistema FIA em linha única. Tp= Transportador; Sp = Sistema de propulsão; Ij = Injetor; R = Reator; Det = Sistema de detecção; Dc = Descarte; Pd = Processamento de dados e A e t = Absorbância e tempo.....	13
FIGURA 4. Etapas de um sistema FIA genérico	14
FIGURA 5. Diagrama característico de um módulo de análise em fluxo baseado no processo de multicomutação. A = amostra; R ₁ e R ₂ = soluções de reagentes; C = transportador; B ₁ - B ₄ = bombas solenoide; x e y = confluências, Rt e Rs = reatores helicoidal; D = detector e Desc. = descarte. As superfícies sombreadas abaixo das linhas, indicam que a minibomba correspondente está ligada.....	15
FIGURA 6. Diagrama básico de um módulo de análise em fluxo-batelada. C ₁ - C ₄ , recipientes de amostra, reagentes; PP, bomba peristáltica; V ₁ - V ₅ , válvulas solenoide de 3 vias; MS, agitador magnético; MC, câmara de mistura/reação; MA, barra magnética; D, detector; W, descarte de resíduo	17
FIGURA 7. Representação genérica de um fotômetro baseado em LEDs	19
FIGURA 8. Vista superior de uma placa Arduino Due. 1 = botão reestabelecer (reset); 2 = porta de entrada USB; 3 = porta de entrada de programação USB; 4 = entrada de energia externa; 5 = controlador Atmel SAM3XE ARM córtex-M3; 6 = saída de 5 V; 7 = entradas analógicas; 8 = PWM de saída; 9 = porta serial de comunicação; 10 = botão apagar; 11 = pinos de entrada e saída digital	20
FIGURA 9. Vista da bomba de seringas. Sup = suporte de acrílico; Mp = motor de passo; Pa = parafuso (fuso) de tração; Cig = cilindros guias; Po = porcas; RI = mancal com rolamentos; g = suporte guia; Cn ₁ = conector da interface do motor de passo; P ₁ , P ₂ , P ₃ e P ₄ = placas de acrílico; Ch ₁ e Ch ₂ = chaves de interrupção; V ₁ , V ₂ e V ₃ = válvulas solenoides; S ₁ , S ₂ e S ₃ = seringas de vidro; P ₁ e P ₂ = barras de alumínio, espessura de 2 e 3 mm, respectivamente, Pc = placa de acrílico de 15 x 1,5 cm de comprimento e espessura, com canais para encaixe das seringas.....	25
FIGURA 10. Diagrama do sistema de amostragem. Plac = Placa de PVC; Sup = suporte em acrílico; Ra = Recipiente de amostra; Tu = tubos de silicone, Plb = placa de PVC; Cp = minicompressor de ar; e cn = conectores elétricos.....	27

- FIGURA 11. Vista da montagem da câmara de reação/extração. SP₁, SP₂ e SP₃ = suportes de acrílico; V = válvula solenoide; Hast = bastão de vidro para agitação (14 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro); Cam = Câmara de mistura; En = Entrada de fluido; Tap = Tampa; Int = interface de controle; Mt = motor de corrente contínua, Re = relés; Cn1 e Cn2 = conectores para as bombas de amostragem e de esvaziamento da câmara de extração; Cp = capacitor eletrolítico de 447 µF 28
- FIGURA 12. Diagrama do fotômetro. Det = fotodiodo OPT301; LED = díodo emissor de luz ($\lambda_{\max} = 485 \text{ nm}$); gc = cilindro de vidro (1,2 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento); fb = corpo da cela de fluxo (50 cm de comprimento e 1,2 diâmetro interno); tr = transistor BC547; S₀ = saída de sinal (mV); D = díodo (3,2 V); in e out = entrada e saída de fluido, respectivamente 29
- FIGURA 13. Diagrama do sistema de fluxo. P₁ e P₂ = minibombas, vazão 132 mL min⁻¹; Sv = frasco de amostra, tubo Falcon de 50 mL; Sc = câmara de separação; og = fase orgânica; aq = fase aquosa; Ct = cobertura de Teflon; Tc = tampa rosqueada; Mt = motor Dc; gr = bastão de vidro; Dtz = ditizona em clorofórmio; V₁, V₂ e V₃ = válvulas solenoides de três vias; S₁ e S₂ = seringa de vidro; Det = fotômetro; W₁, W₂ e W₃, = recipientes de resíduos; lfs₁ e lfs₂ = chaves ópticas (infravermelho); C₁, C₂,... e C₅ = terminais elétricos conectados como indicado na Fig. 14; C₆ = plugue conectado à linha PWM, Fig. 14 30
- FIGURA 14. Diagrama dos dispositivos eletrônicos de acoplamento ao Arduino Due. Cl₁, Cl₂ e Cl₃ = circuito integrado ULN2803; P₁ e P₂ = bombas; C₁, C₂, C₃, C₄ e C₅ = plugues elétricos para bombas P₁ e P₂, válvulas solenoides V₁, V₂ e C₃ (Fig. 13), respectivamente; C₆ = plugue PWM para o motor CC (Fig. 13); A₀, A₁ e A₂ = entradas analógicas do Arduino Due; S₀ = sinal do fotômetro (Fig. 13); S₀₁ e S₀₂ = sinais do sensor infravermelho (lfs₁ e lfs₂, Fig. 13), respectivamente; Ch₁ e Ch₂ = interruptores elétricos normalmente aberto, INi = interface para acionar o motor de passo; Gz = gerador de frequência; STp = barramento de controle do motor de passo 31
- FIGURA 15. Fluxograma do procedimento analítico 34
- FIGURA 16. Espectro absorção da ditizona (A) e do ditizonato de mercúrio (B). Concentração da solução padrão de Hg(II) 50 µg L⁻¹ e concentração ditizona 9 µmol L⁻¹, tanto a solução do ditizonato de mercúrio e da ditizona foram em clorofórmio 39
- FIGURA 17. Perfil do sinal transiente obtido em ELL em fluxo com detecção fotométrica. (a) referente ao branco; (b) 10 µg L⁻¹ de Hg²⁺; (1) sinal referente à passagem da fase aquosa; (2) sinal característicos às perturbações da interface das fases aquosa e orgânica; (3) sinal analítico, referente à passagem da fase orgânica contendo o analito extraído 40

- FIGURA 18. Estudo do meio ácido. (a) branco; (b) padrão de Hg ($5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e (c) padrão de Hg ($10,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Outros parâmetros: concentração de ditizona $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; acidez $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; tempo de extração e de separação 20 e 25 s, respectivamente 42
- FIGURA 19. Efeito da concentração dos ácidos. A curva (A) refere-se ao branco para ambos os ácidos, (B) refere-se a solução de Hg(II) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em ácido nítrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e (C) está relacionada com a soluções de Hg(II) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ em ácido sulfúrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Outros parâmetros foram: concentração da ditizona $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio, intervalos de tempo da reação e de repouso 20 e 25 s, respectivamente e velocidade da rotação da mistura, 4500 rpm 43
- FIGURA 20. Efeito do tempo de extração. Condição experimental: solução padrão de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e branco, ambas em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; volume da solução padrão 30 mL; tempo de separação 20 s e rotação da haste de mistura, 4500 rpm 44
- FIGURA 21. Efeito do intervalo de tempo de separação. Outras condições experimentais: solução padrão de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e do branco, ambas em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; volume da solução padrão 30 mL; tempo de extração 30 s e rotação da haste de mistura, 4500 rpm..... 45
- FIGURA 22. Efeito do volume da amostra. As curvas (A) e (B) correspondem à solução de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e do branco em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Outras condições experimentais: solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; tempo de extração e separação 30 e 20 s, respectivamente, e rotação de mistura 4500 rpm 46
- FIGURA 23. Efeito da concentração da ditizona. As curvas (A) e (B) correspondem à solução de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de íons Hg(II) e ao branco em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Outras condições experimentais: tempo de extração e separação (30 e 20 s) e rotação de mistura 4500 rpm 47
- FIGURA 24. Efeito do volume de clorofórmio. Condição experimental: soluções padrão de branco e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) em meio de H_2SO_4 a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e outros parâmetros como nas seções precedentes 48
- FIGURA 25. Curva analítica. ΔA = absorvância corrigida. Outros parâmetros: concentração de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 750 μL de clorofórmio; acidez de $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume da amostra 40 mL; tempo de agitação e separação 30 e 20 s; rotação 4500 rpm 49

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1. Métodos e técnicas para determinação de espécies mercuriais	6
TABELA 2. Solubilidade da ditizona em diferentes meios	10
TABELA 3. Sequência de execução da extração	35
TABELA 4. Parâmetros analíticos selecionados obtidos com otimização experimentais	49
TABELA 5. Efeito das espécies químicas potencialmente interferentes	50
TABELA 6. Resultados referentes à adição e à recuperação em amostras de águas minerais	51
TABELA 7. Resultados e comparações para amostras de águas de torneiras	52
TABELA 8. Resultados e comparações para amostras de águas de rio	53
TABELA 9. Comparação de desempenho	55
TABELA 10. Determinação de Hg ²⁺ na amostra certificada BCR-320R	57
TABELA 11. Resultados e comparações de concentrações de Hg em amostras de sedimentos	57

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE MERCÚRIO EM SEDIMENTOS E ÁGUAS DOCES EMPREGANDO OS PROCESSOS FLUXO-BATELADA E MULTICOMUTAÇÃO EM FLUXO: Este trabalho envolve o desenvolvimento de um módulo de análise baseado nos processos de multicomutação e fluxo-batelada, um fotômetro de LED (*light emitting diode*) e um procedimento analítico automático para a determinação de mercúrio em águas e sedimentos. O dispositivo foi projetado para explorar as facilidades obtidas pela associação da análise de fluxo-batelada e multicomutação, permitindo a implementação de uma estratégia versátil de extração por solvente e pré-concentração. O método é baseado na reação de Hg(II) com ditizona em meio orgânico (clorofórmico), utilizado como solvente orgânico de extração. O sistema de análise de fluxo foi constituído por um módulo de análise empregando bomba de seringa e bombas de aquário como propulsores de fluídos, um conjunto de válvulas solenoide e uma câmara de reação/separação (*Flow-batch*). O fotômetro construído para este trabalho é constituído por um diodo emissor de luz (LED, $\lambda = 485 \text{ nm}$), um fotodiodo e uma célula de fluxo com caminho óptico de 50 mm. O módulo de análise e o fotômetro foram controlados com um microcontrolador Arduino Due, equipado com as interfaces necessárias e executando um software escrito para este fim, em linguagem de programação C++. Após a seleção das melhores condições operacionais, a eficácia da proposta foi avaliada determinando mercúrio em águas de rios, abastecimento público, mineral e sedimentos. Visando à avaliação da exatidão, as amostras foram analisadas empregando um método independente. Também, foi empregada a metodologia de adição e recuperação. Nesse caso, os resultados mostraram recuperação na faixa de 92 a 108%. Outras características analíticas importantes tais como resposta linear na faixa de 0,5 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0,9984$); limite de detecção de 0,38 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) ($n = 10$); consumo de ditizona e clorofórmio de 0,18 mg L^{-1} e 800 μL por determinação, respectivamente; coeficiente de variação ($n = 10$) 2%; e taxa de amostragem de 20 determinações h^{-1} foram alcançadas.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL PROCEDURE FOR PHOTOMETRIC DETERMINATION OF MERCURY IN SEDIMENT AND DRINKING WATER EMPLOYING THE FLOW-BATCH AND FLOW MULTICOMMUTATION PROCESSES: This work deals with a multicommutated flow-batch setup and a photometric procedure for the determination of mercury in waters and sediments. The setup was designed to exploit facilities achieved by associating flow-batch and multicommutated flow analysis approaches, thus allowing the implementation of a versatile solvent extraction and pre-concentration strategy. The method was based on the reaction of Hg(II) with dithizone in chloroform medium, which was used as an extracting organic solvent. The flow analysis system was constituted by a homemade syringe pump module, a set of solenoid valves, two mini-pumps and a flow-batch chamber. The homemade photometer comprised a light emitting diode (LED), a photodiode and a homemade flow cell (50 mm long). The flow system and the photometer were controlled through an Arduino Due board, running a software written for this purpose. After selecting the better operational conditions, the effectiveness of the proposal was evaluated by determining mercury in waters. Aiming to accuracy assessment, samples were also analyzed employing an independent method. Accuracy was assessed using the spiking methodology and recovery ranging from 92 to 108 % was observed. Other profitable features such as a linear response ranging from 0.5 to 10.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($r = 0.9984$); a limit of detection of 0.38 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) ($n = 10$); consumption of dithizone and chloroform 0.18 mg L^{-1} , and 800 μL per determination, respectively; coefficient of variation ($n = 10$) 2%; and a sampling rate of 20 determinations h^{-1} were also achieved.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos importantes sobre o mercúrio	1
1.2. Espécies de mercúrio em ambiente aquático	3
1.3. Métodos de determinação de mercúrio	5
1.4. Aspectos gerais da ditizona	9
1.5. Procedimentos automáticos de análises.....	12
1.5.1. <i>Análises por injeção em fluxo (FIA).....</i>	<i>12</i>
1.5.2. <i>Multicomutação em análise em fluxo (MCFA).....</i>	<i>14</i>
1.5.3. <i>Análise em fluxo batelada (FBA).....</i>	<i>16</i>
1.5.4. <i>Diodo emissor de luz e seu uso em fotometria.....</i>	<i>18</i>
1.5.5. <i>Emprego do microcontrolador Arduino em análise em fluxo.....</i>	<i>19</i>
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos específicos.....	23
3. EXPERIMENTAL.....	24
3.1. Materiais.....	24
3.1.1. <i>Descrição do sistema de multicomutação e fluxo-batelada</i>	<i>24</i>
3.1.2. <i>Projeto do sistema de detecção e do módulo de análise.....</i>	<i>29</i>
3.2. Preparo dos reagentes e soluções	35
3.3. Coleta e preparo das amostras de águas	36
3.4. Digestão com água régia	37
4. RESULTADOS	38
4.1. Otimizações	38
4.1.1. <i>Considerações sobre a ditizona</i>	<i>38</i>
4.1.2. <i>Extração Líquido-Líquido em fluxo.....</i>	<i>39</i>
4.1.3. <i>Estudo da acidez do meio.....</i>	<i>41</i>
4.1.4. <i>Efeito da acidez</i>	<i>42</i>
4.1.5. <i>Efeito do tempo de extração</i>	<i>43</i>

4.1.6. Efeito do tempo de separação	44
4.1.7. Efeito do volume da amostra.....	45
4.1.8. Efeito da concentração da ditizona	46
4.1.9. Efeito do volume de clorofórmio.....	47
4.2. Desempenho analítico.....	48
4.3. Avaliação dos potenciais interferentes	49
4.4. Discussão dos resultados analíticos e comparação de desempenho.....	51
4.5. Determinação de Hg(II) em sedimentos	56
5. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos importantes sobre o mercúrio

O mercúrio é conhecido como um dos contaminantes que tem mérito relevante no contexto mundial. É encontrado no ar, no solo e na água, e pode ser transferido para os seres humanos por inalação, ingestão oral e através da pele. O mercúrio pode ser retido e acumular nos tecidos humanos, sobretudo no cérebro e nos rins [1]. Durante anos, o mercúrio amalgamado foi usado para facilitar a separação de ouro nas minas. O amalgama contendo ouro era aquecido a céu aberto, liberando grandes quantidades de mercúrio para a atmosfera. Neste processo, o mercúrio liberado na forma metálica contamina os rios e o solo. Rejeitos de mineração contaminados com mercúrio eram e ainda são deixados a céu aberto na maioria dos sítios de garimpo [2,3].

Este metal tem ampla aplicação industrial, incluindo a fabricação de termômetros, bombas de difusão, barômetros, lâmpadas para iluminação [4], pesticidas, baterias, produtos farmacêuticos, tintas, pigmentos e catalisadores [5]. O uso generalizado em diferentes atividades industriais, potencializa o risco de contaminação dos mananciais de águas doces, incluindo rios e lagos [Erro! Indicador não definido.].

O mercúrio pode ser encontrado naturalmente em várias formas: elementar (Hg^0), inorgânico (Hg^+ e Hg^{2+}) e orgânico (R-Hg^+), sendo este último o mais importante com relação à toxicidade [6,7]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, WHO*) [8], essas formas de mercúrio diferem em seu grau de toxicidade e em seus efeitos nos sistemas nervoso, digestivo e imunológico. Também, afeta os pulmões, os rins, a pele e os olhos. A Agência de Proteção Ambiental do Estados Unidos (*Environmental Protection Agency, EPA US*) [9], alerta para os efeitos dessas espécies mercuriais sobre as pessoas de todas as idades. Os possíveis sintomas de intoxicação por metilmercúrio podem incluir: perda de visão periférica, sentimentos de "alfinetadas ou agulhadas", geralmente nas mãos, pés e ao redor da boca, falta de coordenação motora, comprometimento da fala, da audição e dificuldade para caminhar, incluindo, também, fraqueza muscular.

Em ambientes aquáticos, o mercúrio pode sofrer transformações, envolvendo reações químicas complexas. Segundo a literatura, o mercúrio encontrado no ambiente, é consequência de processos físicos, químicos e biológicos formando

sistemas complexos, os quais não são completamente conhecidos pela ciência. Esse processo envolve volatilização, transporte, deposição, transformações químicas, e bioacumulação [10]. As espécies químicas de mercúrio (Hg^{2+} , Hg^+ , Hg^0 , metilmercúrio) apresentam alta mobilidade, como ilustrado no ciclo biogeoquímico global de mercúrio mostrado na FIGURA 1 [11,12].

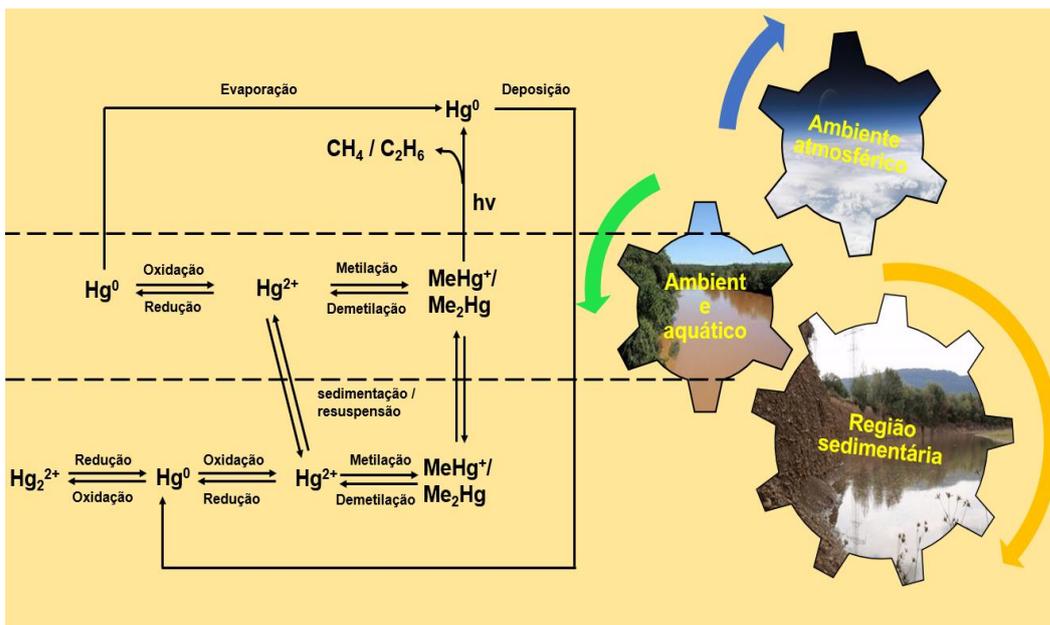


FIGURA 1. Ciclo biogeoquímico do mercúrio no meio ambiente. Reproduzido do artigo de revisão de Leopold (2010) [12]

A espécie mais impactante no cenário mundial, devido à alta toxicidade, é o metilmercúrio (MeHg^+). Vários casos de contaminação envolvendo esta espécie mercurial foram descritas na literatura: Minamata no Japão (1956) [13], Iraque (1971) [14], Canadá (1972-1992) [15], África e Filipinas [16], Ásia e América Latina (Amazônia) [17].

A bioacumulação de Hg ocorre na água e no sedimento FIGURA 1, e tem sido o norte de várias pesquisas [18,19], visando auxiliar na compreensão dos fatores poluentes e a contaminação de seres vivos, inclusive humanos. Conforme exemplificado na FIGURA 1, na atmosfera, o mercúrio encontra-se na forma de vapor (Hg^0), sendo oriundo da degaseificação natural da crosta terrestre, erupções vulcânicas, evaporação dos oceanos e do solo [12]. Fontes antropogênicas como as indústrias e a mineração tem contribuído para aumento significativo deste contaminante no ar [20].

As emissões e transporte de Hg da água para a atmosfera e a deposição água/sedimento, dependem de vários fatores, incluindo a forma química do Hg emitido, as características dos locais, a topografia, e a meteorologia. O Hg^0 como gás monoatômico, é quimicamente estável, pode permanecer na atmosfera cerca de 1 ano, e em vista disso, pode ser globalmente distribuído. A forma neutra transforma-se na forma inorgânica solúvel em água ($\text{Hg}^0 \rightarrow \text{Hg}^{2+}$) [21]. A forma inorgânica é devolvida à superfície terrestre com a água de chuva, podendo por este meio seguir dois caminhos distintos: redução à forma de vapor retornando à atmosfera; metilação por ação de microrganismos presentes nos rios, lagos e oceanos [21].

A forma CH_3Hg^+ ao entrar na cadeia alimentar aquática afeta o plâncton, e em consequência, afeta os peixes herbívoros, os peixes carnívoros (predadores) e os mamíferos marinhos, chegando ao homem que é último elo da cadeia alimentar [21].

1.2. Espécies de mercúrio em ambiente aquático

Além do mercúrio elementar (Hg^0), também no ambiente aquático, está presente em dois níveis de oxidação (Hg^+ , Hg^{2+}). A natureza das espécies químicas de Hg e as reações envolvidas, determinam a solubilidade, a mobilidade, e a toxicidade em ecossistemas ambientais [19,22]. O mercúrio na forma elementar (Hg^0) ocorre em águas superficiais, principalmente, a partir da redução de Hg^{2+} FIGURA 1, causada por microrganismos aquáticos, pela redução abiótica por substâncias húmicas, decomposição de formas orgânicas, e por interferência antrópicas [19]. O mercúrio elementar é estável sob condições levemente oxidantes ou redutoras, mas pode ser oxidado para Hg^{2+} , particularmente na presença de íons cloreto. O mercúrio de carga monovalente Hg^+ , só é estável como um dímero de carga divalente (mercúrio mercurioso, Hg_2^{2+}) em solução aquosa. Pesquisas, mostram que os complexos de Hg não carregados, provavelmente são mais fáceis de serem metilados por bactérias, como descritos nos trabalhos de Celo (2006) [22] e Lehnerr (2014) [23].

A forma química de espécies mercuriais em sistemas aquáticos (rios, lagoas, pântanos e mares), é fortemente influenciada pelas reações redox (Eh) e condições de pH, bem como por agentes complexantes inorgânico e orgânico. A FIGURA 2 mostra um sistema redox de $\text{Hg}^{2+}/\text{Hg}_2^{2+}/\text{Hg}^0$, tendo em conta a possível presença de $\text{HgO}_{(s)}$ [24]. A espécie Hg_2^{2+} atua como oxidante para Hg^0 , e nesse

processo, o mercúrio elementar (Hg^0) age como espécie redutora de Hg^{2+} , como pode ser observado na reação de dismutação: $\text{Hg}^0 + \text{Hg}^{2+} \rightarrow \text{Hg}_2^{2+}$ [24]. Esta reação ocorre na presença de Hg^0 ou Hg^{2+} , onde no mesmo ambiente da reação pode simultaneamente ser oxidado e reduzido.

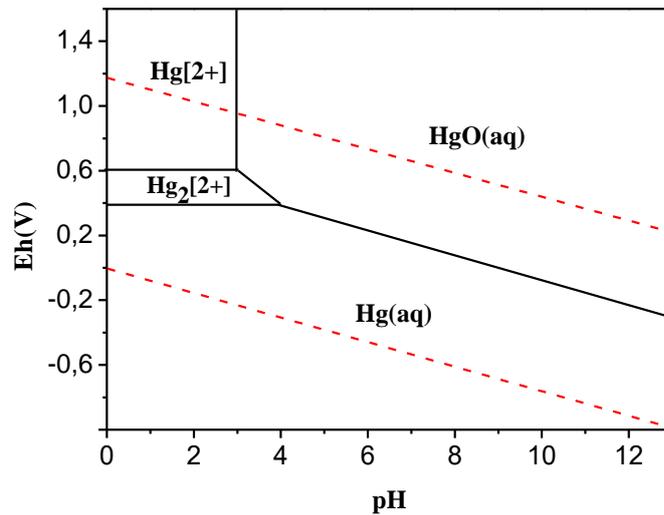


FIGURA 2. Diagrama Eh-pH do sistema redox Hg-OH. Reproduzido de Takeno (2005) [24]

O diagrama da FIGURA 2 mostra que óxido de mercúrio (HgO), pode ser moderadamente solúvel ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e geralmente é encontrado em ambientes contaminados [25]. Em sedimentos da lama da baía de Minamata foram encontrados, principalmente na forma de sulfetos e de óxidos [26].

O sedimento é considerado um importante local para o acúmulo de mercúrio e outros microelementos. Na parte interna de ambientes aquáticos, os sedimentos de fundo contaminados com mercúrio pode se associar às partículas e seus suportes geoquímicos orgânicos e inorgânicos, tais como carbonatos, óxidos e hidróxidos de Al, Fe e Mn, matéria orgânica e sulfetos, ou na água intersticial, como matéria orgânica dissolvida e/ou coloidal, bem como fosfatos [27]. A matéria orgânica e o mercúrio inorgânico Hg^{2+} em baixo pH podem ser metilados em mercúrio orgânico CH_3Hg . Esta espécie mercurial pode ser bioacumulada em peixes, crustáceos e moluscos piscívoros [28]. De acordo com Organização Mundial de Saúde (WHO) [29], a principal fonte de exposição humana ao mercúrio orgânico (metilmercúrio) é através do consumo de peixe, porque geralmente mais de 85% do mercúrio total está na forma de metilmercúrio, a espécie mais tóxica.

Desta forma, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) [30] estipula que o limite para material dragado é $0,18 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg. As diretrizes internacionais de qualidade de sedimentos do Centro de Meio Ambiente, Pesca e Aquicultura (CEFAS UK) [31], classifica o material dragado como nível 1 e nível 2, as concentrações de $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ e $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg, respectivamente. O Centro de Estudos e Experimentação de Obras Públicas (CEDEX Espanha) [32], classifica como nível 1 e nível 2 as concentrações de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ e $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg, respectivamente. As diretrizes canadenses da qualidade de sedimentos para a proteção da vida aquática [32], determinam um limite de $0,17 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg. No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) [33], estabelece que os limites para material dragado de água doce classe I e II são $0,17$ e $0,486 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg, respectivamente, e para material dragado de águas salinas classes I e II os limites são ($0,3$ e $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$), respectivamente.

Neste tipo de matriz, o preparo da amostra e as técnicas de detecção precisam ser robustos e que não causam grandes perca do analito e precisão na determinação de Hg. Nesse sentido, várias técnicas de detecção têm sido empregadas para a determinação de Hg(II) em amostras de sedimentos, dentre as mais usuais podemos citar a espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CVAAS) [34], a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) [35], e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [36]. A detecção por espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CVAFS), tem como vantagem em relação as citadas antes o uso de instrumentação de menor custo, e alcança limite de detecção ser mais simples e limites de detecção da ordem de $0,5 \text{ ng g}^{-1}$ de Hg [37]. As outras técnicas citadas, quando otimizadas para determinação de mercúrio, podem alcançar limites de detecção na faixa de ng L^{-1} .

1.3. Métodos de determinação de mercúrio

Em virtude da importância do mercúrio em meio aquático, métodos para sua determinação têm sido implementados, empregando as seguintes técnicas de detecção: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [38,39,40]; espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CVAAS) [41]; espectrometria de fluorescência atômica com vapor frio (CVAFS) [42]; espectroscopia de emissão atômica (AES) [43]; espectrofotometria UV-Vis [44].

A CVAFS é a mais usada devido à alta sensibilidade e além disso, emprega equipamento de custo moderado.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) [45,46], recomenda o uso de espectrometria de fluorescência atômica de vapor frio (CVAFS) como técnica de detecção para monitorar mercúrio total (HgT) e metilmercúrio (MeHg⁺) em águas, o qual pode apresentar limites de detecção de 0,2 ng L⁻¹ e 0,02 ng L⁻¹. Na TABELA 1 estão listados procedimentos para a determinação de mercúrio em diferentes tipos de amostras, empregando diferentes técnicas.

TABELA 1. Métodos e técnicas para determinação de espécies mercuriais

Analito	Matriz	Deteção	Limite de deteção	Ref.
CH ₃ Hg ⁺ , Hg ²⁺	Solos, Sedimentos	CVG-ICP-MS	30, 51 ng g ⁻¹	[38]
CH ₃ Hg ⁺	Água natural rica em substância húmica	GC-ICP-MS	0,05 ng L ⁻¹	[39]
H ₃ Hg ⁺ , Hg ²⁺	Água potável	HPLC/ICP-MS	4,6 ng L ⁻¹ , 5,2 ng L ⁻¹	[40]
Hg ²⁺	Água natural	FI-CV-AAS	27 ng L ⁻¹	[41]
Hg ²⁺	Folhas de plantas, baterias e pastilhas medicinais	FI-HG-ICP-AES	10 µg g ⁻¹	[43]
Hg ²⁺	Peixes	CVG-AFS	0,33 ng g ⁻¹	[42]
Hg ²⁺	Água natural	UVG-AFS	0,08 ng L ⁻¹	[47]
Hg ²⁺	Água de rio	UV-FIAS- AFS	0,14 ng L ⁻¹	[48]
Hg ²⁺	Água de torneira, rio e mineral	SPE-Fluorimétrico	0,08 µg mL ⁻¹	[49]
Hg ²⁺	Água mineral e de rio	DLLME-UV-Vis	3,9 µg L ⁻¹	[50]
Hg ²⁺	Água mineral, torneira e lagoa	µPAD-Colorimétrico	0,003 mg L ⁻¹	[51]

Recentemente, pesquisas usando nano partículas de ouro (AuNPs) tem sido implementada para a determinação de mercúrio em águas, empregando deteção espectrofotométrica. Os autores descrevem que a faixa de resposta linear foi de 16,4 a 250,7 µg L⁻¹ de Hg²⁺, e o limite de deteção 7,4 µg L⁻¹ [52]. Outros pesquisadores usaram nano partículas de prata (AgNPs) e o composto foi monitorado em 420 nm. O limite de deteção foi da ordem de 170,5 µg L⁻¹ de Hg²⁺ [53]. Os procedimentos tinham como inovação o emprego de nanopartículas, entretanto não alcançaram o limite máximo da concentração de Hg²⁺ aceito para águas potáveis, estabelecido pelos órgãos de regulação EPA, WHO e ANVISA [54,55,56].

Os métodos eletroquímicos também têm sido empregados para a determinação de mercúrio, usando nano partículas como meio de imobilização sobre o eletrodo [57]. Os limites de detecção destes métodos podem chegar a $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, que é o valor limite estipulado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA) para íons de Hg^{2+} em águas potáveis, entretanto não alcança a concentração limite estabelecida pela Organização Mundial de Saúde que é $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ [55].

Empregando cromatografia líquida e gasosa, é possível fazer especiações de espécies mercuriais, o que tem importância para estudo ambiental. Em matrizes aquosas tem sido determinado mercúrio total (t-Hg) [58], mercúrio inorgânico (i-Hg) [59], espécies organomercuriais como metilmercúrio, dimetilmercúrio, etilmercúrio e fenilmercúrio (o-Hg) [60], e mercúrio reativo [61].

O método empregando espectrometria de absorção atômica (AAS) como técnica de detecção, é considerado simples e baseia-se na absorção da radiação eletromagnética pelos átomos de mercúrio em $253,65 \text{ nm}$ [62]. O mercúrio elementar é volátil, e em vista disso, pode ser determinado sem a utilização de chama para atomizá-lo. Neste processo, os íons do metal são primeiramente reduzidos à forma elementar e transportados por um gás inerte até o caminho óptico do detector, onde os átomos no estado de oxidação Hg^0 , absorvem radiação eletromagnética oriunda da fonte de emissão (lâmpada de cátodo oco) do equipamento, e a variação do sinal gerado apresenta uma relação com a concentração do analito. Este método não utiliza chama, então é denominado de absorção atômica com vapor frio (CVAAS). Esta técnica de detecção é recomendada pela EPA [63] para a determinação de mercúrio em águas potáveis e efluentes.

Visando melhorar o limite de detecção e também a separação da matriz, procedimentos analíticos tem sido implementados incluindo etapas de separação/pré-concentração, empregando as seguintes metodologias: micro coluna com resina quelante do tipo amino-isopropilmercaptano com um esqueleto de polioéster (YPA₄) [64]; pré-concentração sobre sílica (C18 modificada) [65,66]; extração em ponto nuvem usando tensoativos [67,68]; microextração em uma única gota (*single-drop* - SDME), usando solvente orgânico; e micro extração em fase sólida (MSPE) usando sílica como adsorvente magnetizado com tiol-modificado [67,69]. Neste trabalho, os autores descrevem um método para pré-concentração de metilmercúrio e mercúrio inorgânico em amostras de águas [65,66]. Os analitos

complexados com ditiocarbamato de pirrolidina de amônio (APDC), foram retidos em uma coluna de sílica (C18), a detecção foi realizada por espectrometria de absorção atômica de vapor frio (CVAAS), e alcançaram limites de detecção de 0,96 e 0,25 ng L⁻¹ para metilmercúrio e Hg²⁺, respectivamente. As técnicas de detecção foram espectrofotometria UV-vis e espectrometria de absorção atômica com vapor frio [69].

Trabalho proposto empregando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) como técnica de detecção para determinação de Hg em amostras de águas, baseado na extração em ponto nuvem, usando 3'-nitrobenzaldeído tiossemicarbazona (3-NBT) como agente complexante e o surfactante Triton X-114 [66] como extrator, alcançou limite de detecção de 11 µg L⁻¹ de Hg²⁺. Mesmo usando um processo de extração que permite obter pré-concentração do analito e um equipamento sofisticado, o limite de detecção não alcançou o valor estabelecida pela WHO, que é de 1 µg L⁻¹ [7].

A fluorescência de raios-X (XRF), tem sido utilizada para a determinação de Hg²⁺ [70]. A reflexão total de fluorescência de raios-X também tem sido empregada para determinação de Hg²⁺. Neste caso, é gerado vapor Hg⁰ para separar da amostra, o qual é retido em substratos de quartzo revestido com paládio nanoestruturado, onde ocorre a formação da amalgama Hg-Pd. O limite de detecção para este procedimento foi de 54 ng L⁻¹. Esta estratégia permite realizar a pré-concentração de Hg²⁺. A geração fotoquímica de vapor em fluxo contínuo foi acoplada à fluorescência de raios-X, tornou esta detecção ultra-sensível para determinação de Hg²⁺ [71]. A estratégia requer presença de ácido acético como precursor da redução das espécies de mercúrio. Neste trabalho, os autores chegaram a um limite de detecção de 0,001 µg L⁻¹ de Hg²⁺. A sensibilidade e o limite de detecção para Hg²⁺ foram melhorados em comparação com outras abordagens relatadas na literatura.

Métodos fluorimétricos propostos usam a estratégia de separação e pré-concentração de mercúrio em amostras de água por extração em ponto nuvem, em meio constituído por um líquido iônico, e o limite de detecção alcançado foi de 80 µg L⁻¹ [49].

As técnicas eletroanalíticas, também têm sido utilizadas para a determinação de mercúrio, e apresentam vantagens tais como: equipamentos de baixo custo, boa sensibilidade e seletividade; e no caso da redissolução anódica e catódica, a capacidade de detecção multielementar. A maior parte dos trabalhos publicados para a determinação de mercúrio, enfoca a especiação na forma

inorgânica. Esses trabalhos envolvem melhoramento o tipo de eletrodo. Por exemplo: uso de eletrodos de ouro impressos (*screen-printed* - SPGEs) [72]; voltametria de redissolução anódica de onda quadrada (SWASV) em eletrodos comerciais de carbono modificado com nanopartículas de ouro impresso (AuNPs-SPCEs) [72]; voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial (DPASV) em eletrodos de pasta de carbono modificados com fosfato impregnados com partículas de paládio (Pd-NP-CPE) [73]; eletrodos de carbono nanoestruturado (SPCnAuEs) combinados com microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); e formação de líquido iônico (IL) *in situ*, seguido de extração-inversa em microvolume [74]. Esses métodos podem apresentar limites de detecção na faixa de 0,8 - 1,1 ng L⁻¹.

Os métodos espectrofotométricos é uma alternativa para a determinação de íons Hg²⁺, apresentam como vantagens equipamentos de baixo custo, boa reprodutibilidade e boa faixa de resposta linear. E para isso, tem sido empregadas etapas de separações e pré-concentração, tais como microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), usando líquido iônico (IL) e (bis (trifluorometilsulfonil) imida de 1-hexil-3-metilimidazólio) como solvente extrator dissolvido em acetona como dispersor, complexado com 4,4'-bis(dimetilamino) tiobenzofenona (TMK) na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) como o agente antiaderente [50]. Extração em ponto nuvem com uso de surfactante não-iônico (Triton X-114) para extrair Hg²⁺ em soluções aquosas, baseado na reação de complexação de Hg²⁺ com (TMK) e na extração mediada por micelas do complexo [68]. Extração com eletromembrana (EME) e bis-(2-etilhexil)-fosfato como o extrator em 1-octanol 2% v/v, usando 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) como agente complexante, também foi usada para determinação de Hg em amostras de águas e de peixes [75].

A extração líquido-líquido clássica, utilizando um solvente orgânico como extrator, tem sido utilizada para pré-concentração de Hg²⁺ em meio aquoso, usando a 1,5-difeniltiocarbazona (ditizona) como reagente quelante. A ditizona é praticamente insolúvel em água, mas é um dos reagentes mais usados para a determinação fotométrica de mercúrio, e será usada neste trabalho.

1.4. Aspectos gerais da ditizona

A difeniltiocarbazona (ditizona) é um reagente quelante, o qual foi desenvolvido em 1925 por H. Fischer, como descrito por Irving (1961) [76]. Este reagente tem habilidade de complexação com vários íons metálicos. Em função de

suas propriedades tem sido utilizado para realizar etapas de separação e pré-concentração em procedimentos analíticos [77]. A ditizona reage com vários metais e forma complexos intensamente coloridos. É conhecido dois sítios para coordenação com um metal, seja pelo enxofre ou, pelos átomos nitrogênio [76].

Este composto ganhou importante lugar na química analítica, porque forma complexos coloridos com vários íons metálicos, incluindo mercúrio, e permite corrigir a seletividade controlando a acidez do meio. Entretanto, é de fundamental importância analítica considerar a solubilidade da ditizona em solventes orgânicos e seu comportamento em sistemas de extração bifásica. No trabalho de Irving [78], é descrito que maior solubilidade é alcançada em parafinas cloradas, como CHCl_3 e CH_2Cl_2 , seguidas pelos hidrocarbonetos aromáticos. A ditizona é praticamente insolúvel em água e pouco solúvel em álcoois, cetonas, hidrocarbonetos parafínicos e alicíclicos.

As soluções de ditizona tem coloração intensa, mesmo em baixas concentrações. A solubilidade da ditizona a 20 °C, em diferentes solventes é apresentada na TABELA 2 [79]. Observa-se que a ditizona é praticamente insolúvel em água, mas facilmente solúvel em meio alcalino ($\text{pH} > 7$).

TABELA 2. Solubilidade da ditizona em diferentes meios

Solvente	pH	Solubilidade (g L⁻¹)
Clorofórmio	10,6	17,6
O-diclorobenzeno	9,37	1,7
Benzeno	9,10	1,4
Tolueno	8,97	1,0
Tetracloroeto de carbono	8,8	0,5
Ciclohexano	7,42	0.014
Hexano	7,04	0,02
Água	<7	0,00005

A reação da ditizona com diferentes íons metálicos depende da concentração de íons hidrogênio do meio, da concentração do reagente, e pode depender da valência do íon metálico [80]. Os complexos formados com ditizona (ditizonatos) obedecem à lei de Bougher-Lambert-Beer, o que potencializa seu uso como reagente cromogênico em procedimentos espectrofotométricos. Em meio ácido com $\text{pH} \approx 1$, a constante de distribuição da ditizona é $1,1 \times 10^4$ em tetracloroeto de

carbono e 2×10^5 em clorofórmio [81]. E, portanto, espera-se que os coeficientes de partição dos ditizonatos de metais não carregados também sejam muito altos. Ditizona em soluções de etanol, acetona e clorofórmio expostas a luz intensa se decompõem rapidamente, e também em temperaturas acima de 35 °C [82]. Agentes oxidantes fortes destroem a ditizona, portanto devem ser neutralizados antes de um procedimento de extração, e para esta finalidade, tem sido usados hidroxilamina, hidrazina ou ácido ascórbico [82].

A baixa solubilidade da ditizona em água, permite o uso para extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*, LLE). A mistura do solvente orgânico com a amostra aquosa é promovida por agitação, e a formação de bolhas ou gotas do solvente orgânico, aumenta a superfície de troca, favorecendo a partição do complexo do analito entre as fases orgânica e aquosa [83,84].

Baba et al. [85] usaram ditizona em querosene para extração e purificação de cobre em licor de lixívia de licopirita nigeriano. Segundo os autores, aproximadamente 93% de Cu(II) foi extraído, usando $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de ditizona em querosene em pH 4,25. Halili et al. [86] estudaram o desempenho da ditizona como reagente complexante para a extração supercrítica em CO₂ dos metais pesados em soluções aquosas. Esse estudo afirma que a eficiência de extração, em três diferentes tempos de operação (30, 60 e 120 minutos) varia de 61% a 73% para Cu; de 78% a 87% para Zn e de 70% a 82% para Cd em valores fixos de pressão e temperatura (P = 120 bar e T = 50 °C) [86].

A extração líquido-líquido (LLE) é uma importante ferramenta em química analítica, pois permite alcançar dois objetivos em uma única ação: a separação da matriz da amostra e a pré-concentração da espécie química de interesse. A separação da matriz permite minimizar a interferência de íons concomitantes e a pré-concentração promove a melhoria da sensibilidade do método. Entretanto, a realização de forma manual é muito morosa e pode expor o executor ao solvente usado. Em vista disso, a disponibilidade de procedimento automático seria de primordial importância, pois pode melhorar a produtividade analítica, e aumentar a segurança do operador, e é o propósito deste trabalho.

1.5. Procedimentos automáticos de análises

A demanda por análise de muitas amostras, incluindo a determinação de várias espécies químicas, impõe o uso de procedimentos analíticos automáticos. Um procedimento analítico automático permitir que todo o processo analítico seja concluído sem intervenção do analista, também deve ser capaz, por si só, decidir se as condições de operação devem ser alteradas em resposta aos resultados obtidos [87,88].

Dentre os processos de automação disponíveis, a análise por injeção em fluxo (*flow injection analysis*, FIA) se destaca pelas seguintes características: pode ser implementada com equipamento de baixo custo; é um sistema processamento de amostra pré-deteção; pode ser hifenada com equipamentos baseados em diferentes técnicas de detecção, e é um ambiente fechado que minimiza o risco de contaminação. Este processo será empregado neste trabalho para desenvolver o procedimento analítico proposto.

1.5.1. Análises por injeção em fluxo (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA), é um processo analítico adequado para realizar análises *on-line* de maneira automática e é altamente eficiente para minimizar o consumo de reagentes e de amostras, bem como o tempo de análise e os custos associados [89,90]. Um sistema FIA FIGURA 3, baseia-se na injeção (inserção) de uma alíquota de amostra líquida em um fluído transportador, o qual a desloca através do percurso analítico. É definido como percurso analítico, o espaço percorrido pela amostra do ponto de inserção até o detector. Durante o deslocamento através do percurso analítico, a amostra é dispersada no fluído transportador. Em geral, a solução do reagente é adicionada por confluência em um ponto do percurso analítico e ao misturar com uma solução do reagente em uma bobina de reação (reator), ocorre a reação química. Em seguida, é transportada em direção a um sistema de detecção, o qual registra continuamente as mudanças na absorvância (sinal transiente em função do tempo). O valor máximo é diretamente proporcional à concentração do analito.

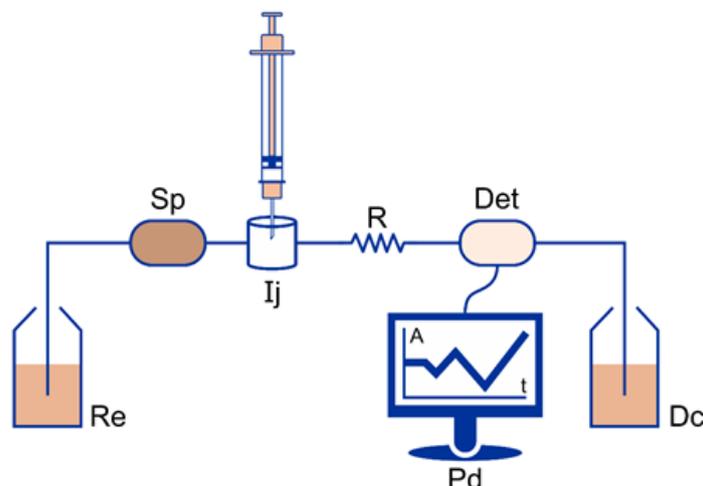


FIGURA 3. Esquema genérico de um sistema FIA em linha única. Re = Reagente; Sp = Sistema de propulsão; Ij = Injetor; R = Reator; Det = Sistema de detecção; Dc = Descarte; Pd = Processamento de dados e A e t = Absorbância e tempo

Em trabalho usando o processo FIA, Chaneam et al. [91] determinaram ureia e creatinina simultaneamente em urina humana. O sistema foi implementado com dois detectores, sendo um condutométrico e outro fotométrico. Uma característica importante neste caso foi o sistema de detecção [91], em que um dos detectores foi construído com uma cela de detecção condutométrica em fluxo sem contato, comumente conhecida como detector de condutividade sem contato acoplado capacitivamente (C4D) e o detector fotométrico foi baseado no conceito “*paired emitter detector diodes*” (PEDD) em que um LED é polarizado como fonte de radiação e o outro como fotodetector.

Uma característica fundamental de um sistema FIA, é que todas as condições operacionais são reprodutíveis, a dispersão é facilmente controlada, então as amostras e as soluções padrão são processadas da mesma maneira. O FIA pode ser considerado uma estratégia analítica que consome pequena quantidade de amostra e de reagentes [92], e em consequência gera pequeno volume de resíduo por ensaio. Na FIGURA 4 é mostrado as principais fases do processo FIA.

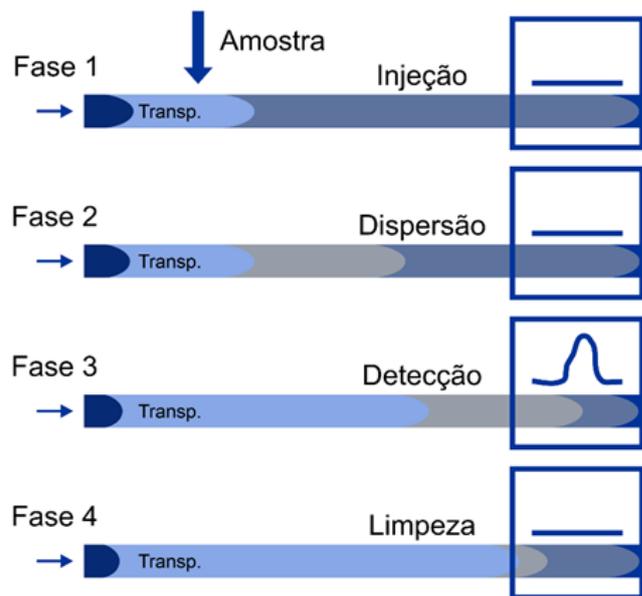


FIGURA 4. Etapas de um sistema FIA genérico

Algumas técnicas de detecção tem sido empregadas com sucesso em sistemas FIA para determinação e especiação de mercúrio, por exemplo, podemos citar os seguintes procedimentos: digestão de mercúrio orgânico “em linha” combinado com espectrometria de fluorescência atômica (AFS) para especiação de mercúrio [93]; pré-concentração com enriquecimento em nano adsorvente à base de sílica mesoporosa funcionalizada com 1,5-bis(2-piridil) metileno tiocarbohidrazida para especiação de mercúrio, empregando ICP-MS como técnica de detecção [94]; e voltametria de redissolução anódica (FS-ASV) [95].

1.5.2. Multicomutação em análise em fluxo (MCFA)

Em 1994 começaram os primeiros procedimentos analíticos empregando módulos de análise baseados no conceito de multicomutação em análise em fluxo (MCFA) [96]. Uma característica geral da análise por injeção em fluxo, é que cada solução (fluido transportador e reagentes), requer um canal de bombeamento. A multicomutação compreende um sistema de fluxo, constituído com comutadores discretos e controlados por computador, e várias soluções podem ser inseridas no percurso analítico, usando apenas um canal de bombeamento. Todas as etapas envolvidas no processamento das amostras, podem ser implementadas independentemente [97]. Os sistemas de fluxo podem ser reconfigurados pelo

software de controle, apresentando assim maior versatilidade, potencial de automação e minimização do consumo de reagentes e geração de resíduos [97,94].

Na FIGURA 5 é mostrado o diagrama de um módulo de análise baseado no processo de multicomutação em análise em fluxo. Este módulo de análise é composto por 4 minibombas solenoide, as quais são responsáveis pela propulsão dos fluidos: amostra, a solução transportadora e a solução do primeiro reagente. Em seguida outra minibomba solenoide insere a solução do segundo reagente. A mistura da alíquota da amostra com as soluções dos reagentes ocorre durante o transporte através dos reatores R_t e R_s , respectivamente. A leitura do sinal analítico é realizada durante a passagem da zona da amostra através da cela de fluxo do detector. Devido à dispersão da amostra no fluido transportador, forma um gradiente de concentração e o sinal gerado pelo detector varia em função do tempo. O valor máximo é diretamente proporcional à concentração do analito [98].

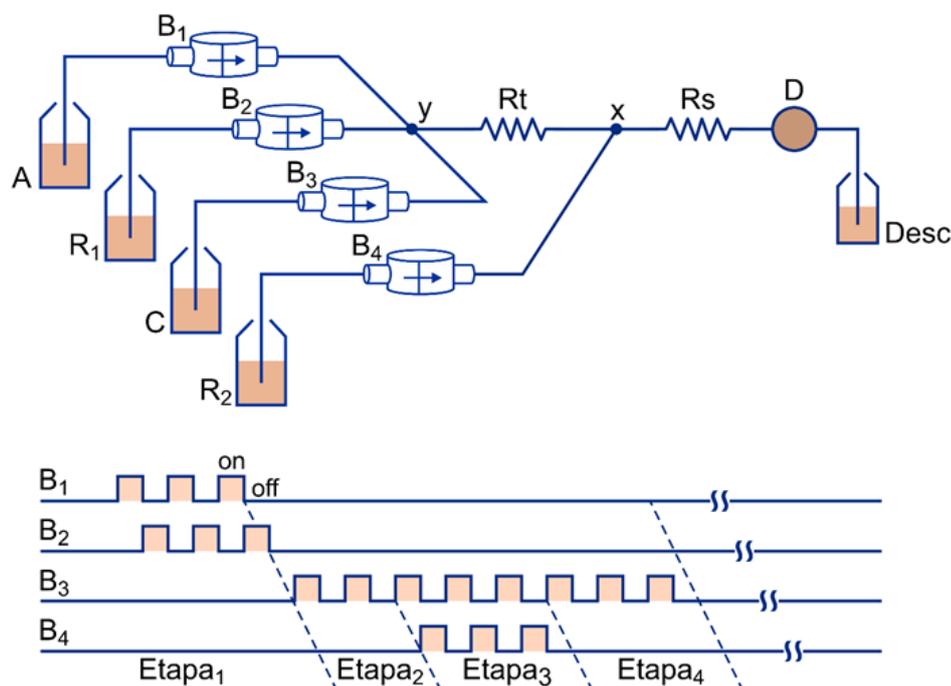


FIGURA 5. Diagrama característico de um módulo de análise em fluxo baseado no processo de multicomutação. A = amostra; R_1 e R_2 = soluções de reagentes; C = transportador; B_1 - B_4 = bombas solenoide; x e y = confluências, R_t e R_s = reatores helicoidais; D = detector e Desc. = descarte. As superfícies sombreadas abaixo das linhas, indicam que a minibomba correspondente está ligada

Em um módulo de análise baseado no processo MCFA, as soluções da amostra e do reagente são inseridas no percurso analítico de forma intermitente, permitindo uma redução significativa do consumo de reagente e na geração de

resíduos [99]. Neste tipo de sistema de análise, a propulsão de fluido é um parâmetro essencial, e para isso tem sido utilizado, principalmente, bomba peristáltica [100], bomba de seringa [101] e bomba solenoide [102,103].

Outros autores têm implementado procedimentos analíticos empregando um conjunto de minibombas peristálticas [104] e válvulas solenoides de três vias [105]. Andrade e colaboradores [98] desenvolveram um procedimento baseado em MCFA para determinação de polifenóis totais em vinhos, utilizando detecção por quimiluminescência.

Procedimentos proposto por Santos et al. [106], compreende o desenvolvimento de um procedimento para a determinação simultânea de sulfato e cloreto em coque de petróleo, empregando uma bomba de seringa *homemade*, e um fotômetro baseado em LED. Gomes e colaboradores, [107] empregaram um sistema de multicomutação em fluxo para a determinação de diclofenaco de sódio, ácido acetilsalicílico e fluoretos em fármacos injetáveis, comprimidos e águas de torneira. O módulo de análise baseado no processo MCFA foi construído com três válvulas solenoide de três vias e uma bomba peristáltica. Em outro trabalho, Brasil e Reis, [108] propuseram um procedimento analítico automatizado para a determinação fotométrica de açúcares redutores em vinhos. Neste procedimento, os autores usaram a reação de redução de açúcares com hexacianoferrato de potássio (III) em meio alcalino, e foi implementado empregando uma abordagem de multicomutação em análise de fluxo e uma câmara de aquecimento para acelerar o desenvolvimento da reação.

1.5.3. Análise em fluxo batelada (FBA)

O processo de análise em fluxo-batelada, do inglês (*Flow-batch analysis systems* FBA), combina as vantagens inerentes aos sistemas de análise por injeção em fluxo com as do processo de análise em batelada. O processo FBA apresenta vantagens como robustez, baixo custo de análise, baixo consumo de amostras e de soluções de reagentes, geração de pequeno volume de resíduos. Uma revisão sobre os procedimentos analíticos em fluxo batelada foi elaborada por Diniz et al. [109], onde afirmam que em FBA, as medições podem ser realizadas com sensibilidade máxima, pois o equilíbrio físico-químico do processo analítico pode ser alcançado com um mínimo de diluição da zona de amostragem.

Um sistema FBA básico geralmente compreende cinco partes essenciais:

- Sistema de propulsão de fluídos, empregando bomba peristáltica ou bomba-solenoide;
- Sistema de escoamento de fluídos, constituído por tubos com diâmetro interno entre 0,2 e 2,0 mm;
- Sistema de controle da manipulação das soluções, empregando válvulas solenoide de duas ou de três vias;
- Sistema de mistura, câmara onde as alíquotas da amostra e das soluções de reagentes são misturadas;
- Sistema de detecção, monitoramento de uma dada propriedade da amostra em função do composto formado com o reagente usado.

Na FIGURA 6, é mostrado o diagrama de fluxo de um módulo de análise em fluxo-batelada. As válvulas solenoide servem para direcionar cada solução para a câmara de mistura ou para o respectivo recipiente. A válvula solenoide V_5 , direciona a solução final (composto formado) para a detecção e subsequente descarte.

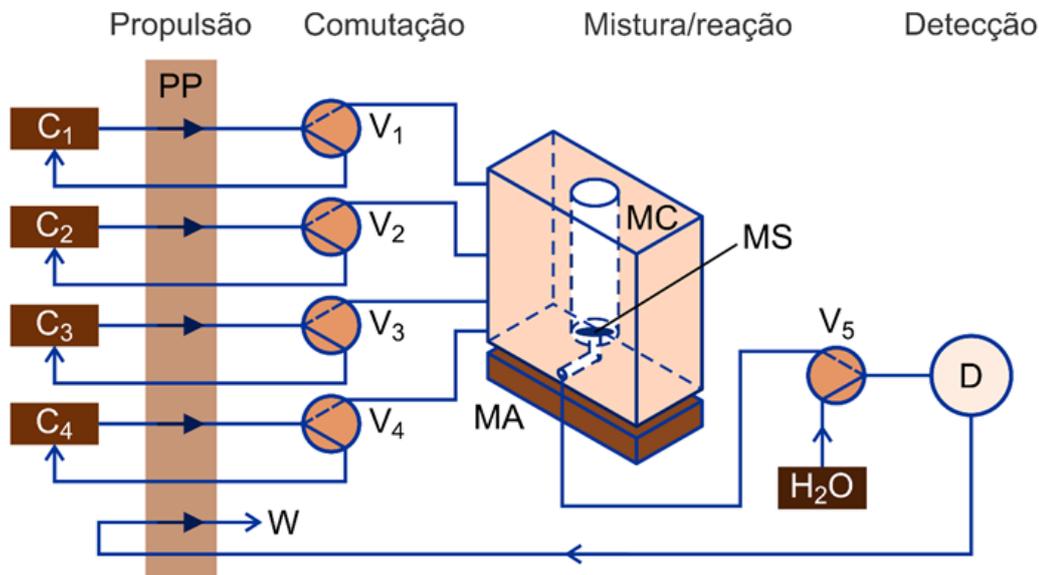


FIGURA 6. Diagrama básico de um módulo de análise em fluxo-batelada. $C_1 - C_4$, recipientes de amostra, reagentes; PP, bomba peristáltica; $V_1 - V_5$, válvulas solenoide de 3 vias; MS, agitador magnético; MC, câmara de mistura/reacção; MA, barra magnética; D, detector; W, descarte de resíduo

O processo FBA tem sido empregado para uma variedade de técnicas analíticas, incluindo espectrofotometria [110,111], quimiluminescência [112], espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplada ICP OES [113], eletroquímica [114], o que demonstra a versatilidade do processo.

Empregando esse processo, Nascimento et al. (2015) [122] desenvolveram um procedimento ecologicamente sustentável, usando microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) com um líquido iônico (IL) para a determinação de formaldeído no leite [115]. Os autores exploraram o conceito de fluxo pulsado pela primeira vez para dispersão do extrator, visando maior precisão e maior eficiência de extração.

Khanhuathon e colaboradores [116] empregaram um sistema de injeção sequencial, para implementar o processo FBA para a determinação espectrofotométrica de alumínio em amostras de água e bebidas. O sistema desenvolvido mostrou-se econômico, sensível e reprodutível.

Acebal et al. [117] empregaram um sistema FBA com fotodegradação e detecção por fluometria. O procedimento analítico foi implementado para a determinação de metil-metsulfuron (herbicida) em amostras de água. O método proposto incluía uma etapa de pré-concentração/separação em fase sólida (SPE), usando uma minicoluna com C18, acoplada à câmara de mistura.

1.5.4. Diodo emissor de luz e seu uso em fotometria

O diodo emissor de luz (LED, do inglês *light emitting diode*), é uma fonte de radiação eletromagnética atraente para medições em espectrometria na região visível do espectro eletromagnético (400 - 700 nm). A maioria dos LEDs tem banda de emissão em torno de 25 nm, o que permite seu emprego em detecção fotométrica sem o uso de dispositivos ópticos como prisma ou rede de difração [118]. Outras vantagens são: intensidade estável, baixo consumo de energia, produção de calor desprezível, tamanho pequeno e longa vida útil (estimada em 100 000 horas). Além destes, há dois parâmetros importantes que devem ser considerados na seleção de um LED como fonte de radiação: (i) a intensidade do feixe de radiação emitida ajustável; (ii) ângulo de abertura do feixe de radiação, o qual pode variar de 10 a 90°. Encontra-se facilmente no mercado, LEDs em que o feixe de radiação emitida tem ângulo de abertura na faixa de 20 a 30°. Esta abertura é suficiente para detecção fotométrica em sistemas de análise em fluxo com celas de detecção longas (100 mm) [119]. Quanto à intensidade, o LED que emite radiação com ângulo de abertura estreito, o feixe de emissão é mais intenso. Por estas razões, os LEDs para as faixas visível do espectro eletromagnético tem sido amplamente adotados em instrumentos analíticos [120,121].

A intensidade do feixe de radiação emitida por um LED de alta intensidade, é cerca de cinco vezes maior do que a do feixe de radiação emitida por uma fonte convencional com monocromador [122], onde ocorre redução da intensidade do feixe de radiação. Esta característica permite o uso de celas detecção de longo caminho óptico, visando aumento de detectabilidade. A FIGURA 7 mostra a configuração genérica de um sistema de detecção usando LEDs com fontes de radiação eletromagnética.

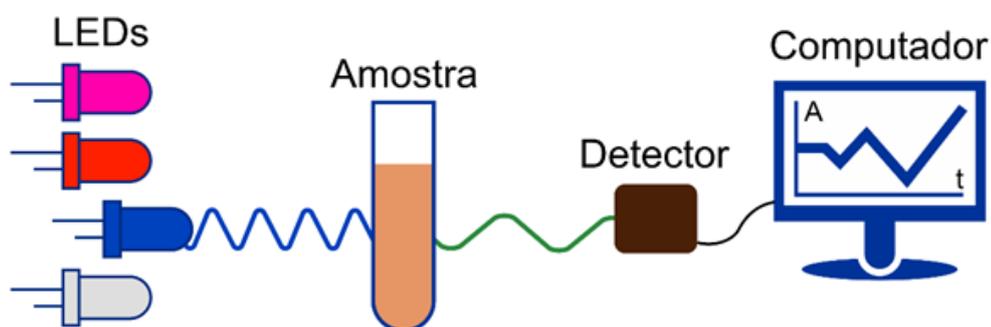


FIGURA 7. Representação genérica de um fotômetro baseado em LEDs

Magalhães e Reis [121] desenvolveram um fotômetro baseado em diodo emissor de luz (LED), projetado para usar uma célula de fluxo com caminho óptico de 100 mm, tendo como objetivo melhorar a sensibilidade. Após a seleção das variáveis do sistema em fluxo, foi observado a adesão à lei de Lambert-Beer para concentrações de íons Co^{2+} na faixa de 0,13 a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Fiedoruk et al. [123] apresentaram a proposta de um sistema híbrido de injeção sequencial/injeção em fluxo (SI/FI), equipado com um detector fluorométrico baseado em LED para testes de bio-acessibilidade de orto-fosfato em solos. Nesse trabalho, o detector opto-eletrônico compreendia dois LEDs, um polarizado como emissor de radiação e outro como fotodetector.

1.5.5. Emprego do microcontrolador Arduino em análise em fluxo

A automação de procedimentos analíticos requer o emprego recursos de eletrônica e de informática. Entre os dispositivos disponíveis no mercado com estrutura apropriada para esta finalidade, destaca-se o microcontrolador Arduino Due, o qual tem 54 pinos que podem ser configurados como entrada/saída digitais, 12 entradas analógica/digital com resolução de 12 bits, e 2 saídas analógica de

12 bits. Em vista disso, é bastante atraente para o desenvolvimento de projetos de pesquisas, envolvendo automação de procedimentos analíticos [124].

Dos 54 pinos, 12 podem ser usados como saídas PWM (*power modulation*), característica que pode ser usada para controlar a rotação de mores de corrente contínua ou a intensidade de luminosidade de um LED, usado como fonte radiação em um fotômetro de LED. A programação do Arduino Due para realizar as tarefas que desejamos, é realizada em linguagem de programação C++, desenvolvida em computador comum, usando um aplicativo disponível na internet (<https://store.arduino.cc/usa/due>). Após o desenvolvimento, o programa é transferido para a placa de Arduino através da interface serial USB (*Universal Serial BUS*). Finalizada a transmissão, o Arduino inicia a execução do programa. Este programa é permanente, mas pode ser trocado por outra versão, simplesmente transmitindo (carregando) novamente o programa atualizado.

A FIGURA 8 mostra uma placa do Arduino Due vista de cima, praticamente em tamanho real. Esta característica facilita seu uso em equipamentos de pequeno porte como o que pretendemos desenvolver neste trabalho.

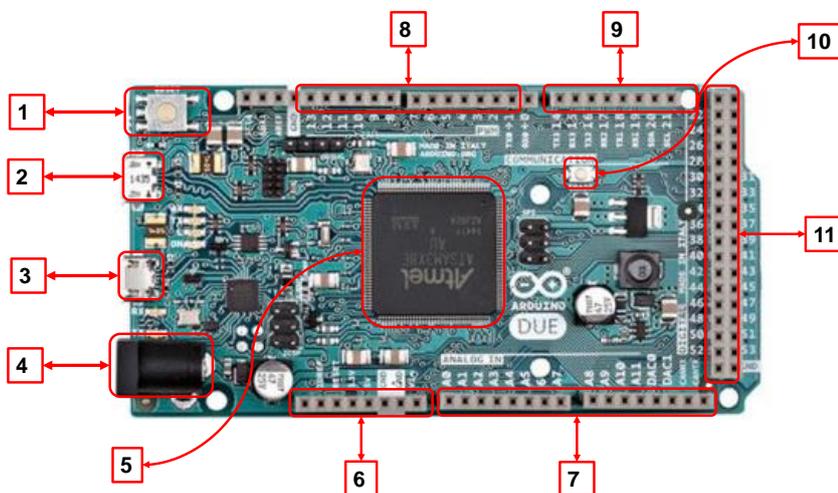


FIGURA 8. Vista superior de uma placa Arduino Due. 1 = botão reestabelecer (reset); 2 = porta de entrada USB; 3 = porta de entrada de programação USB; 4 = entrada de energia externa; 5 = controlador Atmel SAM3XE ARM cortex-M3; 6 = saída de 5 V; 7 = entradas analógicas; 8 = PWM de saída; 9 = porta serial de comunicação; 10 = botão apagar; 11 = pinos de entrada e saída digital

Um programa para ser executado em uma plataforma Arduino Due, obrigatoriamente compreende três partes: (i) geral, onde são definidas as finalidades funcionais dos pinos do Arduino que serão usados, bem como os nomes das variáveis e valores das constantes usadas; (ii) função `setup()`, onde são definidas como cada

pino do Arduino funcionará durante a execução do programa. (III) função loop(), onde são executadas as tarefas inerentes ao processo analítico que desejamos controlar.

As grandezas definidas na primeira parte são reconhecidas pelo Arduino em todas as fases de execução do programa. Uma vez conectado à fonte de alimentação, o Arduino executa a função “loop()” continuamente, portanto etapas de pausa, repetições e inquirições para novas atividades, devem ser incluídas pelo usuário em função das necessidades do projeto. A seguir é apresentado como exemplo de um programa feito para acionar sequencialmente 3 válvulas solenoide, ou outros dispositivos adequadamente conectados nestes pinos do Arduino Due.

```
int valvula1Pino = 11; // Define que a válvula 1 está conectada no pino 11.
int valvula2Pino = 10; // Define que a válvula 2 está conectada no pino 10.
int valvula3Pino = 9; // Define que a válvula 3 está ligada no pino 9.
int tempo = 100; // Define o intervalo de tempo para manter as válvulas ligadas.

void setup()
{
  pinMode(valvula1Pino,OUTPUT); //Saída.
  pinMode(valvula2Pino,OUTPUT); //Saída.
  pinMode(valvula3Pino,OUTPUT); //Saída.
}

void loop()
{
  digitalWrite(valvula1Pino,HIGH); //Liga a válvula V1.
  delay(tempo); //Espera 100 ms.
  digitalWrite(valvula1Pino,LOW); //Desliga a válvulas V1.
  digitalWrite(valvula2Pino,HIGH); //Desliga a válvulas V1.
  delay(tempo);
  digitalWrite(valvula2Pino,LOW); //Desliga a válvulas V2.
  digitalWrite(valvula3Pino,HIGH); //Liga a válvulas V3.
  delay(tempo);
  digitalWrite(valvula3Pino,LOW); //Desliga a válvulas V3.
  delay(tempo);
}
```

Este tipo de microcontrolador tem sido usado para automação de procedimentos analíticos baseados no processo de análises em fluxo. Miranda et al. [125], desenvolveram um sistema baseado em multicomutação em análise em fluxo para determinação fotométrica dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em águas. Neste sistema, o hardware projetado era controlado por um microcontrolador Arduino Due que oferece recursos para acionar dispositivos externos, realizar aquisição de dados usando conversor analógico para digital com 12 bits de resolução e comunicação através de uma interface USB [126]. Os autores afirmam que o baixo consumo de energia do equipamento era adequado para o trabalho de campo [125].

Conte et al. [127], projetaram e aplicaram com sucesso um fotômetro impresso em 3D controlados com um Arduino. Nesse trabalho, os autores utilizaram componentes de baixo custo (LEDs, resistores e um Arduino) e peças impressas em 3D personalizadas (célula de fluxo e suporte de cubeta) para detectar a absorção da radiação. O fotômetro com cela de fluxo impresso em 3D foi conectado em linha para detectar dinamicamente a absorbância de culturas de células e foi aplicado com sucesso para análise de enzimas.

Lima et al. [128], desenvolveram novos procedimentos com detecção fotométrica para a determinação de cloreto e sulfato em etanol combustível, sem etapas de preparo da amostra, explorando a estratégia de fluxo-batelada. Nesses trabalhos, o controle do módulo de análise, incluindo a manipulação das soluções e aquisição de dados, foram realizados usando uma placa Arduino Due equipada com as interfaces periféricas necessárias [128,129].

Tendo em vista estas características do Arduino Due, esta plataforma foi escolhida para controlar o módulo de análise e o sistema de detecção que serão projetados e construídos como parte da pesquisa, para desenvolver um procedimento automático para a determinação fotométrica de mercúrio em águas e sedimentos.

2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo o desenvolvimento de procedimento analítico para determinação fotométrica de mercúrio em sedimento e águas doces empregando os processos de fluxo-batelada e multicomutação em fluxo.

2.1. Objetivos específicos

- Empregar os processos de multicomutação em sistema de análise em fluxo (MCFA) e fluxo-batelada (flow-batch);
- Desenvolver um módulo de análise com dispositivo de detecção fotométrica;
- Propor um software de controle e aquisição de dados de forma integrada;
- Fazer teste em bancadas para ajuste dos equipamentos e escolha de reagentes;
- Avaliar o desempenho analítico do sistema proposto;
- Comparar as características analíticas do mesmo com outros sistemas automáticos em fluxo.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Neste item discutiremos o processo de construção do equipamento proposto para determinação de mercúrio em águas doces e sedimentos, empregando processos de multicomutação e fluxo batelada. O equipamento usado compreendendo o módulo de análise, o sistema de propulsão de fluídos e de detecção fotométrica, foram construídos como parte do projeto da pesquisa, empregando materiais de baixo custo, os quais são detalhados no item a seguir. O controle do módulo de análise e a aquisição de dados foram realizados empregando o microcontrolador Arduino Due acoplado a um microcomputador, e funcionando com um software escrito em C++, específico para este projeto de pesquisa.

3.1.1. Descrição do sistema de multicomutação e fluxo-batelada

Neste trabalho será empregada uma bomba de seringa como propulsor de fluídos, e neste item é descrito a constituição deste equipamento, o qual foi projetado como parte do trabalho de tese, e foram empregados os seguintes dispositivos: um motor de passo (NEMA 23) com torque de 7 kgf e 200 passo por volta; um fuso de aço inox, 21 cm de comprimento, 1,5 de diâmetro e rosca com passo de 2 mm; uma castanha com 38 mm de comprimento, diâmetro e rosca compatível com o fuso; um mancal com rolamento; dois cilindros de latão, comprimento de 22 cm e diâmetro de 15 mm; três seringas de vidro, volume de 5 mL; três válvulas solenoide de três vias HP225T031 (*NResearch Inc.*); duas chaves elétricas de três contatos e haste deslizante com rolamento. Outras peças incluindo placas de acrílico e de alumínio, conectores elétricos são detalhados na FIGURA 9.

O motor de passo é um dispositivo eletromecânico que converte pulsos de energia elétrica em movimento rotativo. O eixo do motor de passo gira continuamente, quando são aplicados uma sequência de pulsos elétricos. A velocidade de rotação tem relação direta com o número de pulsos aplicados por unidade de tempo (s), portanto a velocidade do motor de passo é definida pela frequência com que os pulsos elétricos são aplicados. O número de voltas do eixo é definido pela quantidade de pulsos programados. O motor usado neste projeto tem um ângulo de rotação de $1,8^\circ$ (radiano) por pulso, portanto para dar uma volta são necessários 200 pulsos elétricos.

Essa característica permite controlar a vazão das seringas com boa precisão, e volume das alíquotas amostradas ou deliberadas podem ser definidas por tempo ou por contagem de pulsos.

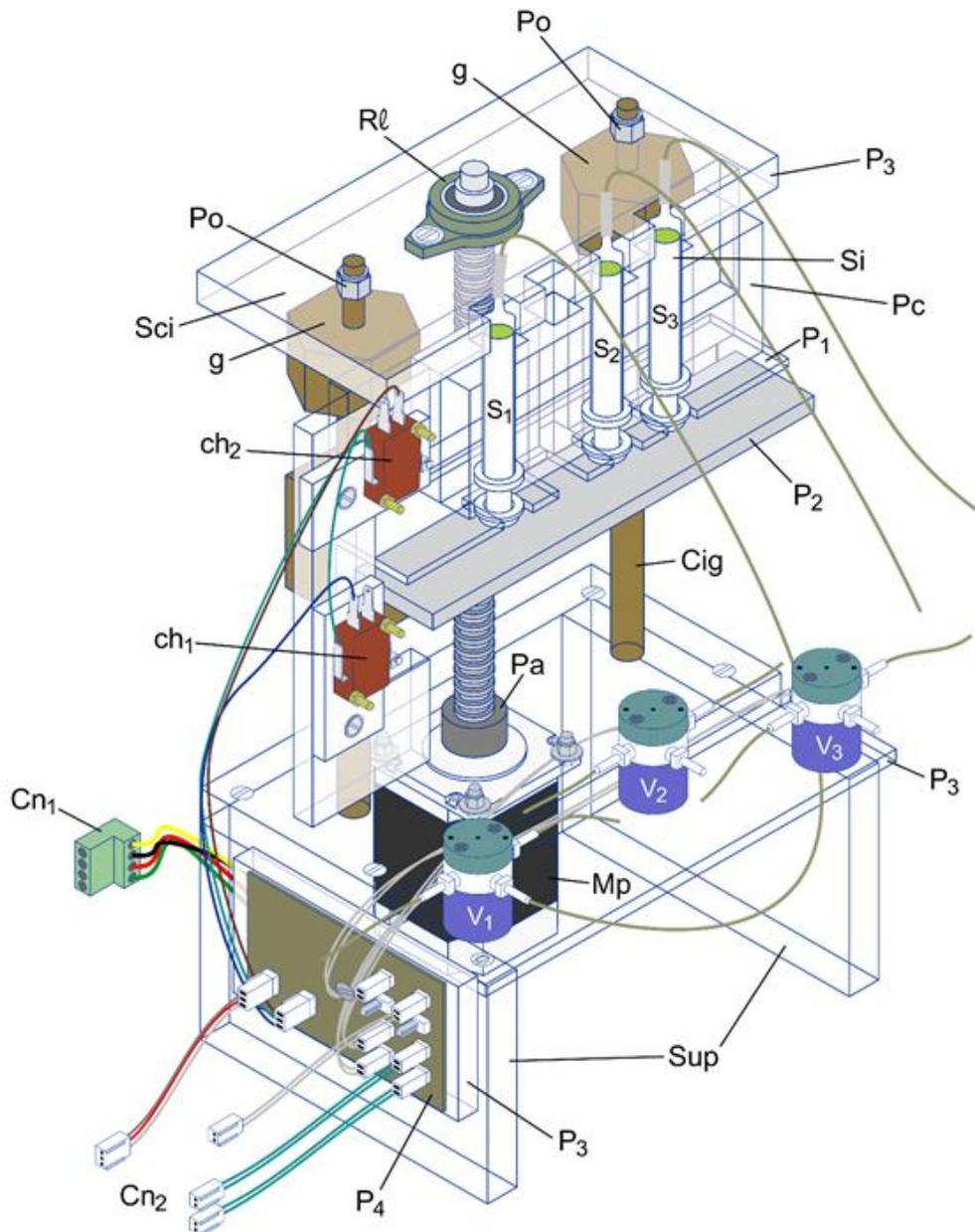


FIGURA 9. Vista da bomba de seringas. Sup = suporte de acrílico; Mp = motor de passo; Pa = parafuso (fuso) de tração; Cig = cilindros guias; Po = porcas; Rl = mancal com rolamentos; g = suporte guia; Cn1 = conector da interface do motor de passo; P1, P2, P3 e P4 = placas de acrílico; Ch1 e Ch2 = chaves de interrupção; V1, V2 e V3 = válvulas solenoides; S1, S2 e S3 = seringas de vidro; P1 e P2 = barras de alumínio, espessura de 2 e 3 mm, respectivamente, Pc = placa de acrílico de 15 x 1,5 cm de comprimento e espessura, com canais para encaixe das seringas

Além da alimentação em corrente contínua, o motor de passo empregado tem três linhas de controle com as seguintes funções: habilitação, direção e frequência. Estes sinais de controle são aplicados a uma interface de potência (DR-SB050DC04-CS, ACTION MOTORS) que faz compatibilização de diferença de potencial e de corrente requeridas pelo motor de passo. Esta interface é alimentada por uma fonte de tensão de 24 V e intensidade de corrente 10 A.

Para permitir a seleção de vazões por software, foi desenvolvido um gerador de frequência com sete saídas selecionadas por software, permitindo gerar as seguintes vazões: 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,2 $\mu\text{L s}^{-1}$. Quando a linha de habilitação da interface está em nível lógico alto (sinal aplicado $> 2,0$ V), o motor de passo permanece parado. Quando a linha que define a direção está em nível lógico baixo (sinal aplicado $< 0,8$ V), a rotação do motor é no sentido horário (para à direita), caso contrário, a rotação será no sentido anti-horário (para à esquerda). A castanha (porca de 3,8 cm de comprimento) está fixada em uma base de metal, na qual foi fixada à plataforma móvel que desloca os êmbolos das seringas. Os tambores das seringas (corpo externo) estão presos em uma plataforma fixa. Quando o motor de passo é habilitado para girar para a direita, os êmbolos das seringas são deslocados para cima, e quando a rotação é para a esquerda, os êmbolos são deslocados para baixo. As chaves elétricas Ch₁ e Ch₂ funcionam com delimitador de fim de curso, assim quando a plataforma móvel P₂, FIGURA 9 encosta em uma delas, interrompe a alimentação do motor. Estas chaves não são programáveis e funcionam como segurança por hardware. Quando a chave superior é acionada (Ch₂), o movimento do motor só é restabelecido com a habilitação para o deslocamento para baixo. O mesmo princípio se aplica quando a interrupção do movimento era causada pela chave inferior (Ch₁). Estas chaves são dispositivos de segurança e atuam no final dos deslocamentos para cima e para baixo, entretanto o movimento pode ser interrompido por software em qualquer posição.

O conceito básico da extração por solvente, tendo como objetivo realizar pré-concentração, requer que o volume da fase aquosa esteja maior que o volume da fase orgânica. Em sistemas de análise em fluxo, a manipulação de grandes volumes de amostra com bomba peristáltica é uma etapa muito demorada, o que compromete a produtividade do procedimento analítico. Visando contornar esta dificuldade foi desenvolvido o dispositivo mostrado na FIGURA 10.

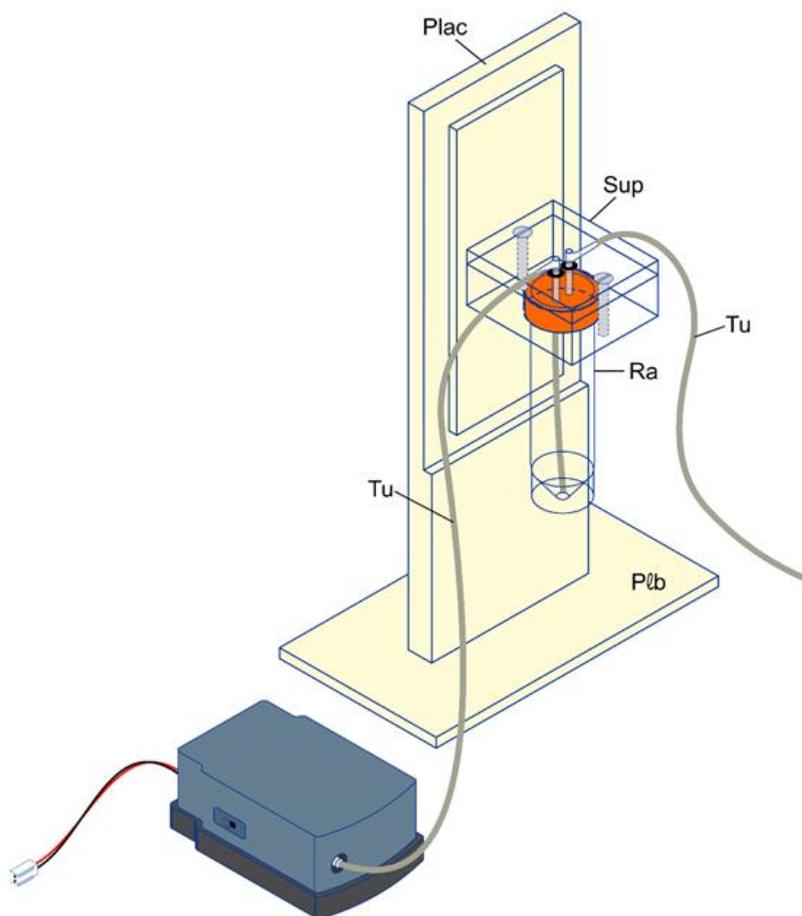


FIGURA 10. Diagrama do sistema de amostragem. Plac = Placa de PVC; Sup = suporte em acrílico; Ra = Recipiente de amostra; Tu = tubos de silicone, Plb = placa de PVC; Cp = minicompressor de ar; e cn = conectores elétricos

No suporte (Sup) foi usinado um encaixe com rosca para um tubo (CORNING – Falcon) com volume de 50 mL, o qual é usado como recipiente da amostra. Quando o recipiente com a amostra está encaixado no suporte, e o compressor (MAXXI PRO 300) é ligado, o fluxo de ar faz pressão sobre o líquido dentro do tubo, o qual é forçado a se deslocar através dos tubos de silicone para a câmara de extração. O compressor de ar usado gerava uma vazão de 2 mL s^{-1} , permitindo que um volume de amostra de 40 mL fosse transferido em um intervalo de tempo de 20 s.

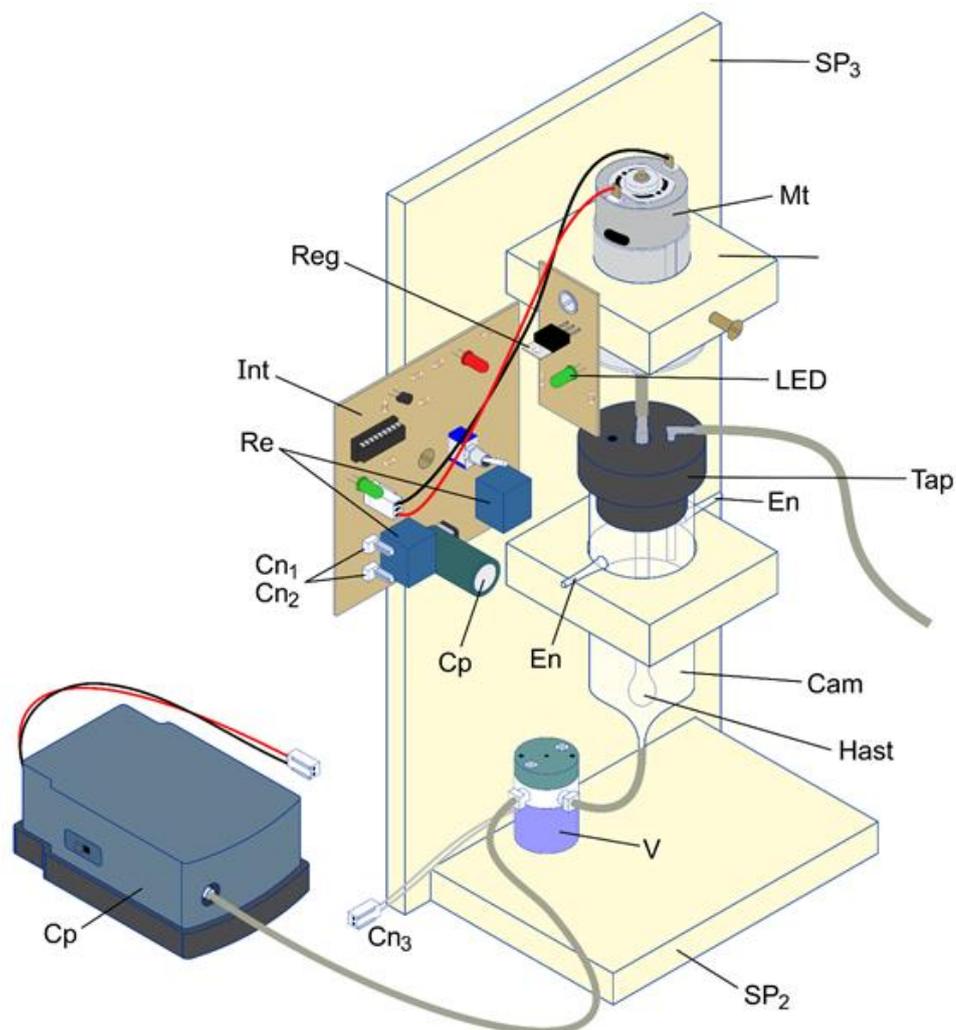


FIGURA 11. Vista da montagem da câmara de reação/extração. SP₁, SP₂ e SP₃ = suportes de acrílico; V = válvula solenoide; Hast = bastão de vidro para agitação (14 cm de comprimento e 6 mm de diâmetro); Cam = Câmara de mistura; En = Entrada de fluido; Tap = Tampa; Int = interface de controle; Mt = motor de corrente contínua, Re = relés; Cn1 e Cn2 = conectores para as bombas de amostragem e de esvaziamento da câmara de extração; Cp = capacitor eletrolítico de 447 μ F

O motor de corrente contínua instalado no topo da plataforma, foi usado para forçar a mistura entre as fases aquosa (amostra) e orgânica (clorofórmio). A agitação era feita com um bastão de vidro acoplado ao eixo do motor com um pedaço de tubo de silicone. A extremidade inferior do bastão de vidro foi moldada na forma de moeda, visando melhorar as condições de mistura. A velocidade do motor foi controlada através de uma porta digital do Arduino Due, usando uma função chamada PWM (*Power modulation*) disponível no Arduino. Esta função controla o intervalo de tempo de alimentação do motor, e pode variar de 0% (motor parado) a 100% (rotação máxima). O valor é definido por software como uma variável de usuário, que pode ser alterada em função da rotação desejada. A contagem do número de rotações por minuto (rpm) foi realizada, fixando um disco de fibra de vidro no eixo do

motor e instalando uma chave óptica (*slotted switch*) na periferia do disco. Esta chave tem um emissor e um detector de radiação na região do infravermelho, e o disco interrompia o feixe de radiação. Quando o motor estava em movimento, um corte na beirada do disco permitia a passagem de radiação, uma vez em cada volta. O detector de radiação gerava um pulso de diferença de potencial e era contado por um frequencímetro. Este arranjo permitiu variar a rotação do motor de 500 até 5.500 rpm.

O compressor (SUPER AIR-PUMB – KARE'S) acoplado ao frasco de descarte da câmara de extração, foi instalado para gerar vácuo no frasco de descarte, e dessa forma, o fluido dentro da câmara de extração era aspirado para o descarte, permitindo que a câmara fosse esvaziada em um intervalo de tempo de 25 s. A câmara de reação/extração foi fixada em um suporte de PVC, e a estrutura montada é mostrada na FIGURA 11.

3.1.2. Projeto do sistema de detecção e do módulo de análise

A instrumentação consiste em dois módulos descrito abaixo. O diagrama do fotômetro baseado em LED é mostrado na FIGURA 12. O fotômetro inclui um fotodiodo OPT301 (*Texas Instruments*); um díodo emissor de luz (LED) com emissão máxima a 485 nm; uma cela de fluxo com 50 mm de caminho óptico e 1,2 mm de diâmetro interno, moldada usando um tubo de vidro [119,130].

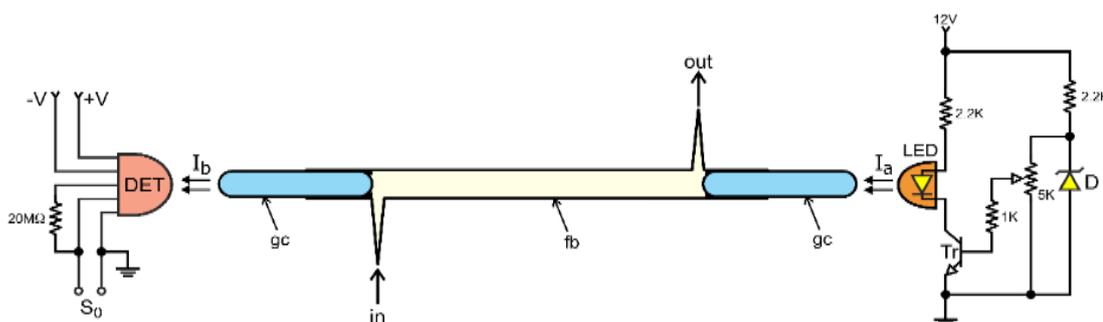


FIGURA 12. Diagrama do fotômetro. Det = fotodiodo OPT301; LED = díodo emissor de luz ($\lambda_{\max} = 485$ nm); gc = cilindro de vidro (1,2 mm de diâmetro e 20 mm de comprimento); fb = corpo da cela de fluxo (50 cm de comprimento e 1,2 diâmetro interno); tr = transistor BC547; S_0 = saída de sinal (mV); D = diodo (3,2 V); in e out = entrada e saída de fluido, respectivamente

O fotodetector (Det) fornece na saída (S_0), uma diferença de potencial (mV), diretamente proporcional à intensidade do feixe de radiação (I_b), proveniente da cela de fluxo (fb). A intensidade do feixe de radiação (I_a), emitida pelo LED, foi ajustada através do resistor variável conectado à base do transistor (Tr).

A placa Arduino Due foi programada para trabalhar com uma resolução de 12 bits, assim o valor digital máximo é 4096, o que corresponde a um sinal de entrada analógica de 3200 mV. Sempre que software era iniciado, o ajuste do sinal gerado era realizado para atender a esse valor, o que era feito girando o resistor variável conectado à base do transistor (Tr). Por segurança, o brilho do LED foi ajustado para obter uma medição de 4000 unidade digital. Isto era feito mantendo a cela de fluxo cheia com água.

O diagrama do módulo do sistema de análise em fluxo é mostrado na FIGURA 13 na condição *stand by* e seu acoplamento à placa Arduino Due é mostrado na FIGURA 14.

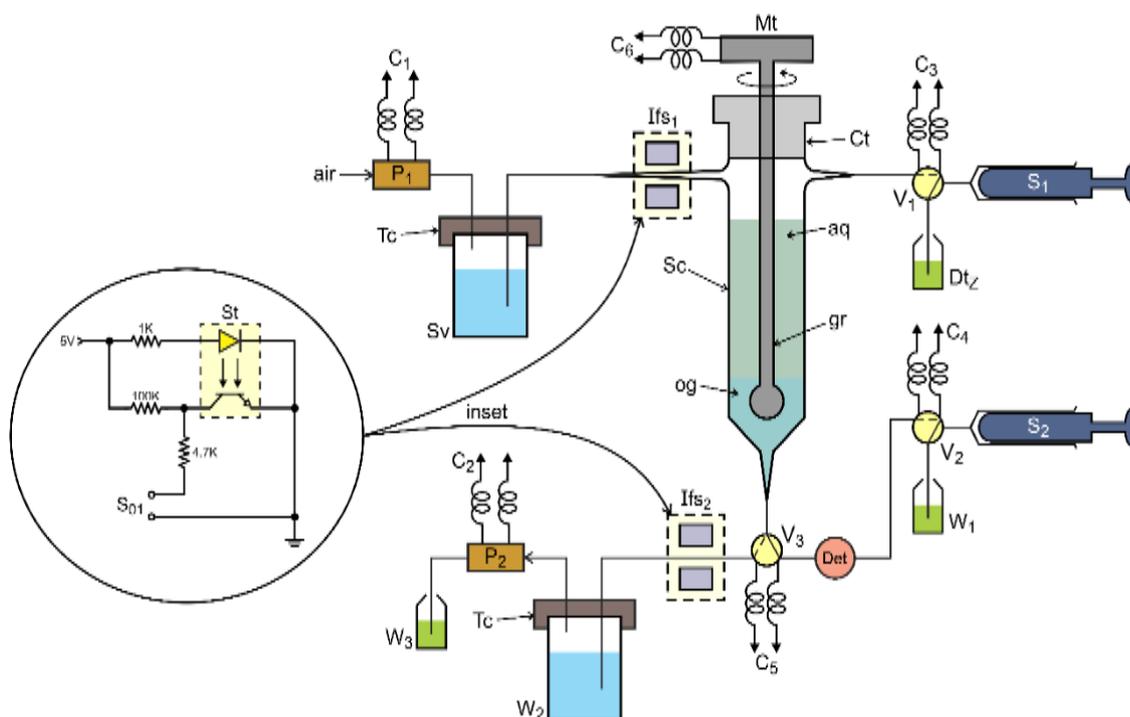


FIGURA 13. Diagrama do sistema de fluxo. P₁ e P₂ = minibombas, vazão 132 mL min⁻¹; Sv = frasco de amostra, tubo Falcon de 50 mL; Sc = câmara de separação; og = fase orgânica; aq = fase aquosa; Ct = cobertura de Teflon; Tc = tampa rosqueada; Mt = motor Dc; gr = bastão de vidro; Dtz = ditizona em clorofórmio; V₁, V₂ e V₃ = válvulas solenoides de três vias; S₁ e S₂ = seringa de vidro; Det = fotômetro; W₁, W₂ e W₃ = recipientes de resíduos; Ifs₁ e Ifs₂ = chaves ópticas (infravermelho); C₁, C₂,... e C₅ = terminais elétricos conectados como indicado na Fig. 14; C₆ = plugue conectado à linha PWM, Fig. 14

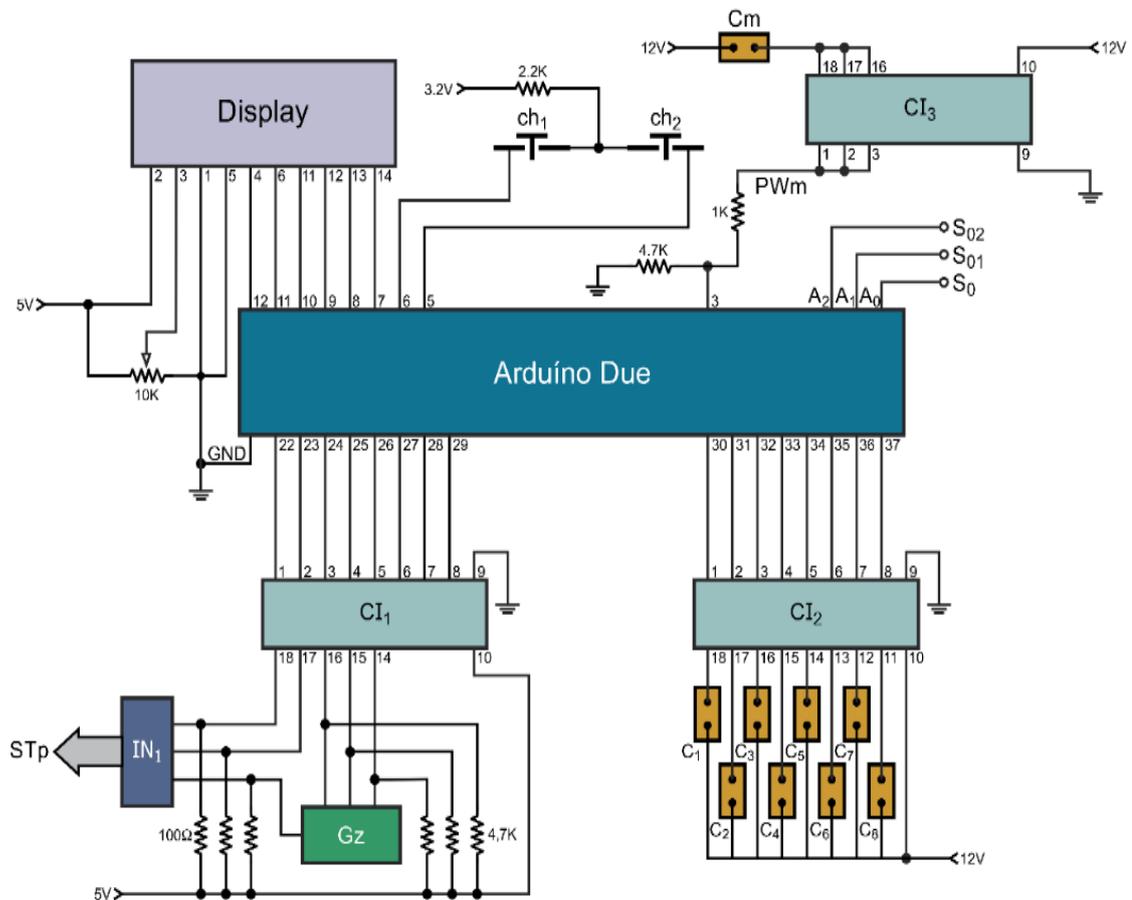


FIGURA 14. Diagrama dos dispositivos eletrônicos de acoplamento ao Arduino Due. CI₁, CI₂ e CI₃ = circuito integrado ULN2803; P₁ e P₂ = bombas; C₁, C₂, C₃, C₄ e C₅ = plugues elétricos para bombas P₁ e P₂, válvulas solenoides V₁, V₂ e V₃ (Fig. 13), respectivamente; C₆ = plugue PWM para o motor CC (Fig. 13); A₀, A₁ e A₂ = entradas analógicas do Arduino Due; S₀ = sinal do fotômetro (Fig. 13); S₀₁ e S₀₂ = sinais do sensor infravermelho (I_{fs1} e I_{fs2}, Fig. 13), respectivamente; Ch₁ e Ch₂ = interruptores elétricos normalmente aberto, IN_i = interface para acionar o motor de passo; Gz = gerador de frequência; STp = barramento de controle do motor de passo

As válvulas solenoide de três vias (V₁, V₂ e V₃) acopladas às seringas, permitem enchê-las com as soluções e direcioná-las para o módulo de análise. Estas válvulas são alimentadas com diferença de potencial de 12 V, e são acopladas a uma interface digital (ULN2803), a qual recebe os sinais de controle gerado pelo Arduino Due em 3 V e compatibiliza para 12 V. Além disso, a intensidade de corrente elétrica fornecida pelo Arduino nas portas digitais varia de 3 a 15 mA, portanto não é suficiente para acionar uma válvula solenoide. Esta interface pode fornecer 0,5 A de corrente em cada linha de controle. Na FIGURA 14 é mostrado o acoplamento desta interface ao módulo de análise e à placa do Arduino Due.

Quando o software de controle era executado, uma mensagem mostrada no display, indicaria se o recipiente da amostra (S) estava anexado ao suporte. A confirmação era feita pressionando a chave Ch₁ (FIGURA 14), e imediatamente a

minibomba P_1 era ligada. Sob esta condição, o ar era bombeado para dentro do recipiente da amostra (S_v), pressionando a amostra a qual fluía em direção à câmara de separação (S_c). Após um intervalo de tempo de 2 s, o Arduino Due lia continuamente o sinal gerado pelo sensor infravermelho (I_{fS_1}) através de sua entrada analógica A_1 . Esta ação era mantida até o sinal de leitura variar de ≈ 600 para ≈ 300 mV. Quando isso acontecia, indicava que a solução da amostra tinha sido completamente deslocada para a câmara de separação (S_c), e a bomba (P_1) era desligada. Em seguida, a válvula solenoide (V_2) era ligada e as seringas eram deslocadas para baixo, assim a seringa S_2 aspirava uma alíquota (1 mL) de amostra através da cela de fluxo do fotômetro. Posteriormente, a válvula solenoide (V_1) era ligada e as seringas eram deslocadas para cima, assim a seringa (S_1) inseria uma alíquota (800 - 1400 μ L) da solução reagente (Dtz) na câmara de separação. Ao mesmo tempo, o motor (Mt) era ligado durante um intervalo de tempo predefinido, de modo que o bastão de vidro preso ao eixo do motor girava em alta rotação (5000 RPM), causando um contato dinâmico entre a fase aquosa (amostra) e a orgânica (clorofórmio), permitindo assim a reação entre o analito Hg(II) e a ditizona dissolvida na fase orgânica. Para permitir a separação de fases, a mistura na câmara de separação era mantida em repouso por um intervalo de tempo pré-ajustado para ser suficientemente longo para a deposição da fase orgânica no fundo da câmara de separação.

Como foi descrito acima, a cela de fluxo era preenchida com uma alíquota da solução da amostra. O sinal gerado pelo fotômetro sob esta condição era lido pelo Arduino Due e salvo como referência (R_f) para ser utilizada no cálculo da absorbância. Posteriormente, as seringas eram deslocadas para baixo e a válvula solenoide V_2 era ligada. Sob esta condição, a fase orgânica era deslocada em direção ao fotômetro (Det), preenchendo a cela de fluxo com a fase orgânica contendo o complexo Hg(II)/ditizona. O Arduino Due lia o sinal gerado pelo fotômetro através de sua entrada analógica (A_0), convertia para valor digital (dv). A absorbância era calculada usando a seguinte relação: $A = \log(R_f/dv)$. Os valores de absorbância eram exibidos na tela do computador, e eram transferidos para uma plataforma Excel, a fim de permitir seu processamento. No próximo passo, a válvula solenoide (V_3) e a minibomba (P_2) eram ligadas, e o ar era aspirado para fora do recipiente de descarte (W_2), criando uma pressão negativa dentro do vaso, forçando o deslocamento da amostra da câmara de separação para o vaso de descarte (W_2).

Durante esta etapa, o Arduino Due lia através da entrada analógica (A₂), o sinal gerado pelo sensor de infravermelho (I_{fs2}). Após um intervalo de tempo de 3 s, se o sinal de leitura era menor que 300 mV, o Arduino Due entendia que a câmara de separação estava vazia, a válvula solenoide (V₃) e a minibomba (P₂) eram desligadas. Este arranjo evitava o contato da fase orgânica com as partes plásticas da bomba. A partir deste momento, o sistema estava pronto para processar a próxima amostra. O fluxograma da execução do procedimento analítico é mostrado na FIGURA 15 e um resumo da sequência de execução é mostrado na TABELA 2. A listagem do programa de controle e de aquisição de dados (comentada), escrito em linguagem de programação C++, foi incluída em um capítulo especial e compõe a Tese como apêndice. Assim, se o leitor tiver interesse pode consultá-lo, mas a Tese foi redigida de forma sua leitura pode ser compreendida sem leitura do programa de controle.

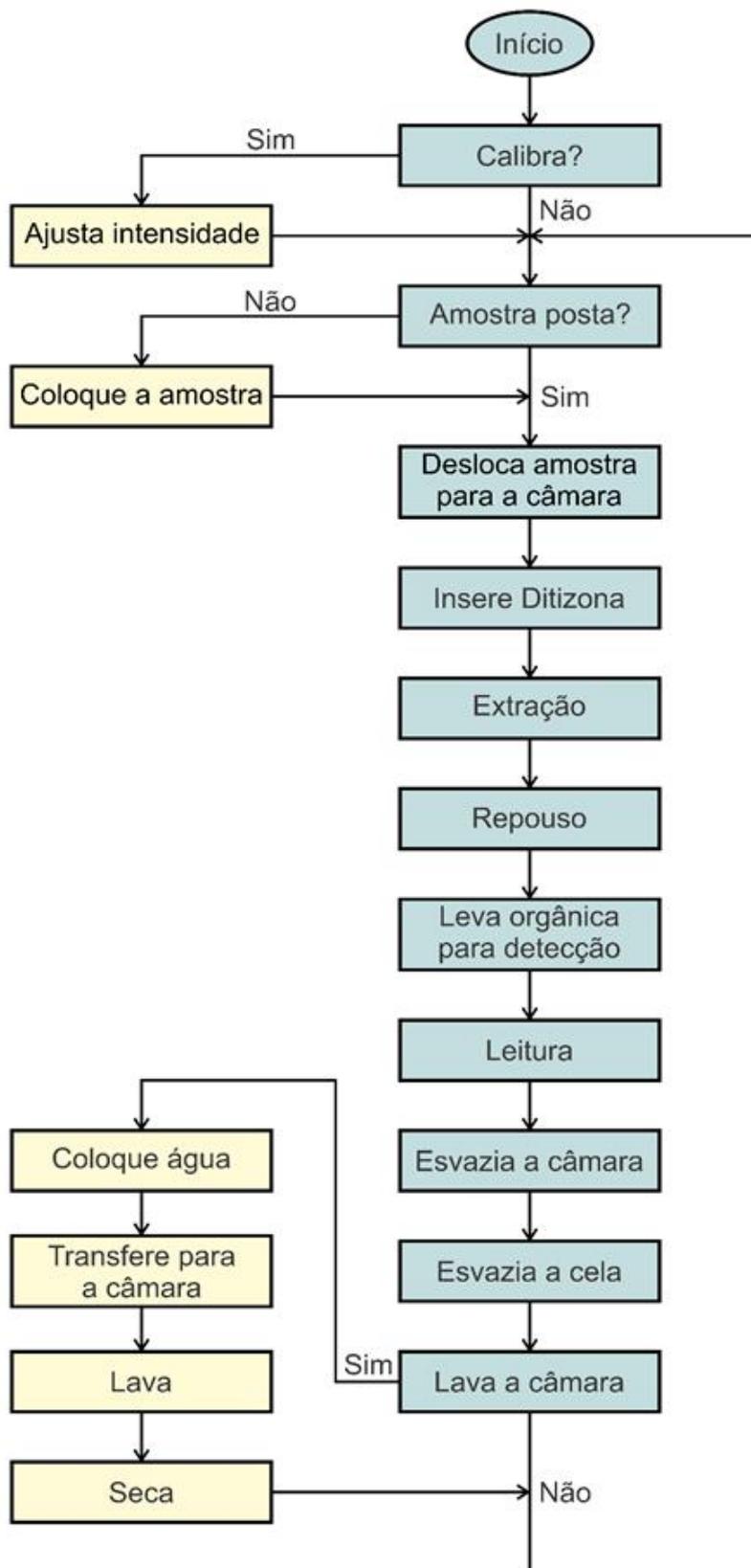


FIGURA 15. Fluxograma do procedimento analítico

TABELA 3. Sequência de execução da extração

Etapas	P ₁	P ₂	V ₁	V ₂	V ₃	Mt	S ₁ /S ₂	Vazão mL s ⁻¹ *	Tempo(s)
Esvaziar câmara	0	1	1	0	0	0	Desligado	2000	25
Inserir amostra	1	0	0	0	0	0	Desligado	2000	20
Inserir ditizona	0	0	0	0	1	1	Para cima	100	8
Reação	0	0	0	0	0	1	Desligado	-	15
Separação	0	0	0	0	0	0	Desligado	-	25
Leitura de sinal	0	0	0	1	0	0	Para baixo	12	5

*Os valores apresentados nas colunas de vazão e tempo são os valores selecionados após os ensaios.

3.2. Preparo dos reagentes e soluções

Todos os reagentes foram de grau analítico (Merck-Alemanha). Água purificada (resistividade específica de 18,2 MΩ cm⁻¹ a 25 °C) foi usada em toda parte experimental. Solução de ácido sulfúrico 6,0 mol L⁻¹ foi preparada por diluição com água a partir do ácido concentrado (Merck). As soluções de trabalho com concentração variando de 0,05 a 1,0 mol L⁻¹ de H₂SO₄ foram preparadas por diluição.

Soluções estoque de Hg²⁺ (1000 mg L⁻¹) foi preparada dissolvendo uma quantidade apropriada de HgCl₂ (Sigma) em uma solução de H₂SO₄ (0,05 mol L⁻¹). Após a dissolução, o volume foi completado para 100 mL, usando a mesma solução de ácido sulfúrico. Soluções padrão de trabalho (0,0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 µg L⁻¹ de Hg²⁺) foram preparadas diariamente por diluições a partir da solução estoque, usando uma solução de H₂SO₄ (0,2 mol L⁻¹) como diluente.

Solução estoque de ditizona 1,0 mmol L⁻¹ (Sigma) foi preparada dissolvendo 25,6 mg do reagente em clorofórmio, e foi armazenada em frasco âmbar e mantida sob refrigeração em geladeira (4 °C) quando não estava em uso. Um volume de 10 mL de uma solução de sulfito de sódio (1%, m/v) foi adicionado ao frasco com ditizona. Esta solução tem densidade menor que a do clorofórmio, em vista disso, se espalhava na superfície formando uma camada protetora, evitando o contato com o ar, aumentando a vida útil da solução de ditizona. A solução de trabalho de ditizona foi preparada diariamente por diluição da solução estoque com clorofórmio.

Solução de KBr-KBrO₃ (0,1 mol L⁻¹) foi preparada dissolvendo 1,192 g de brometo de potássio a um vaso com 100 mL de solução de ácido clorídrico (33% v/v), e agitando até a dissolução. Depois disso, 1,668 g de bromato de potássio foi lentamente adicionado ao recipiente sob agitação. A agitação da solução foi mantida

durante a noite. Solução de cloreto de hidroxilamina de sódio a (12% m/v) foi preparada dissolvendo a quantidade apropriada do sólido em água.

Solução de limpeza, etanol (20% v/v) foi preparada por diluição com água. Soluções estoque (1000 mg L^{-1}) dos íons potencialmente interferentes (Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ag^+ , Au^{3+} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , Cl^- , F^- , NO_2^-) foram preparados dissolvendo a quantidade apropriada dos sais em uma solução de HNO_3 (0,5% m/v).

3.3. Coleta e preparo das amostras de águas

Garrafas de polietileno tereftalato PET 1000 mL foram descontaminadas, mantendo em banho de ácido nítrico (20% v/v) por 24 h. Após esta etapa, os frascos foram lavados duas vezes com água purificada e secos em estufa de fluxo laminar ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), mantendo-os neste ambiente por 24 h.

As amostras de água foram coletadas em três locais diferentes do rio Piracicaba (Estado de São Paulo, Brasil), seguindo a metodologia estabelecida pelo Escritório de Água da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA US), método 1631 [131]. As amostras de água foram filtradas utilizando filtro de membrana de celulose com porosidade de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore HA). Uma série de frascos de 100 mL foram preenchidos com cada amostra e armazenados em freezer a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Antes de analisar, as amostras foram submetidas a um processo de oxidação, seguindo a metodologia descrita nos trabalhos de Tavares, 2003, Sun, 2012 [132,133]. Uma alíquota de 100 mL, foi transferida para tubos de polipropileno (PP) de 200 mL e a eles foram adicionados 1,1 mL de ácido H_2SO_4 concentrado e 1,8 mL da solução de KBr-KBrO_3 . A mistura foi mantida em repouso por 30 min à temperatura de 25°C . A preparação da amostra foi finalizada, adicionando uma alíquota de ($250 \text{ }\mu\text{L}$) da solução de hidroxilamina (12% m/v). Para atender a compatibilidade da matriz, as soluções padrão foram submetidas ao mesmo tratamento.

Amostras de água mineral foram adquiridas em supermercados locais e as águas de torneiras foram coletadas nas cidades de Piracicaba, Rio Claro, Americana e São Pedro no Estado de São Paulo. Antes da utilização, as amostras foram acidificadas com ácido sulfúrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$.

3.4. Digestão com água régia

Vários procedimentos para a preparação de amostras ambientais e sedimentos são encontrados na literatura envolvendo a digestão assistida por micro-ondas [134,135]. Arslan et al. (2000); Falciani et al. (2000) [134,136] usaram ácido clorídrico e fluorídrico para digestão de solo e de sedimento contendo aluminossilicato. Entretanto, o uso de água régia para a digestão de solos e de sedimentos é muito usado em diversos procedimentos [32,137]. Portanto, no trabalho atual foi usado água régia para digestão das amostras de sedimentos e de material certificado usando um bloco digestor.

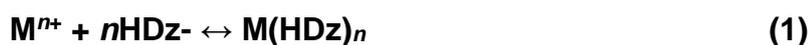
As amostras de sedimentos foram digeridas através de um (bloco digestor) com água régia. A massa de 0,50 g de amostra e 0,25 g do material certificado (BCR-320R) foram pesados em triplicata e colocados em tubos de digestão. Em seguida, foi adicionado em cada tubo, 8 mL de água régia (9 mL de HCl e 3 mL de HNO₃ concentrados) [138]. Depois deixou-se descansar por uma noite tampados com os dedos frios em cima e preenchidos com um volume apropriado de água. No passo seguinte, o bloco digestor com os tubos de digestão foi aquecimento lentamente até a temperatura de 140 °C, mantido durante 30 min e desligado. Após o esfriamento, foi adicionado 5 mL de água purificada e foi aquecido lentamente até a temperatura de 140 °C, e mantida durante 30 min. Após resfriar para a temperatura ambiente, as soluções foram transferidas para balão volumétrico e volume foi completado para 50 mL com água purificada. Após a etapa anterior, as soluções foram filtradas em filtros com acetato de celulose. Após esta etapa, os volumes foram completados para 100 mL com água purificada e transferidos para frascos apropriados.

4. RESULTADOS

4.1. Otimizações

4.1.1. Considerações sobre a ditizona

O método selecionado para determinação fotométrica de mercúrio em sedimento e águas doces, empregando os processos fluxo-batelada e multicomutação em fluxo, baseia-se na reação da ditizona com mercúrio(II), formando um complexo solúvel em meio orgânico, permitindo realizar separação de matriz e pré-concentração [44,139]. Vários íons metálicos formam quelatos com ditizona (H₂Dz) [140,141,142], e são chamados ditizonatos primários ou normais e podem ser representados como M(HDz)_n, onde M é um íon metálico de carga n⁺, como mostra a EQUAÇÃO 1. Os ditizonatos primários são formados quando a ditizona reage com um cátion metálico, agindo como o ânion do ácido monobásico (HDz⁻), por exemplo, Hg(HDz)₂, Zn(HDz)₂, Cu(HDz)₂, Pb(HDz)₂ e Cd(HDz)₂ [142].



Estudos envolvendo a estrutura dos complexos da ditizona com mercúrio, mostram que o metal está ligado ao átomo de enxofre e coordenadamente ligado ao nitrogênio, como mostra a FIGURA 16. De acordo com Nowicka-Jankowska & Irving [142], íons metálicos tais como Cu, Hg, Ag, Pt, Au e Pd, formam ditizonatos secundários, os quais não encontraram aplicações em espectrofotometria. Sua estequiometria corresponde a uma razão M:L (metal-ligante) na proporção molar de 2:n, e é formada quando a ditizona reage com um metal, agindo como o ânion de um ácido dibásico (Dz²⁻), por exemplo, CuDz e Ag₂Dz.

A ditizona preparada em clorofórmio, reage rapidamente com mercúrio(II) em meio com ácido sulfúrico, formando um complexo (ditizonato de mercúrio) de cor laranja. Os espectros de absorção da ditizona e do complexo com mercúrio em clorofórmio, é mostrado na FIGURA 16, onde se observa que a absorção máxima do complexo é em 488 nm, enquanto que, a do branco (ditizona em clorofórmio), é em 600 nm. O coeficiente de absorção molar deste produto, calculado empregando a equação: $\epsilon = A/bc$ [143], onde $\epsilon = 8,5 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Em princípio, podemos imaginar que este reagente, permitiria desenvolver procedimento analítico com alta sensibilidade para a determinação de mercúrio. A composição estequiométrica do quelato (Hg-ditizona) é de 1:2.

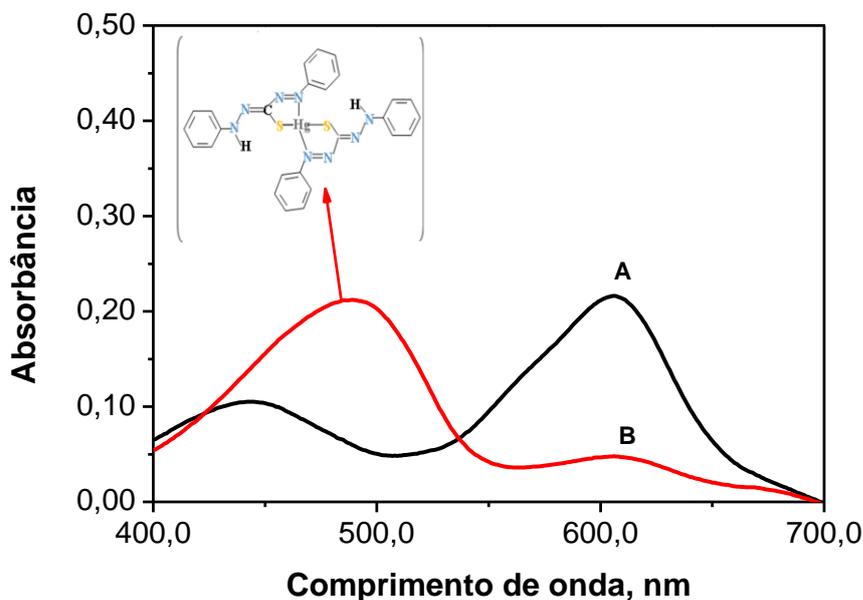


FIGURA16. Espectro absorção da ditizona (A) e do ditizonato de mercúrio (B). Concentração da solução padrão de Hg(II) $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e concentração ditizona $9 \mu\text{mol L}^{-1}$, tanto a solução do ditizonato de mercúrio e da ditizona foram em clorofórmio

Analisando as duas curvas, observa-se que não há superposição significativa entre elas, o que é vantajoso para a detecção fotométrica, empregando diodo emissor de luz (LED) como fonte de radiação. Em geral, os LEDs têm largura de banda de emissão em torno de 25 nm. Aplicando este critério, teríamos a seguinte condição: absorção do composto, $\lambda = 488 \pm 25 \text{ nm}$; absorção da ditizona, $\lambda = 600 \pm 25 \text{ nm}$, portanto um LED com máximo de emissão entre 480 e 495 nm seria apropriado.

4.1.2. Extração Líquido-Líquido em fluxo

A extração líquido-líquido, um dos processos de interesse na implementação deste trabalho, é uma estratégia de separação e pré-concentração. De forma simples, envolve agitação da mistura, constituída pelos seguintes componentes: amostra, reagente e solvente extrator, seguida pela separação das fases. Neste tipo de extração, tem-se a partição seletiva do analito entre duas fases líquidas imiscíveis. Em procedimento manual, em geral, é usado um funil de separação. Geralmente, nesse processo uma das fases é aquosa (amostra) e outra é um solvente orgânico. A seletividade e a eficiência de extração dependem da escolha adequada do reagente cromogênico e do solvente extrator.

Alíquotas de 40,0 mL de solução padrão de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de mercúrio(II) em meio $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido sulfúrico, foi colocado no recipiente de processamento da amostra FIGURA 10. Esta solução foi deslocada para câmara de vidro FIGURA 11, utilizando um minicompresor de ar como indicado na FIGURA 10. Em seguida, uma alíquota de $800 \mu\text{L}$ da ditizona em clorofórmio foi inserida na solução de amostra usando a bomba de seringa reportado na SEÇÃO 3.1.1. Durante essa etapa, o motor de agitação foi acionado para realizar o processo de mistura, girando a 4500 rpm durante 20 s para promover a reação de formação do complexo. Assim que esta etapa foi completada, o motor foi desligado e a solução foi mantida em repouso durante 30 s para se obter a separação das fases. A densidade do clorofórmio é maior que a da água, então, o complexo formado foi depositado no fundo da câmara de extração, a qual foi construída com fundo cônico para facilitar a separação. Depois dessa etapa, a fase orgânica contendo o analito foi aspirado através da bomba de seringa para dentro da cela de fluxo FIGURA 12, permitindo a detecção fotométrica. Na FIGURA 17, são mostrados os registros obtidos processando o branco e uma solução padrão de mercúrio.

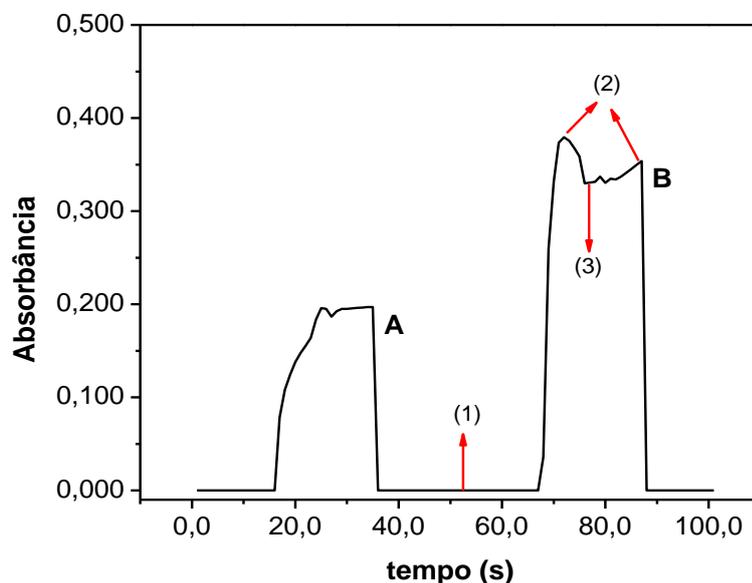


FIGURA 17. Perfil do sinal transiente obtido em ELL em fluxo com detecção fotométrica. (a) referente ao branco; (b) $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} ; (1) sinal referente à passagem da fase aquosa; (2) sinal característicos às perturbações da interface das fases aquosa e orgânica; (3) sinal analítico, referente à passagem da fase orgânica contendo o analito extraído

A FIGURA 17, mostra o perfil do sinal analítico gerado pelo fotômetro em função do tempo. Observa-se que durante a passagem da fase aquosa através da cela de fluxo, o sinal gerado é próximo de zero e constante. Quando a fase orgânica

com a ditizona entra na cela fluxo, há um aumento de sinal representado pela absorvância. A faixa no formato de platô, corresponde ao intervalo de tempo em que a cela de fluxo estava completamente cheia com a zona da amostra (fase orgânica). Em seguida, o sinal retorna à linha de base, indicando que a zona da amostra foi deslocada para o descarte. O registro seguinte foi obtido processando uma solução padrão de mercúrio ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). Não há coalescência na interface líquida entre a fase aquosa e a orgânica, então devido à diferença de índice de refração das fases, quando a fase orgânica penetrava na cela de detecção, causava distorção do sinal, assinalado na FIGURA 17. Observa-se que o mesmo ocorreu com o branco em menor magnitude. O programa de aquisição de dados foi elaborado com recursos para reconhecer essa perturbação, e tomar como medida, a média de 15 leituras realizadas a partir do ponto (3), assinalado na FIGURA17. Quando o Arduino Due detectava uma variação da absorvância acima de 0,1, esperava um intervalo de tempo de 4,0 s. Em seguida, realizava 15 leituras com intervalos de tempo de 0,2 s entre elas, calculava a média e apresentava o valor no vídeo do computador. Este recurso foi adotado, considerando-se que a vazão da bomba de seringa, tinha uma precisão da ordem 1,0 %, portanto a zona da amostra dentro da cela fluxo no ato da detecção, representava sempre a mesma condição.

4.1.3. Estudo da acidez do meio

A ditizona pode formar complexos com diferentes íons metálicos [140] e, por isso, seu uso para fins analíticos poderia ser dificultado. Essa desvantagem pode ser superada, ajustando a acidez do meio, assim o efeito da acidez foi o primeiro parâmetro investigado, usando soluções dos ácidos clorídrico, nítrico e sulfúrico. Para realizar esses procedimentos, foram preparadas soluções estoque de 6 mol L^{-1} de cada ácido. A partir destas soluções, foram preparadas soluções padrão de Hg^{2+} (branco, 5 e $10 \mu\text{g L}^{-1}$) com acidez $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, foi feita uma série de extração no sentido de verificar qual ácido seria apropriado. A fase aquosa foi recolhida para determinar a concentração de mercúrio remanescente em um espectrômetro de absorção atômica (CVAAS). O coeficiente de distribuição (D) e a eficiência de extração (%E) foram calculados usando as equações (2) e (3) [144].

$$D = \left\{ \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right\} \times \left(\frac{V_{aq}}{V_{org}} \right) \quad (2)$$

$$\%E = \left\{ \frac{(C_i - C_f)}{C_f} \right\} \times 100 \quad (3)$$

Onde C_i e C_f representam as concentrações inicial e final de Hg^{2+} na fase aquosa, respectivamente. O resultado destes testes pode ser visto na FIGURA 18.

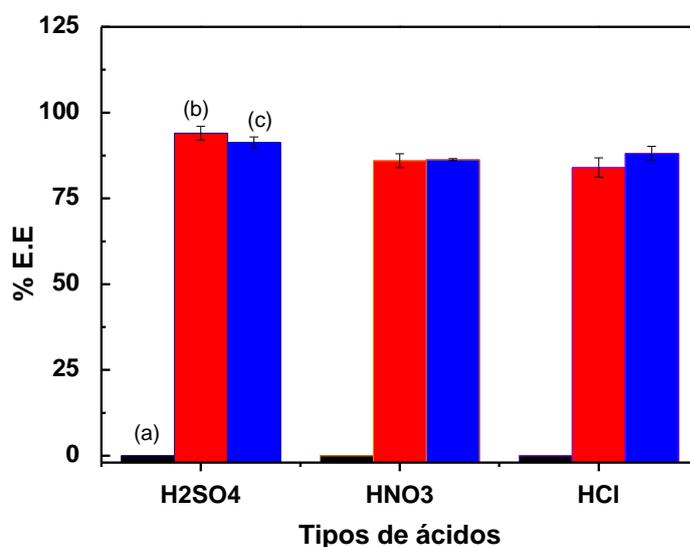


FIGURA18. Estudo do meio ácido. (a) branco; (b) padrão de Hg (5,0 µg L⁻¹) e (c) padrão de Hg (10,0 µg L⁻¹). Outros parâmetros: concentração de ditizona 9 µmol L⁻¹ em 1 mL de clorofórmio; acidez 0,3 mol L⁻¹; tempo de extração e de separação 20 e 25 s, respectivamente

Observa-se que os resultados obtidos com ácido sulfúrico têm maior magnitude, indicando que é mais eficiente, e por isso, foi selecionado para este trabalho. Esta escolha está em conformidade com a literatura, onde o ácido sulfúrico é o mais utilizado em trabalhos similares [44,145,146,147].

4.1.4. Efeito da acidez

O efeito da acidez foi avaliado, usado o branco e uma solução padrão de mercúrio 10 µg L⁻¹, preparadas em meio de ácido sulfúrico e nítrico, variando a concentração de 0,00 a 1,50 mol L⁻¹. A concentração da solução do agente quelante (ditizona em clorofórmio) foi mantida em 9 µmol L⁻¹. O resultado deste experimento pode ser visto na FIGURA 19.

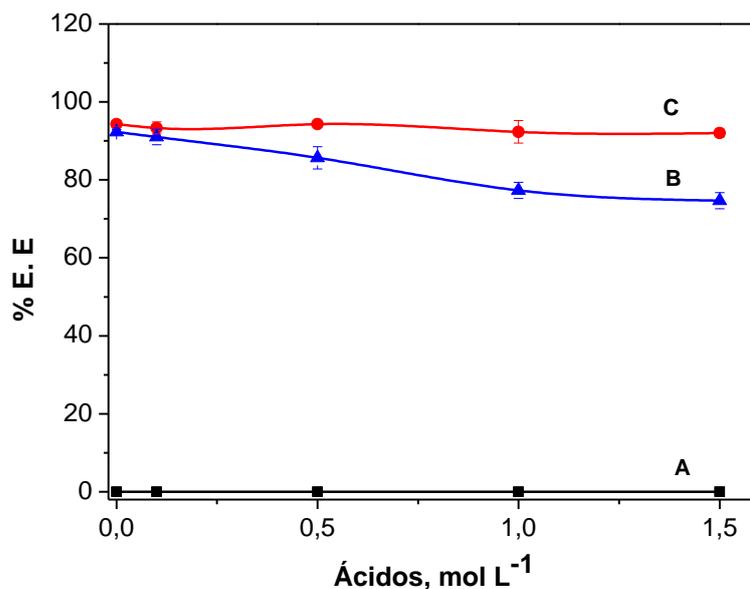


FIGURA 19. Efeito da concentração dos ácidos. A curva (A) refere-se ao branco para ambos os ácidos, (B) refere-se a solução de Hg(II) 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em ácido nítrico 0,3 mol L⁻¹ e (C) está relacionada com a soluções de Hg(II) 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ em ácido sulfúrico 0,3 mol L⁻¹. Outros parâmetros foram: concentração da ditizona 9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio, intervalos de tempo da reação e de repouso 20 e 25 s, respectivamente e velocidade da rotação da mistura, 4500 rpm

Analisando estas curvas, observa-se uma diminuição acentuada na eficiência da extração em meio ácido nítrico, indicando que aumento da concentração de ácido nítrico compromete a eficiência da extração. A curva (C) mostra que não há diferença significativa em relação a concentração do ácido sulfúrico. Com base nestes resultados, foi selecionada a concentração de 0,3 mol L⁻¹ para os outros ensaios. Esta ampla tolerância na variação da acidez, usando ácido sulfúrico é uma informação relevante, pois um controle rígido da acidez do meio nesta faixa de concentração, via tamponamento, é muito difícil.

4.1.5. Efeito do tempo de extração

Em procedimento de extração com solvente orgânico, o intervalo de tempo para formar o composto de interesse na fase orgânica, desempenha um papel fundamental. Se for um tempo curto, a transferência do analito entre as duas fases pode ser incompleta, prejudicando a sensibilidade. Por outro lado, se for um tempo muito longo, a produtividade do procedimento analítico pode ser prejudicada. Nesse sentido, uma condição de compromisso deve ser estabelecida, para obter melhor sensibilidade sem sacrificar a produtividade. Com o objetivo de encontrar essa condição, um conjunto de ensaios foi realizado, variando o intervalo de tempo para extração de 0,0 a 55 s. Neste caso, a agitação da mistura das fases

aquosa e orgânica foi obtida com a haste de vidro, acoplada ao motor na câmara de separação FIGURA 13, girando a 4500 rpm. Os resultados são mostrados na FIGURA 20.

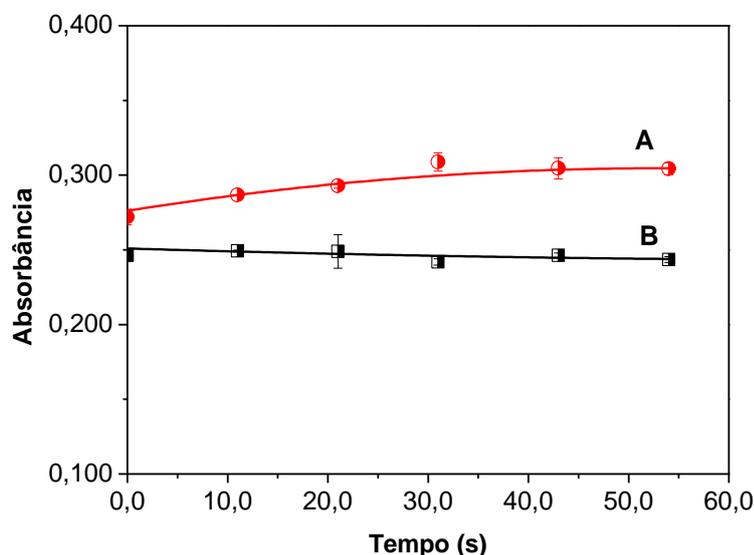


FIGURA 20. Efeito do tempo de extração. Condição experimental: solução padrão de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e branco, ambas em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; volume da solução padrão 30 mL; tempo de separação 20 s e rotação da haste de mistura, 4500 rpm

Analisando os resultados mostrados na FIGURA 20, observa-se que para a solução do branco, a variação do sinal não é significativa, e este resultado seria esperado, pois não haveria presença de íons Hg(II) na solução. Para a solução padrão de Hg(II), ocorreu um aumento até o intervalo de tempo de 30 s, apresentando valores praticamente idênticos para intervalos de tempo maiores. Considerando estes resultados, o intervalo de tempo de extração de 30 s foi selecionado para realizar os demais ensaios.

4.1.6. Efeito do tempo de separação

O intervalo de tempo necessário para a sedimentação da fase orgânica na câmara de separação, é um parâmetro que deve ser considerado. O volume do solvente coletado deve ser suficiente para encher a cela de fluxo do fotômetro, que apresenta uma relação de dependência com o intervalo de tempo de separação. Com o objetivo de encontrar a melhor condição, foram realizados ensaios variando o intervalo de tempo de separação de 2 a 25 s. Para estes ensaios, foram utilizados uma solução padrão $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e do branco, obtendo os resultados mostrados na FIGURA 21.

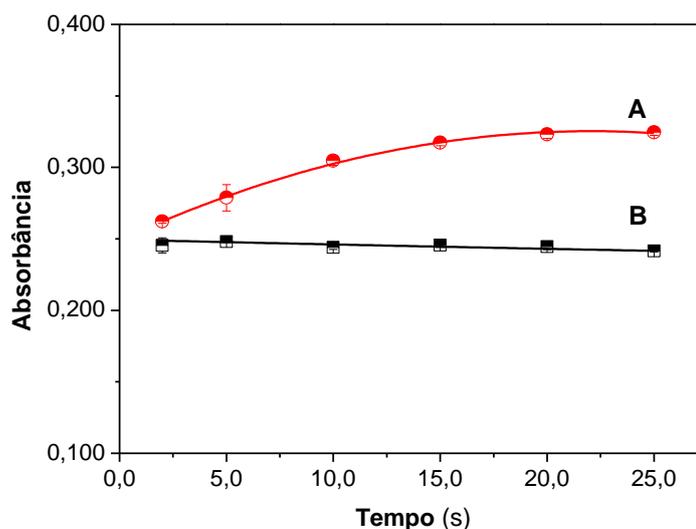


FIGURA 21. Efeito do intervalo de tempo de separação. Outras condições experimentais: solução padrão de $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e do branco, ambas em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; volume da solução padrão 30 mL; tempo de extração 30 s e rotação da haste de mistura, 4500 rpm

Analisando estas curvas, entende-se que para a solução do branco não ocorreu variação significativa na magnitude dos sinais, no entanto, ocorreu um aumento significativo para a solução padrão de Hg(II), até o intervalo de tempo de 20 s. Isto significa que o equilíbrio das fases aquosas e orgânica, ocorreu a partir deste intervalo de tempo. Considerando esses resultados, o intervalo de tempo de 20 s foi selecionado como o ponto ótimo entre a sensibilidade e a produtividade.

4.1.7. Efeito do volume da amostra

O objetivo da metodologia de pré-concentração usando um solvente orgânico, é transferir para a fase orgânica, o analito dissolvido em um volume de amostra maior que o volume da fase orgânica. Com o objetivo de encontrar essa condição, os ensaios foram realizados, utilizando uma solução de ditizona $9 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio, uma solução padrão $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e o branco em meio ácido sulfúrico $0,3 \text{ mol L}^{-1}$. Os resultados relacionados à variação do volume da amostra são mostrados na FIGURA 22.

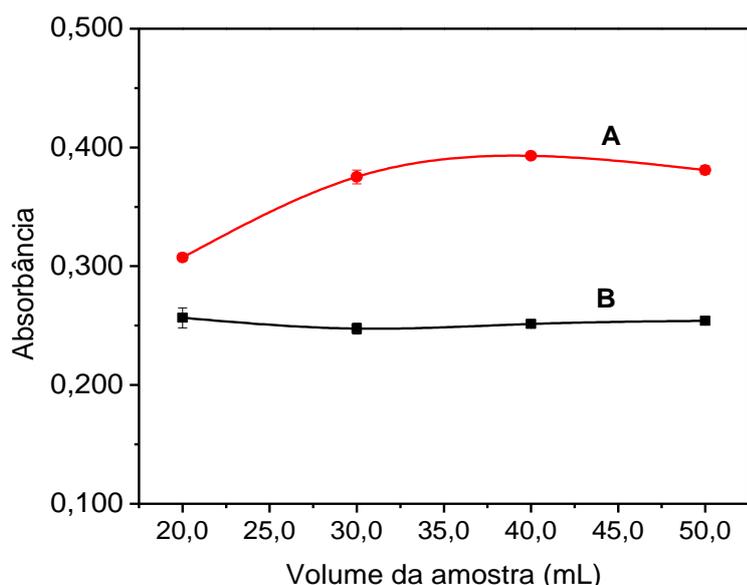


FIGURA 22. Efeito do volume da amostra. As curvas (A) e (B) correspondem à solução de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e do branco em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Outras condições experimentais: solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em 1 mL de clorofórmio; tempo de extração e separação 30 e 20 s, respectivamente, e rotação de mistura 4500 rpm

Analisando este conjunto de curvas, observa-se que para o volume da amostra variando de 20 a 50 mL, as medidas com o branco não apresentam variação significativa, enquanto que a curva (A) apresenta um aumento significativo, indicando que o volume da amostra pode ser aumentado para melhorar a sensibilidade do método, então o volume da amostra foi fixado em 40 mL.

4.1.8. Efeito da concentração da ditizona

O efeito da concentração do complexante (ditizona) foi estudado usando as seguintes concentrações: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; e $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Analisando as curvas mostradas na FIGURA 23, observa-se que até a concentração de $6,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ditizona, a curva A apresenta inclinação maior que a curva do branco. Este efeito pode indicar que a quantidade do reagente complexante era insuficiente. A partir da concentração de $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, as curvas tendem a ser paralelas, indicando que havia reagente suficiente, então a concentração $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi selecionada.

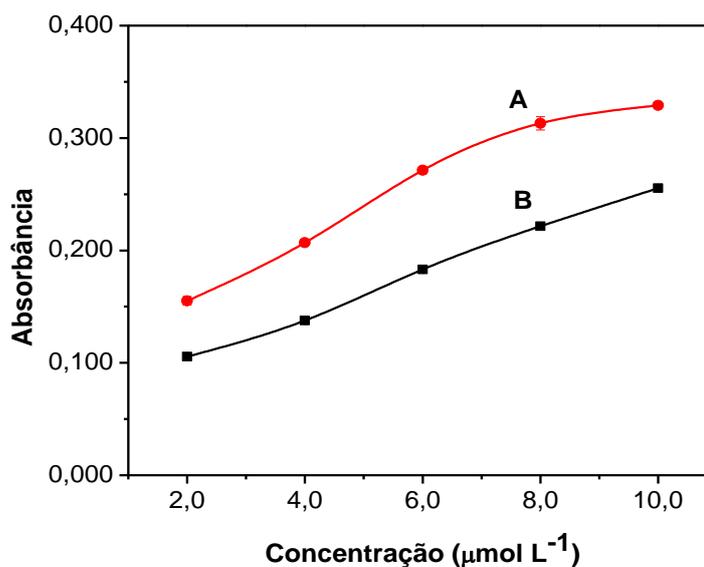


FIGURA 23. Efeito da concentração da ditizona. As curvas (A) e (B) correspondem à solução de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de íons Hg(II) e ao branco em meio H_2SO_4 $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. Outras condições experimentais: tempo de extração e separação (30 e 20 s) e rotação de mistura 4500 rpm

4.1.9. Efeito do volume de clorofórmio

Os resultados discutidos nas seções anteriores, foram obtidos utilizando o volume de 1,0 mL de clorofórmio, escolhido como diluente para ditizona e como agente de extração para separação do complexo Hg(II) -ditizona. A ditizona está dissolvida no clorofórmio, portanto o volume do solvente na câmara de separação, pode afetar a estequiometria da reação e também a sensibilidade do procedimento analítico. Com o intuito de definir a melhor condição de funcionamento, um conjunto de ensaios foi realizado para esta finalidade. Os resultados são mostrados na FIGURA 24.

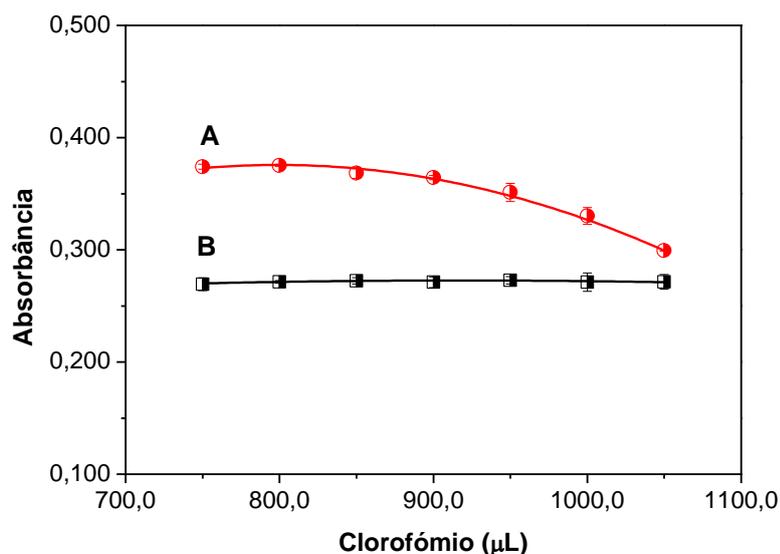


FIGURA 24. Efeito do volume de clorofórmio. Condição experimental: soluções padrão de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) e branco em meio de H_2SO_4 a $0,3 \text{ mol L}^{-1}$; solução de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$; e outros parâmetros como nas seções precedentes

Analisando os resultados apresentados na FIGURA 24, observa-se que as medidas relacionadas à solução do branco, não apresentam variação significativa, enquanto aquelas relacionadas à solução de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II) não apresentam variação significativa até o volume de $850 \mu\text{L}$. Para volumes maiores, observa-se uma diminuição significativa. Aumentando o volume de clorofórmio, a quantidade de ditizona também aumentou, isto porque a ditizona foi diluída em clorofórmio, portanto, a diminuição na magnitude do sinal não foi causada por deficiência de reagente. Então, podemos atribuir que este efeito foi causado pela diluição do analito no solvente. Com base nesses resultados, o volume de clorofórmio selecionado foi de $800 \mu\text{L}$, o que era suficiente para preencher a cela de detecção.

4.2. Desempenho analítico

As características analíticas para determinação de mercúrio(II) foram estudadas sob condições ótimas. A curva analítica foi obtida usando 40 mL de soluções padrão de $0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0$ e $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg^{2+} . Parâmetros analíticos para a determinação do complexo Hg-ditizona são apresentados na TABELA 3, e a curva analítica é mostrada na FIGURA 25. Outros parâmetros analíticos importantes são apresentados seguir: limite de detecção (LOD) de $0,39 \mu\text{g L}^{-1}$, calculado usando a relação $3 \cdot D/S$, onde S é o coeficiente angular

da curva analítica e D é o desvio padrão do branco; desvio padrão relativo (RSD) de 0,603% (n = 10), obtido usando uma solução padrão de $4,0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Hg}^{2+}$.

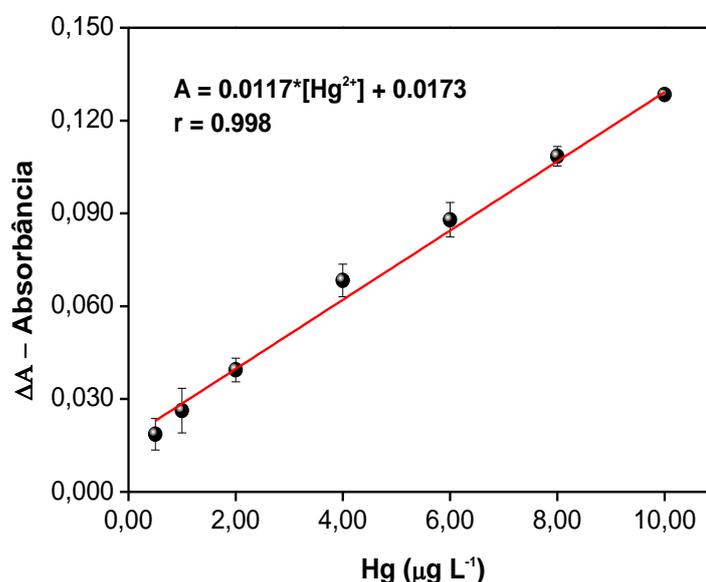


FIGURA 25. Curva analítica. ΔA = absorvância corrigida. Outros parâmetros: concentração de ditizona $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em $750 \mu\text{L}$ de clorofórmio; acidez de $0,30 \text{ mol L}^{-1}$; volume da amostra 40 mL ; tempo de agitação e separação 30 e 20 s ; rotação 4500 rpm

TABELA 4. Parâmetros analíticos selecionados obtidos com otimização experimentais

Parâmetros	Faixa estudada	Valor selecionado
Comprimento de onda, λ_{max} (nm)	400-750	488
Acidez, H_2SO_4 (mol L^{-1})	0,0-1,5	0,3
Tempo de extração (s)	0,0-55	30
Tempo de separação (s)	2,0-25	20
Volume da amostra (mL)	20,0-50,0	40
Concentração da ditizona ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	2,0-10,0	9,0
Volume do clorofórmio (μL)	750-1,10	750
Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,5-10,0	0,5-10,0
Limite de detecção ($\mu\text{g L}^{-1}$)	-	0,39
Reprodutibilidade (%RSD)	-	0,603

4.3. Avaliação dos potenciais interferentes

Com o objetivo de avaliar a interferência que poderia ser causada pelas espécies químicas concomitantes, foram realizados ensaios com os íons listados na SEÇÃO 3.2. Soluções padrão de mercúrio ($10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foram preparadas com presença e ausência em cada espécie química analisada. Para decidir se ocorreu interferência, adotou-se como critério uma variação de 5% nos resultados, tomando

como referência as medidas obtidas sem dopagem da solução padrão de Hg(II) com o potencial interferente. Os resultados destes estudos estão apresentados na TABELA 4. A interferência de íons Fe(III) foi contornada usando como agente mascarante, oxalato $6,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As concentrações dos íons Ag^+ e Au^{3+} são muito baixas em amostra de águas superficiais e Ag^+ não é um interferente significativo na determinação de mercúrio neste tipo de matriz [148].

TABELA 5. Efeito das espécies químicas potencialmente interferentes

Espécie química Adicionado	Razão (Íon/Hg) ^o	Recuperação (%)	Erro (%)
Mn^{2+}	1000	101,4	1,7
Co^{2+}	1000	105,5	1,0
Zn^{2+}	1000	103,1	2,7
Ni^{2+}	1000	103,7	1,5
Cd^{2+}	1000	106,1	0,3
Ca^{2+}	1000	107,1	0,7
Pb^{2+}	1000	107,0	0,8
Al^{3+}	500	95,4	0,6
Cr^{3+}	500	97,3	2,2
Cu^{2+}	300	106,5	1,3
Mg^{2+}	100	102,4	2,6
Mg^{2+}	500	102,9	0,5
$^{\text{a}}\text{Fe}^{3+}$	500	106,8	1,4
Ag^+	0,5	101,1	1,8
Au^{3+}	0,5	104,5	3,8
SO_4^{2-}	1000	104,8	2,1
PO_4^{3-}	1000	100,8	3,2
Cl^-	1000	101,4	0,7
F^-	1000	101,1	0,9
NO_2^-	20	99,4	0,5
(Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} Ni^{2+} , Cd^{2+} , Ca^{2+} Pb^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+})* (SO_4^{2-} , PO_4^{3-} Cl^- , F^- , NO_2^-)*	100	109,5	8,9

^oOs valores nesta coluna correspondem à razão entre a concentração da espécie química e a concentração da solução padrão de Hg(II) $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$. A interferência de $^{\text{a}}\text{Fe}^{3+}$ foi contornado com solução de oxalato $6,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. *Coquetel das espécies químicas e relação de cada uma com solução padrão de Hg(II), conforme indicado na coluna à direita.

Os resultados apresentados na TABELA 5 indicam que o procedimento proposto possui uma tolerância aceitável para interferências que poderiam ser causadas por estas espécies químicas, que foram testadas em concentrações superiores às normalmente encontradas em águas minerais, de torneira e de rios.

4.4. Discussão dos resultados analíticos e comparação de desempenho

Visando comprovar a viabilidade e a eficácia do sistema proposto para a determinação fotométrica de Hg(II), foram analisadas amostras de águas minerais, torneira e rios. Para a avaliação da exatidão, as amostras também foram analisadas empregando um método independente, utilizando como técnica de detecção a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CV AAS) e a metodologia de adição e recuperação. Amostras de águas minerais foram fortificadas com adição de mercúrio em dois níveis de concentrações (2,5 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), então a análise foi realizada em três alíquotas da mesma amostra, sendo duas com dopagem e uma sem. Os resultados da TABELA 6 mostram que a recuperação alcançada está entre 92-108%, portanto é muito boa.

TABELA 6. Resultados referentes à adição e à recuperação em amostras de águas minerais

Amostras Águas	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Procedimento proposto		Referência (CV-AAS)
		Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	0	ND	-	ND
1	2,5	2,6 \pm 0,4	104	2,6 \pm 0,1
	4,0	3,95 \pm 0,3	97,3	3,95 \pm 0,1
	0	ND	-	ND
2	2,5	2,3 \pm 0,1	92	2,3 \pm 0,1
	4,0	3,95 \pm 0,3	92,5	3,95 \pm 0,1
	0	ND	-	ND
3	2,5	2,6 \pm 0,4	104	2,3 \pm 0,2
	4,0	3,9 \pm 0,5	97,5	3,9 \pm 0,1
	0	ND	-	ND
4	2,5	2,45 \pm 0,6	96	2,5 \pm 0,1
	4,0	4,2 \pm 0,3	105,4	4,2 \pm 0,1
	0	ND	-	ND
5	2,5	2,6 \pm 0,4	108	2,5 \pm 0,1
	4,0	4,0 \pm 0,3	100	3,95 \pm 0,2

Nos rótulos dos recipientes das amostras de águas minerais constava as concentrações das seguintes espécies químicas: bário 0,108; estrôncio 0,045; cálcio 6,460; magnésio 2,460, potássio 4,790; sódio 1,190; fosfato 0,450; bicarbonato 21,75; fluoreto 0,04; nitrato 15,91; e cloreto 2,73 mg L⁻¹. Os resultados referentes à recuperação com o teste de adição, comprova que estas espécies químicas não interferem no método proposto. Este resultado está de acordo com os dados relativos aos possíveis interferentes apresentados na TABELA 5.

Águas de torneiras foram analisadas empregando o mesmo procedimento e a mesma metodologia para verificar a exatidão, e os resultados são mostrados na TABELA 7, onde observa-se que a recuperação está na faixa de 95 a 104%, a qual pode ser considerada adequada para amostras nessa faixa de concentrações (µg L⁻¹).

TABELA 7. Resultados e comparações para amostras de águas de torneiras

Amostras Águas*	Adicionado (µg L ⁻¹)	Procedimento proposto		Referência (CV-AAS)
		Encontrado (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)	Encontrado (µg L ⁻¹)
	0	ND	-	ND
1	2,5	2,5 ± 0,1	100	2,4 ± 0,1
	4,0	3,9 ± 0,3	97,5	3,85 ± 0,1
	0	ND	-	ND
2	2,5	2,6 ± 0,1	104	2,4 ± 0,1
	4,0	3,70 ± 0,1	100	3,7 ± 0,1
	0	ND	-	ND
3	2,5	2,5 ± 0,6	100	2,4 ± 0,1
	4,0	3,90 ± 0,7	100	3,9 ± 0,1
	0	ND	-	ND
4	2,5	2,45 ± 0,3	100	2,4 ± 0,1
	4,0	3,8 ± 0,3	95	3,8 ± 0,1
	0	ND	-	ND
5	2,5	2,5 ± 0,1	100	2,5 ± 0,1
	4,0	4,1 ± 0,1	102,5	4,05 ± 0,1

*Amostras de águas de torneiras da região de Piracicaba – SP.

Na TABELA 8, são mostrados os resultados das análises de um conjunto de 5 amostras de águas de rio. As recuperações obtidas estão na faixa de 95 a 107,5%, e pode ser considerada adequada para amostras na faixa de concentrações estudada.

TABELA 8. Resultados e comparações para amostras de águas de rio

Amostras Águas*	Adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Procedimento proposto		Referência (CV-AAS)
		Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	0	ND	-	ND
	2,5	2,45 \pm 0,6	96	2,5 \pm 0,1
	4,0	4,2 \pm 0,2	107,5	4,2 \pm 0,1
2	0	ND	-	ND
	2,5	2,6 \pm 0,5	108	2,5 \pm 0,2
	4,0	3,95 \pm 0,5	97,5	4,05 \pm 0,1
3	0	ND	-	ND
	2,5	2,6 \pm 0,3	104	2,5 \pm 0,1
	4,0	4,25 \pm 0,2	102,5	4,25 \pm 0,1
4	0	ND	-	ND
	2,5	2,55 \pm 0,5	100	2,6 \pm 0,1
	4,0	3,95 \pm 0,3	95	3,95 \pm 0,2
5	0	ND	-	ND
	2,5	2,45 \pm 0,4	100	2,4 \pm 0,2
	4,0	4,1 \pm 0,3	105	4,05 \pm 0,1

* Amostras de águas de rio.

As amostras analisadas foram separadas em dois grupos contendo as amostras fortificadas nas concentrações de 2,5 e 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg(II). Aplicando-se o teste-*t* pareado entre os resultados obtidos com o método de referência e o proposto, em cada grupo de amostra, com nível de confiança de 95% para 14 graus de liberdade, foram encontrados os valores de 2,03 e 1,9 para as amostra com adição de 2,5 e 4,0 L^{-1} Hg(II), respectivamente. O valor crítico (*t*-tabelado) correspondente é 2,14, portanto não há diferença significativa entre os resultados.

Visando comparar o desempenho do procedimento proposto com trabalhos publicados, foram reunidos na TABELA 9 os parâmetros analíticos a serem avaliados.

TABELA 9. Comparação de desempenho

Método	Analito	Amostras	*Téc. Prep. Amostra	Volume da amostra (mL)	Tipo de solvente de extração	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	^a FE	Ref.
UV-vis	Hg ²⁺	Águas salinas	SDME	10	1-decanol	6,4-100,8	1,9	8,5	203	[149]
UV-vis	Hg ²⁺	Águas termais, torneiras e residuais	VALLME	5	Tolueno:dicloetano	8-200	1,5	4,9	-	[150]
UV-vis	Hg ²⁺	Águas mineral, mar e rio	ISFME	5	**[Hmim][PF ₆]	2,0-150	0,7	1,94	37	[151]
ICP-OES	Hg ²⁺	Águas de torneiras, mineral e rio	CPE	10	Triton X-114	10-100	1,1	3,2	51	[152]
UV-vis	Hg ²⁺	Águas mineral, rio e torneira	DLLME	10	Acetonitrila:CCl ₄	10-300	2,8	1,9	175	[68]
UV-vis	Hg ²⁺	Águas de rios e torneiras	CPE	50	Triton X-114	10-1000	1,65	1,85	-	[153]
ICP-OES	Hg ²⁺	Água sanitária	UV-irradiação	25	-	5-50	1,2	4	-	[154]
Fotometria	Hg ²⁺	Águas minerais, torneira e rio	LLE	40	Clorofórmio	0,5-10	0,38	1,38	29	Este trabalho

* Técnicas de pré-concentração. ^aFE = Fator de enriquecimento. SDME – Microextração em gota única; VALLME- Microextração líquido-líquido agitado por vortex; ISFME – Simples Microextração com formação in situ; CPE – Extração em ponto nuvem; DLLME – Microextração líquido-líquido dispersiva e LLE – Extração líquido-líquido. **Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazólio.

Tomando-se faixa de concentração e o volume da amostra usado para análise como os parâmetros a serem avaliados, observa-se que o volume da amostra utilizado na referência [153] foi 20% maior do que o trabalho atual, mas sua faixa de concentração é dez vezes maior que o último padrão deste trabalho, resultando em menor sensibilidade. Os outros trabalhos usaram menores volumes de amostra, mas a faixa de concentrações é menos favorável do que a do trabalho atual. O limite de detecção também é um parâmetro que deve ser avaliado, e como podemos ver, o resultado do trabalho atual é comparável ou melhor. Nesse sentido, uma visão geral dos resultados apresentados na TABELA 9, mostra que são favoráveis ao procedimento proposto.

O consumo de reagente e a taxa de amostragem no presente trabalho foram de 0,18 mg de ditizona e 20 de determinação h^{-1} , respectivamente. Esses dois parâmetros devem afetar a sustentabilidade ambiental do procedimento analítico e seus gastos operacionais, mas não foram mostrados nos trabalhos citados, portanto uma comparação não foi possível.

4.5. Determinação de Hg(II) em sedimentos

Visando avaliar a viabilidade do procedimento analítico proposto para a determinação de mercúrio em sedimentos, foram analisadas uma amostra de referência certificada BCR-320R ($0,85 \pm 0,09 \text{ mg kg}^{-1}$) e um lote amostras de sedimento, oriunda de fundo de rios da região de Piracicaba - SP. Para verificar a exatidão do procedimento proposto, as amostras de sedimentos, também foram analisadas por um método independente, utilizando como técnica de detecção espectrometria absorção atômica com vapor frio (CVAAS) e pela metodologia de adição e recuperação de analito.

Os resultados referentes à amostra certificada estão apresentados na TABELA 10. A concentração média de mercúrio encontrada no método proposto foi de $0,76 \pm 0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ e para o método de referência foi de $0,76 \pm 0,008 \text{ mg kg}^{-1}$. Observa-se que estes resultados correspondem a 90 % do valor certificado, portanto podemos considerar que o procedimento proposto é apropriado para determinação de mercúrio em sedimentos.

TABELA 10. Determinação de Hg²⁺ na amostra certificada BCR-320R

CRM	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Método proposto	CV-AAS
		Encontrado (mg kg ⁻¹)	Encontrado (mg kg ⁻¹)
BCR-320R	0,85 ± 0,09	0,76 ± 0,01	0,76 ± 0,008

O método proposto foi aplicado para a determinação de mercúrio em 05 amostras de sedimentos, oriundas de rios da região de São Paulo, e os resultados são mostrados na TABELA 11, onde observa-se que as recuperações foram de 90-109%. Aplicando o teste *t*-pareado com 95% de probabilidade (*n* = 9), o valor encontrado foi 2,1 e o *t*-tabelado é 2,3, portanto não há diferença significativa nas concentrações de Hg²⁺ encontradas nas amostras de sedimentos usando os dois métodos.

TABELA11. Resultados e comparações de concentrações de Hg em amostras de sedimentos

Amostras	Método proposto		Método de referência CV-AAS	
	Adicionado (mg kg ⁻¹)	Encontrado (mg g ⁻¹)	Encontrado (mg g ⁻¹)	Rec. (%)
Sedimento 1	0	0,20 ± 0,02	0,14 ± 0,01	-
	0,5	0,65 ± 0,04	0,60 ± 0,03	90
	0,8	0,95 ± 0,02	0,90 ± 0,01	94
Sedimento 2	0	<LD	N/D	-
	0,5	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	101
	0,8	0,90 ± 0,03	0,76 ± 0,01	109
Sedimento 3	0	<LD	0,10 ± 0,01	-
	0,5	0,58 ± 0,01	0,60 ± 0,01	116
	0,8	0,86 ± 0,01	0,80 ± 0,01	107
Sedimento 4	0	<LD	N/D	-
	0,5	0,51 ± 0,01	0,44 ± 0,01	101
	0,8	0,90 ± 0,01	0,73 ± 0,01	107
Sedimento 5	0	<LD	N/D	-
	0,5	0,51 ± 0,02	0,45 ± 0,01	102
	0,8	0,74 ± 0,01	0,72 ± 0,01	93

Somente em uma amostra foi encontrado mercúrio, a qual está em concentração maior que o valor estabelecido pelo CONAMA [155] para material dragado oriundos de águas doces classe I (0,17 mg kg⁻¹ Hg) e classe II (0,486 mg kg⁻¹Hg).

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, um protótipo de equipamento associando as abordagens multicomutação e fluxo-batelada, foi projetado e usado para desenvolver um procedimento analítico automático, destinado à determinação fotométrica de mercúrio(II) em nível de nanogramas em águas potável e sedimentos. Os resultados mostram que o objetivo foi atingido. Com exceção a substituição da amostra, todas as etapas do procedimento analítico foram realizadas sem qualquer intervenção por parte do analista. Nesse sentido, podemos concluir que a configuração implementada neste trabalho permite o desenvolvimento de um procedimento analítico automático.

Os resultados exibidos na seção anterior nos permitem concluir que tanto o protótipo, quanto o procedimento analítico são viáveis para a determinação de mercúrio em água potável, bem como em amostras de sedimentos em um nível que atende às recomendações das agências reguladoras WHO, EPA [8,9]. Atende também, às regulamentações para sedimentos de material dragado classe I e II do CONAMA e EPA [155,9].

O arranjo proposto deve ser considerado de baixo custo, incluindo também sua manutenção de trabalho, enquanto que o procedimento analítico apresenta consumo reduzido de reagente e de solvente orgânico. Nesse sentido, podemos concluir que o método implementado com módulo de análise proposto, é uma ferramenta de uso fácil para a triagem de mercúrio em águas fluviais ou lacustres, como também para sedimentos. O consumo de 800 μL de clorofórmio por determinação atende ao requisito do princípio da Química Verde (*Green Analytical Chemistry* - GAC) relativo à geração de resíduos.

REFERÊNCIAS

- ¹ JAMSHIDI, S.; ROFOUEI, M. K.; SEIDI, S. & EMMER, Å. Applicability of a magnetic bucky gel for microextraction of mercury from complicated matrices followed by cold vapor atomic absorption spectroscopy. **Sep. Sci. Technol.** 9 p., 2019. DOI: 10.1080/01496395.2019.1597120.
- ² VELÁSQUEZ-LÓPEZ, P. C.; VEIGA, M. M.; KLEIN, B.; SHANDRO, J. A.; HALL, KEN. Cyanidation of mercury-rich tailings in artisanal and small-scale gold mining: identifying strategies to manage environmental risks in Southern Ecuador. **J Clean. Prod.** **19**: 1125-1133, 2011.
- ³ OPIISO, E. M.; ASENEIRO, J. P. J.; BANDA, M. H. T. & TABELIN, C. B. Solid-phase partitioning of mercury in artisanal gold mine tailings from selected key areas in Mindanao, Philippines, and its implications for mercury detoxification. **Waste Manag. Res.** **36**: 269-276, 2018.
- ⁴ TUNSU, C.; EKBERG, C. & RETEGAN, T. Characterization and leaching of real fluorescent lamp waste for the recovery of rare earth metals and mercury, **Hydrometallurgy** **144–145**: 91-98, 2014.
- ⁵ LIDE, D. R. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 86a ed. Boca Raton, CRC Press, 2005. p. 721.
- ⁶ CLARKSON, T. W. The Toxicology of Mercury. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** **34**: 369-403, 1997.
- ⁷ DRISCOLL, C. T.; MASON, R. P.; CHAN, H. M.; JACOB, D. J. & PIRRONE, N. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. **Environ. Sci. Technol.** **47**: 4967-4983, 2013.
- ⁸ WHO. Mercury and health. Geneva, 2017. <https://bit.ly/2QfzkhL>, acessado em 15/04/19.
- ⁹ US EPA. Health Effects of Exposures to Mercury. Washington, DC, 2005. <https://bit.ly/2ajYgM9>, acessado em 15/04/19.
- ¹⁰ KALLITHRAKAS-KONTOS, N. & FOTEINIS, S. Recent advances in the analysis of mercury in water – Review. **Curr. Anal. Chem.** **12**: 22-36, 2016.
- ¹¹ LEOPOLD, K.; FOULKES, M. & WORSFOLD, P. J. Preconcentration techniques for the determination of mercury species in natural waters. **TrAC - Trends Analyt. Chem.** **28**: 426-435, 2009.
- ¹² LEOPOLD, K.; FOULKES, M. & WORSFOLD, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review. **Anal. Chim. Acta** **663**: 127-138, 2010.

-
- ¹³ HARADA, M. Minamata disease - methylmercury poisoning in Japan caused by environmental-pollution. **Crit. Rev. Toxicol.** **25**: 1-24, 1995.
- ¹⁴ BAKIR, F.; DAMLUJI, S. F.; AMINZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; ALRAWI, N. Y.; TIKRITI, S.; DHAHIR, H. I.; CLARKSON, T. W.; SMITH, J. C. & DOHERTY, R. A. Methylmercury poisoning in Iraq - interuniversity report. **Science** **181**: 230-241, 1973.
- ¹⁵ WHEATLEY, B. & PARADIS, S. Exposure of Canadian aboriginal peoples to methylmercury. **Water Air Soil Pollut.** **80**: 3-11, 1995.
- ¹⁶ IKINGURA, J. R. & AKAGI, H. Monitoring of fish and human exposure to mercury due to gold mining in the Lake Victoria goldfields, Tanzania. **Sci. Total Environ.** **191**: 59-68, 1996.
- ¹⁷ GUIMARAES, J. R. D.; ROULET, M.; LUCOTTE, M. & MERGLER, D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajos river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. **Sci. Total Environ.** **261**: 91-98, 2000.
- ¹⁸ VIL'PAN, Y. A.; GRINSHTEIN, I. L.; AKATOV, A. A. & GUCER, S. Direct atomic absorption determination of mercury in drinking water and urine using a two-step electrothermal atomizer. **J Anal. Chem.** **60**: 38-44, 2005.
- ¹⁹ ULLRICH, S. M.; TANTON, T. W. & ABDRAHITOVA, S. A. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. **Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.** **31**: 241-293, 2001.
- ²⁰ ZHENG, L.; LIU, G. & CHOU, C. The distribution, occurrence and environmental effect of mercury in Chinese coals. **Sci. Total Environ.** **384**: 374-383, 2007.
- ²¹ FENG, X.; MENG, B.; YAN, H.; FU, X.; YAO, H. & SHANG, L. Analysis of Mercury Species in the Environmental Samples. In: _____. Biogeochemical Cycle of Mercury in Reservoir Systems in Wujiang River Basin. Singapore, Southwest China Springer, 2018. pp. 9-19.
- ²² CELO, V.; LEAN, D. R. S. & SCOTT, S. L. Abiotic methylation of mercury in the aquatic environment. **Sci. Total Environ.** **368**: 126-137, 2006.
- ²³ LEHNHERR, I. Methylmercury biogeochemistry: a review with special reference to Arctic aquatic ecosystems. **Environ. Rev.** **22**: 229-243, 2014.
- ²⁴ TAKENO, N. Atlas of Eh-pH Diagrams, Intercomparison of Thermodynamic Databases. Tsukuba, Ibaraki, Japan, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (NIAIST), Research Core for Deep Geological Environments, 2005.
- ²⁵ SAKAMOTO, H.; TOMIYASU, T. & YONEHARA, N. The contents and chemical forms of mercury in sediments from Kagoshima bay, in comparison with Minamata bay and Yatsushiro sea, Southwestern Japan. **Geochem. J.** **29**: 97-105, 1995.

-
- ²⁶ FUJIKI, M. & TAJIMA, S. The pollution of Minamata bay by mercury. **Water Sci. Technol.** **25**: 133-140, 1992.
- ²⁷ HSU-KIM, H.; KUCHARZYK, K. H.; ZHANG, T. & DESHUSSES, M. A. Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: a critical review. **Environ. Sci. Technol.** **47**: 2441-2456, 2013.
- ²⁸ DA SILVA, M. J.; PAIM, A. P. S.; PIMENTEL, M. F.; CERVERA, M. L. & DE LA GUARDIA, M. Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. **Anal. Chim. Acta**, **667**: 43-48, 2010.
- ²⁹ WHO. Environmental Health Criteria for Methyl Mercury. Programme on Chemical Safety. Geneve, 1990.
- ³⁰ US EPA. <https://bit.ly/2K2MVVI>, acessado em 24/05/19.
- ³¹ CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT – CCME. Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life. Winnipeg, 1999. <https://bit.ly/2QuANxL>, acessado em 24/05/19.
- ³² SMITH, R. G. Determination of mercury in environmental samples by isotope dilution ICPMS. **Anal. Chem.** **65**: 2485–2488, 1993.
- ³³ CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2004. Resolução nº. 344, de 25 de março de 2004. <https://bit.ly/2HYsWnY>, acessado em: 24/05/19.
- ³⁴ CIZDZIEL, J. V.; TOLBERT, C. & BROWN, G. Direct analysis of environmental and biological samples for total mercury with comparison of sequential atomic absorption and fluorescence measurements from a single combustion event. **Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc.** **65**: 176-180, 2010.
- ³⁵ JIANG, H.; HU, B.; CHEN, B. & ZU, W. Hollow fiber liquid phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of methylmercury in human hair and sludge samples. **Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc.** **63**: 770-776, 2008.
- ³⁶ KRATA, A. & BULSKA, E. Critical evaluation of analytical performance of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for mercury determination. **Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc.** **60**: 345-350, 2005.
- ³⁷ LENG, G.; FENG, L.; LI, S.-B.; QIAN, S. & DAN, De-Z. Determination of mercury (Hg) in sediment by a sequential injection (SI) system with cold vapor generation atomic fluorescence spectrometry (CVAFS) detection after a rapid and mild microwave-assisted digestion. **Environ. Forensics** **14**: 9-15, 2013.
- ³⁸ DENMARK, I. S.; BEGU, E.; ARSLAN, Z.; HAN, F. X.; SEITER-MOSER, J. M. & PIERCE, E. M. Removal of inorganic mercury by selective extraction and coprecipitation for determination of methylmercury in mercury-contaminated

soils by chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). **Anal. Chim. Acta** **1041**: 68-77, 2018.

³⁹ PIETILÄ, H.; PERÄMÄKI, P.; PIISPANEN, J.; MAJURI, L.; STARR, M.; NIEMINEN, T.; KANTOLA, M. & UKONMAANAHO, L. Determination of methyl mercury in humic-rich natural water samples using N₂-distillation with isotope dilution and on-line purge and trap GC-ICP-MS. **Microchem. J.** **112**: 113-118, 2014.

⁴⁰ DOS SANTOS, J. S.; DE LA GUÁRDIA, M.; PASTOR, A. & DOS SANTOS, M. L. P. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS. **Talanta** **80**: 207-211, 2009.

⁴¹ KRATA, A.; PYRZYNSKA, K. & BULSKA, E. Use of solid-phase extraction to eliminate interferences in the determination of mercury by flow-injection CV AAS. **Anal. Bioanal. Chem.** **377**: 735-739, 2003.

⁴² FRANCA DA SILVA, D. L.; PITTA DA COSTA, M. A.; BASTOS SILVA, L. O. & LOPES DOS SANTOS, W. N. Simultaneous determination of mercury and selenium in fish by CVG AFS. Anais do VIII Brazilian Workshop of Chemometrics - Application of Chemometrics Techniques in Food Chemistry, Salvador, Brazil, 2017.

⁴³ YU, X.; LIAO, Z. H. & JIANG, Z. C. Study of the simultaneous determination of trace arsenic and mercury by flow injection/hydride generation/ICP-AES. **Anal. Lett.** **32**: 2105-2114, 1999.

⁴⁴ AHMED, M. J. & ALAM, M. S. A rapid spectrophotometric method for the determination of mercury in environmental, biological, soil and plant samples using diphenylthiocarbazone. **J. Spectrosc.** **17**: 45-52, 2003.

⁴⁵ US EPA. Method 1631, Revision E: Mercury in Water by Oxidation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. Washington, DC, 2002. <https://bit.ly/2RDheSQ>, acesso em 17/10/18.

⁴⁶ US EPA. Method 1630, Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. Washington, DC, 1998. <https://bit.ly/2MILaMe>, acesso em 17/10/18.

⁴⁷ QIN, D. Y.; GAO, F.; ZHANG, Z. H.; ZHAO, L. Q.; LIU, J. X.; YE, J. P.; LI, J. W. & ZHENG, F. X. Ultraviolet vapor generation atomic fluorescence spectrometric determination of mercury in natural water with enrichment by on-line solid phase extraction. **Spectrochim. Acta Part B: At. Spectrosc.** **88**: 10-14, 2013.

⁴⁸ LEOPOLD, K.; ZIERHUT, A. & HUBER, J. Ultra-trace determination of mercury in river waters after online UV digestion of humic matter. **Anal. Bioanal. Chem.** **403**: 2419-2428, 2012.

⁴⁹ BOZKURT, S. S.; OCAKOGLU, K. & MERDIVAN, M. Separation and preconcentration of mercury in water samples by ionic liquid supported cloud point extraction and fluorimetric determination. **Microchim. Acta** **177**: 47-52, 2012.

-
- ⁵⁰ GHAREHBAGHI, M.; SHEMIRANI, F. & BAGHDADI, M. Dispersive liquid-liquid microextraction based on ionic liquid and spectrophotometric determination of mercury in water samples. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** **89**: 21-33, 2009.
- ⁵¹ JARUJAMRUS, P.; MEELAPSOM, R.; PENCHAREE, S.; OBMA, A.; AMATATONGCHAI, M.; DITCHAROEN, N.; CHAIRAM, S. & TAMUANG, S. Use of a Smartphone as a Colorimetric Analyzer in Paper-based Devices for Sensitive and Selective Determination of Mercury in Water Samples. **Anal. Sci.** **34**: 75-81, 2018.
- ⁵² KONG, Y.; SHEN, J. & FAN, A. Colorimetric method for the detection of Mercury ions based on gold nanoparticles and mercaptophenyl boronic acid. **Anal. Sci.** **33**: 925-930, 2017.
- ⁵³ FIRDAUS, M. L.; FITRIANI, I.; WYANUTUTI, S.; HARTATI, Y. W.; KHAYDAROV, R.; MCALISTER, J. A.; OBATA, H. & GAMO, T. Colorimetric detection of Mercury(II) ion aqueous solution using silver nanoparticles. **Anal. Sci.** **33**: 831-837, 2017.
- ⁵⁴ US EPA. National Primary Drinking Water Regulations. <https://bit.ly/2rJxbyv>, acessado em 28/06/19.
- ⁵⁵ WHO. Mercury in Drinking-water. Geneva. <https://bit.ly/2ZUJx3q>, acessado em 28/06/19.
- ⁵⁶ BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. <https://bit.ly/1UcK3Um>, acessado em 28/06/19.
- ⁵⁷ MIAO, P.; LIU, L.; LI, Y. & LI, G. A novel electrochemical method to detect mercury (II) ions. **Electrochem. Commun.** **11**: 1904-1907, 2009.
- ⁵⁸ HAMMERSCHMIDT, C. & FITZGERALD, W. Bioaccumulation and Trophic Transfer of Methylmercury in Long Island Sound. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** **51**: 416-424, 2006.
- ⁵⁹ GOMEZ-ARIZA, J.; LORENZO, F. & GARCIA-BARRERA, T. Simultaneous determination of mercury and arsenic species in natural freshwater by liquid chromatography with on-line UV irradiation, generation of hydrides and cold vapor and tandem atomic fluorescence detection. **J. Chromatogr. A** **1056**: 139-144, 2004.
- ⁶⁰ CASTILLO, A.; ROIG-NAVARRO, A. F. & POZO, O. J. Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples. **Anal. Chim. Acta** **577**: 18-25, 2006.
- ⁶¹ FAGANELI, J.; HORVAT, M.; COVELLI, S.; FAJON, V.; LOGAR, M.; LIPEJ, L. & CERMELJ, B. Mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). **Sci. Total Environ.** **304**: 315-326, 2003.

-
- ⁶² MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S. & JARDIM, W. F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Quím. Nova** **23**: 487-495, 2000.
- ⁶³ US EPA. Method 245.1: Determination of Mercury in Water by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry. Revision 3.0. Cincinnati, 1994. <https://bit.ly/2YskLHT>, acessado em 28/06/19.
- ⁶⁴ JIANG, H. M.; HU, B.; JIANG, Z. C. & QIN, Y. C. Microcolumn packed with YPA₍₄₎ chelating resin on-line separation/preconcentration combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry using Pd as a permanent modifier for the determination of trace mercury in water samples. **Talanta** **70**: 7-13, 2006.
- ⁶⁵ SEGADE, S. R. & TYSON, J. F. Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C-18 modified. **Talanta**, **71**: 1696-1702, 2007
- ⁶⁶ ZOLFONOUN, E.; ROUHOLLAHI, A. & SEMNANI, A. Solid-phase extraction and determination of ultra-trace amounts of lead, mercury and cadmium in water samples using octadecyl silica membrane disks modified with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and atomic absorption spectrometry. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** **88**: 327-336, 2008.
- ⁶⁷ AFKHAMI, A.; MADRAKIAN, T. & SIAMPOUR, H. Highly selective determination of trace quantities of mercury in water samples after preconcentration by the cloud-point extraction method. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** **86**: 1165-1173, 2006.
- ⁶⁸ NIAZI, A.; MOMENI-ISFAHANI, T. & AHMARI, Z. Spectrophotometric determination of mercury in water samples after cloud point extraction using nonionic surfactant Triton X-114. **J. Hazard. Mater.** **165**: 1200-1203, 2009.
- ⁶⁹ XIANG, G. Q.; LI, L. L.; JIANG, X. M.; HE, L. J. & FAN, L. Thiol-modified magnetic silica sorbent for the determination of trace mercury in environmental water samples coupled with cold vapor atomic absorption spectrometry. **Anal. Lett.** **46**: 706-716, 2013.
- ⁷⁰ ARANDA, P. R.; COLOMBO, L.; PERINO, E.; DE VITO, I. E. & RABA, J. Solid-phase preconcentration and determination of mercury(II) using activated carbon in drinking water by X-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrom.** **42**: 100-104, 2013.
- ⁷¹ ROMERO, V.; GRYGLICKA, M.; DE LA CALLE, I.; LAVILLA, I. & BENDICHO, C. Ultrasensitive determination of mercury in waters via photochemical vapor deposition onto quartz substrates coated with palladium nanoparticles followed by total reflection X-ray fluorescence analysis. **Microchim. Acta** **183**: 141-148, 2016.
- ⁷² BERNALTE, E.; SANCHEZ, C. M. & GIL, E. P. Determination of mercury in ambient water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes. **Anal. Chim. Acta** **689**: 60-64, 2011.

-
- ⁷³ EL AROUI, F.; LAHRICH, S.; FARAHI, A.; ACHAK, M.; EL GAINI, L.; BAKASSE, M.; BOUZIDI, A. & EL MHAMMEDI, M. A. Palladium particles-impregnated natural phosphate electrodes for electrochemical determination of mercury in ambient water samples. **Electroanalysis**, **26**: 1751-1760, 2014.
- ⁷⁴ FERNANDEZ, E.; VIDAL, L.; MARTIN-YERGA, D.; BLANCO, M. D.; CANALS, A. & COSTA-GARCIA, A. Screen-printed electrode based electrochemical detector coupled with ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume back-extraction for determination of mercury in water samples. **Talanta** **135**: 34-40, 2015.
- ⁷⁵ FASHI, A.; YAFTIAN, M. R. & ZAMANI, A. Electromembrane extraction-preconcentration followed by microvolume UV-Vis spectrophotometric determination of mercury in water and fish samples. **Food Chem.** **221**: 714-720, 2017.
- ⁷⁶ IRVING, H. & COX, J. J. Studies with dithizone. Part VIII. Reactions with organometallic compounds. **J. Chem. Soc.** **289**: 1470-1479, 1961.
- ⁷⁷ KOK SENG, L. Extraction of Heavy Metals using Dithizone Method on Seawater. **Eurasia Proc. Sci. Technol. Eng. Math.** **2**: 429-434, 2018.
- ⁷⁸ IRVING, H. M. N. H. *Dithizone*. London, Chemical Society, 1977. p. 106.
- ⁷⁹ IRVING, H. M. N. H. & IWANTSCHIEFF, G. The analytical applications of Dithizone. **Crit. Rev. Anal. Chem.** **8**: 321–366, 1980.
- ⁸⁰ IRVING, H. & WILLIAMS, R. J. P. Metal complexes and partition equilibria. **J. Chem. Soc.** **394**: 1841-1847, 1949.
- ⁸¹ IRVING, H.; COOKE, S. J. H.; WOODGER, S. C. & WILLIAMS, R. J. P. Studies with dithizone. Part II. Dithizone as a monobasic acid. **J. Chem. Soc.** **395**: 1847-1855, 1949.
- ⁸² STARY, J. *The Solvent Extraction of Metal Chelates*. Oxford, Pergamon, 1964. p. 138.
- ⁸³ MARTINS, M. L.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S.; PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B. & ZANELLA, R. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. **Sci. Chromatogr.** **4**: 35-51, 2012.
- ⁸⁴ REZAEI, M.; YAMINI, Y. & FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **J. Chromatogr. A** **1217**: 2342-2357, 2010.
- ⁸⁵ BABA, A. A.; AYINLA, K. I.; ADEKOLA, F. A.; GHOSH, M. K.; ROUT, P. C. & AMBO, A. I. Extraction and purification of copper from a nigerian chalcopyrite ore leach liquor by Dithizone in kerosene. **Solvent. Extr. Res. Dev.** **22**: 135-146, 2015.
- ⁸⁶ HALILI, J.; MELE, A.; ARBNESHI, T.; HALILI, A.; MEHMETI, V.; JUSUFI, K. & BERISHA, A. The evaluation of the dithizone performance as a complexing reagent for Supercritical CO₂ extraction of heavy metals from aqueous solutions. **RAD Conference Proceedings**, **1**: 114-116, 2016.

-
- ⁸⁷ CERDÀ, A. & CERDÀ, V. An introduction to flow analysis. Palma de Mallorca, Sciware, 2009.
- ⁸⁸ CERDÀ, V. & RAMIS, G. An introduction to Laboratory Automation. New York, John Wiley, 1990.
- ⁸⁹ VERA, R.; ZHANG, Y.; FONTÀS, C.; ALMEIDA, M. I. G. S.; ANTICÓ, E.; CATTRALL, R. W. & KOLEV, S. D. Automatic determination of arsenate in drinking water by flow analysis with dual membrane-based separation. **Food Chem.** **283**: 232-238, 2019.
- ⁹⁰ TROJANOWICZ, M. Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications. Singapore, World Scientific, 2000.
- ⁹¹ CHANEAM, S.; KAEWYAI, K.; MANTIM, T.; CHAISUKSANT, R.; WILAIRAT, P. & NACAPRICHA, D. Simultaneous and direct determination of urea and creatinine in human urine using a cost-effective flow injection system equipped with in-house contactless conductivity detector and LED colorimeter. **Anal. Chim. Acta** **1073**: 54-61, 2019.
- ⁹² XIAO, D.; ZHAO, S.; YUAN, H.; YANG, X. CE detector based on light-emitting diodes. **Electrophoresis**, **28**: 233-242, 2007.
- ⁹³ ZHANG, Y.; MIRO, M.; KOLEV, S. D. A novel on-line organic mercury digestion method combined with atomic fluorescence spectrometry for automatic mercury speciation. **Talanta** **189**: 220-224, 2018.
- ⁹⁴ SÁNCHEZ TRUJILLO, I.; VEREDA ALONSO, E.; CANO PAVÓN, J. M. & GARCÍA DE TORRES, A. Use of a new enrichment nanosorbent for speciation of mercury by FI-CV-ICP-MS. **J. Anal. Atom. Spectrom.** **30**: 2429–2440, 2015.
- ⁹⁵ LAI, R.; HUANG, E. L.; ZHOU, F. & WIPF, D. O. Selective Determination of Methylmercury by Flow-Injection Fast-Scan Voltammetry. **Electroanalysis**, **10**: 926-930, 1998.
- ⁹⁶ REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C. & LAPA, R. A. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Anal. Chim. Acta** **293**: 129-138, 1994.
- ⁹⁷ ROCHA, F. R.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A.; LIMA, J. L. F.; LAPA, R. A. & SANTOS, J. L. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Anal. Chim. Acta** **468**: 119–131, 2002.
- ⁹⁸ DE ANDRADE, M. F.; DE ASSIS, S. G. F.; PAIM, A. P. S. & REIS, B. F. Multicommutated flow analysis procedure for total polyphenols determination in wines employing chemiluminescence detection. **Food Anal. Methods** **7**: 967-976, 2014.

-
- ⁹⁹ MARTELLI, P. B.; ROCHA, F. R. P.; GORGA, R. C. P. & REIS, B. F. A flow system for spectrophotometric multidetermination in water exploiting reagent injection. **J. Braz. Chem. Soc.** **13**: 642-646, 2002.
- ¹⁰⁰ PRADOS-ROSALES, C.; LUQUE-GARCÍA, J. L. & LUQUE DE CASTRO, M. D. Propelling devices: the heart of flow injection approaches. **Anal. Chim. Acta** **461**: 169-180, 2002.
- ¹⁰¹ CHAPARRO, L.; FERRER, L.; LEAL, L. & CERDÀ, V. A multisyringe flow-based system for kinetic–catalytic determination of cobalt(II). **Talanta** **133**: 94-99, 2015.
- ¹⁰² MELCHERT, W. R. & ROCHA, F. R. P. An improved procedure for flow-based turbidimetric sulphate determination based on a liquid core waveguide and pulsed flows. **Anal. Chim. Acta** **616**: 56-62, 2008.
- ¹⁰³ RODRIGUES, S. S. M. & SANTOS, J. L. M. Chemiluminometric determination of captopril in a multi-pumping flow system. **Talanta** **96**: 210-215, 2012.
- ¹⁰⁴ LAVORANTE, A. F.; PIRES, C. K. & REIS, B. F. Multicommutated flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps: Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.** **42**: 423-429, 2006.
- ¹⁰⁵ INFANTE, C. M. C.; MORALES-RUBIO, A.; DE LA GUARDIA, M. & ROCHA, F. R. P. A multicommutated flow system with solenoid micro-pumps for paraquat determination in natural waters. **Talanta** **75**: 1376-1381, 2008.
- ¹⁰⁶ SANTOS, F. G.; PEREIRA, A. C.; CRUZ, S. M.; BIZZI, C. A.; FLORES, É. M. M. & REIS, B. F. Development of a multicommutated flow analysis procedure for simultaneous determination of sulfate and chloride in petroleum coke employing a homemade syringe pump and a LED-based photometer. **Anal. Methods** **7**: 4769-4779, 2015.
- ¹⁰⁷ GOMES, P. R.; LIMA, H. S.; LIMA, A. J. D.; FERNANDES, R. N.; LYRA, W. S.; CUNHA, F. A. S.; SILVA, E. F.; FERREIRA, M. L. B. & LIMA, W. S. Versatility of a multicommutated flow system in the spectrometric determination of three analytes. **Rev. Virt. Quím.** **9**: 563-574, 2017.
- ¹⁰⁸ BRASIL, M. A. S. & REIS, B. F. An automated multicommutated flow analysis procedure for photometric determination of reducing sugars in wine employing a directly heated flow-batch device. **J. Braz. Chem. Soc.** **28**: 2013-2020, 2017.
- ¹⁰⁹ DINIZ, P. H. G. D.; DE ALMEIDA, L. F.; HARDING, D. P. & ARAÚJO, M. C. U. Flow-batch analysis. **TrAC - Trends Analyt. Chem.** **35**: 39-49, 2012.
- ¹¹⁰ COSTA, J. B. S.; DE PAULA, N. T.G.; DA SILVA, P. A. B.; DE SOUZA, G. C.S.; PAIM, A. P. S. & LAVORANTE, A. F. A spectrophotometric procedure for sialic acid determination in milk employing a flow-batch analysis system with direct heating, **Microchem. J.** **147**: 782-788, 2019.

-
- ¹¹¹ TAVARES, M. R. S.; ANDRADE, S. I. E.; LIMA, M. B.; BARRETO, I. S.; DE ARAÚJO, M. C. U. & ALMEIDA, L. F. A. Fast, low-cost, and environmental friendly micro-flow-batch analyzer for photometric determination of sulfites in beverages, **J. Braz. Chem. Soc.** **30**: 1089-1094, 2019.
- ¹¹² CHLÁDKOVÁ, G.; KUNOVSKÁ, K.; CHOCHOLOUŠ, P.; POLÁŠEK, M. & SKLENÁŘOVÁ, H. Automatic screening of antioxidants based on the evaluation of kinetics of a suppression of chemiluminescence in luminol-hydrogen peroxide system using sequential injection analysis set-up with the flow-batch detection cell. **Anal. Methods** **11**: 2531-2536, 2019.
- ¹¹³ MARQUES, T. L. & NOBREGA, J. A. Application of a Flow-Batch Extraction System for On-Line Determination of Minerals in Animal Foods by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Food Anal. Methods** **11**: 1243-1249, 2018.
- ¹¹⁴ KOCHANA, J.; WAPIENNIK, K.; KOZAK, J.; KNIHNICKI, P.; POLLAP, A.; WOŹNIAKIEWICZ, M.; NOWAK, J. & KOŚCIELNIAK, P. Tyrosinase-based biosensor for determination of bisphenol A in a flow-batch system. **Talanta** **144**: 163-170, 2015.
- ¹¹⁵ NASCIMENTO, C. F.; BRASIL, M. A. S.; COSTA, S. P. F.; PINTO, P. C. A. G.; SARAIVA, M. L. M. F. S. & ROCHA, F. R. P. Exploitation of pulsed flows for on-line dispersive liquid-liquid microextraction: Spectrophotometric determination of formaldehyde in milk. **Talanta** **144**: 1189-1194, 2015.
- ¹¹⁶ KHANHUATHON, Y.; SIRIANGKHAWUT, W.; CHANTIRATIKUL, P. & GRUDPAN, K. Spectrophotometric method for determination of aluminium content in water and beverage samples employing flow-batch sequential injection system. **J. Food Composit. Anal.** **41**: 45-53, 2015.
- ¹¹⁷ ACEBAL, C. C.; GRÜNHUT, M.; ŠRÁMKOVÁ, I.; CHOCHOLOUŠ, P.; LISTA, A. G.; SKLENÁŘOVÁ, H.; SOLICH, P. & BAND, B. S. F. Application of a fully integrated photodegradation-detection flow-batch analysis system with an on-line preconcentration step for the determination of metsulfuron methyl in water samples. **Talanta** **129**: 233-240, 2014.
- ¹¹⁸ BUI, D. A.; KRAICZEK, K. G. & HAUSER, P. C. Molecular absorption measurements with an optical fibre coupled array of ultra-violet light-emitting diodes, **Anal. Chim. Acta** **986**: 95-100, 2017.
- ¹¹⁹ DIAS, T. R.; BRASIL, M. A. S.; FERES, M. A. & REIS, B. F. A flow cell with a new design to improve the utilization of the radiation emitted by LED and employed as a radiation source for photometric detection. **Sens. Actuators B: Chem.** **198**: 448-454, 2014.
- ¹²⁰ SILVA, S. G.; NÓBREGA, J. A. & ROCHA, F. R. P. Exploiting Mn(III)/EDTA Complex in a Flow System with Solenoid Micro-Pumps Coupled to Long Pathlength Spectrophotometry for Fast Manganese Determination. **Microchem. J.** **98**: 109-114, 2011.

-
- ¹²¹ MAGALHAES, T. S. & REIS, B. F. A Sensitive Photometric Procedure for Cobalt Determination in Water Employing a Compact Multicommutated Flow Analysis System, **Appl. Spectrosc.** **71**: 2154-2163, 2017.
- ¹²² DASGUPTA, P. K.; BELLAMY, H. S.; LIU, H. H.; LOPEZ, J. L.; LOREE E. L. MORRIS, K.; PETERSEN, K. & MIR, K. A. Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. **Talanta** **40**: 53-74, 1993.
- ¹²³ FIEDORUK, M.; COCOVI-SOLBERG, D. J.; TYMECKI, L.; KONCKI, R. & MIRÓ, M. Hybrid flow system integrating a miniaturized optoelectronic detector for on-line dynamic fractionation and fluorometric determination of bioaccessible orthophosphate in soils. **Talanta** **133**: 59-65, 2015.
- ¹²⁴ ARDUINO DUE. <https://store.arduino.cc/usa/due>, acessado em 19/06/19.
- ¹²⁵ MIRANDA, J. C.; KAMOGAWA, M. Y. & REIS, B. F. Development of a portable setup and a multicommutated flow analysis procedure for the photometric determination of Fe(III) and Fe(II) in fresh water. **Sens. Actuators B: Chem.** **207**: 811-818, 2015.
- ¹²⁶ KAMOGAWA, M. Y. & MIRANDA, J. C. Uso de hardware de código aberto “ARDUINO” para acionamento de dispositivo solenoide em sistemas de análises em fluxo. **Quím. Nova** **36**: 1232-1235, 2013.
- ¹²⁷ CONTE, B.; LANDIS, W.; BOYCE, N.; FREDERICK, J.; FREDERICK, L. & ELMER, J. J. Design and Application of 3D-Printed Photometers Controlled with an Arduino. **3D Print. Addit. Manuf.** **5**: 292-300, 2018.
- ¹²⁸ LIMA, M. J. A.; KAMOGAWA, M. Y. & REIS, B. F. A new sensitive photometric procedure for the determination of sulfate in fuel ethanol without sample preparation exploiting a flow-batch strategy, **Microchem. J.** **145**: 921-926, 2019.
- ¹²⁹ LIMA, M. J. A. & REIS, B. F. Photogeneration of silver nanoparticles induced by UV radiation and their use as a sensor for the determination of chloride in fuel ethanol using a flow-batch system. **Talanta** **201**: 373-378, 2019.
- ¹³⁰ SILVA, D. S. & REIS, B. F. Evaluation of the schlieren effect employing a LED-based photometer with a long-pathlength flow cell for reagentless photometric determination of ethanol in distilled ethanolic beverages. **Microchem. J.** **129**: 325-331, 2016.
- ¹³¹ US EPA. Method 1631, Revision E: Mercury in Water by Oxidation, Purge and Trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. Washington, DC, 2002. p. 38. EPA-821-R-02-019. <https://bit.ly/2UaTyLB>, acessado em 01/04/19.
- ¹³² TAVARES, G. A.; FERREIRA, J. R.; MAGALHÃES, C. E. C.; SILVA, N. C. & TADDEI, M. H. T. Mercury in the Moji-Guaçu River Basin, S.P—Brazil: The Link between Marginal Lagoons and River Contribution. **Ambio** **32**: 47-51, 2003.

-
- ¹³³ SUN, L.; LIN, S.; FENG, L.; YUAN, D. An automatic Flow System of Rapid on-Line Digestion and Pre-Concentration for In-Field Determination of Trace Total Mercury in Seawater. **Anal. Lett.** **45**: 1321-1331, 2013.
- ¹³⁴ DA SILVA, M. J.; PAIM, A. P. S.; PIMENTEL, M. F.; CERVERA, M. L. & DE LA GUARDIA, M. Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. **Anal. Chim. Acta** **667**: 43-48, 2010.
- ¹³⁵ FALCIANI, R.; NOVARO, E.; MARCHESINI, M. & GUCCIARDI, M. Multi-element analysis of soil and sediment by ICP-MS after a microwave assisted digestion method. **J. Anal. Atom. Spectrom.** **15**: 561–565, 2000.
- ¹³⁶ ARSLAN, Z.; ERTAS, N.; TYSON J. F.; UDEN, P. C. & DENOYER, E. R. Determination of trace elements in marine plankton by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). **Fresenius J. Anal. Chem.** **366**: 273–282, 2000.
- ¹³⁷ HOENIG, M. Preparation steps in environmental trace element analysis-facts and traps. **Talanta** **54**:1021–1038, 2001.
- ¹³⁸ US EPA. Freshwater Sediment Screening Benchmarks. Washington, DC, 2007.
- ¹³⁹ HOSSIEN-POOR-ZARYABI, M.; CHAMSAZ, M.; HEIDARI, T.; ZAVAR, M. H. A.; BEHBAHANI, M. & SALARIAN, M. Application of dispersive liquid–liquid micro-extraction using mean centering of ratio spectra method for trace determination of mercury in food and environmental samples. **Food Anal. Methods** **7**: 352–359, 2014.
- ¹⁴⁰ MARCZENKO, Z. Spectrophotometric determination of elements. Chichester, Harwood-Wiley, 1976.
- ¹⁴¹ CHENG, K. L.; UENO, K. & IMAMURA, T. Handbook of organic analytical reagents. Boca Raton, CRC Press, 1982. p. 363-375.
- ¹⁴² NOWICKA-JANKOWSKA, T. & IRVING, H. M. N. H. Studies with dithizone: Part XXIII. Some observations on secondary mercury(II) dithizonate. **Anal. Chim. Acta** **54**: 489-496, 1971.
- ¹⁴³ HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa, Rio de Janeiro, LTC, 2015. p. 427.
- ¹⁴⁴ GOLBABANEZHADAZIZI, A.; RANJBARI, E.; HADJMOHAMMADI, M. R. & DANESHINEJAD, H. Determination of selective serotonin reuptake inhibitors in biological samples via magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. **RSC Adv.** **6**: 50710-50720, 2016.
- ¹⁴⁵ PRASERTBOONYAI, K.; LIAWRAUNGRATH, B.; POJANAKAROON, T. & LIAWRAUNGRATH, S. Mercury(II) determination in commercial cosmetics and local Thai traditional medicines by flow injection spectrophotometry. **Int. J. Cosmet. Sci.** **38**: 68-76, 2016.

-
- ¹⁴⁶ YANG, F.; LIU, R.; TAN, Z.; WEN, X.; ZHENG, C. & LV, Y Sensitive determination of mercury by a miniaturized spectrophotometer after in situ single-drop microextraction. **J. Hazard. Mater.** **183**: 549-553, 2010.
- ¹⁴⁷ ELLY, C. T. Dithizone Procedure for Mercury Analysis. **J. Water Pollut. Control Fed.** **45**: 940-945, 1973.
- ¹⁴⁸ HOSSEINI, M. S. & HASHEMI-MOGHADDAM, H. Sensitized extraction spectrophotometric determination of Hg(II) with dithizone after its flotation as ion-associate using iodide and ferroun. **Talanta** **67**: 555-559, 2005.
- ¹⁴⁹ PELIT, L.; BAGATIR, I.; PELIT, F. O. & ERTAS, F. N. A green photometric method for determination of mercuric ions in saline samples by a single-drop microextraction technique. **RSC Adv.** **4**: 32189-32196, 2014.
- ¹⁵⁰ ANTOLOVA, T.; ZARUBA, S.; SANDREJOVA, J.; KOCUROVA, L.; VISHNIKIN, A. B.; BAZEL, Y.; ANDRUCH, V. & BALOGH, I. S. Spectrophotometric determination of mercury using vortex-assisted liquid-liquid microextraction. **Turk. J. Chem.** **40**: 965-973, 2016.
- ¹⁵¹ BAGHDADI, M.; SHEMIRANI, F. In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: A novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions. **Anal. Chim. Acta** **634**: 186-191, 2009.
- ¹⁵² SHOAEI, H.; ROSHDI, M.; KHANLARZADEH, N. & BEIRAGHI, A. Simultaneous preconcentration of copper and mercury in water samples by cloud point extraction and their determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.** **98**: 70-75, 2012.
- ¹⁵³ ULUSOY, H. L.; GÜRKAN, R. & ULUSOY, S. Cloud point extraction and spectrophotometric determination of mercury species at trace levels in environmental samples. **Talanta** **88**: 516-523, 2012.
- ¹⁵⁴ FRANCISCO, B. B. A.; ROCHA, A. A.; GRINBERG, P.; STURGEON, R. E. & CASSELLA, R. J. Determination of inorganic mercury in petroleum production water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following photochemical vapor generation. **J. Anal. At. Spectrom.** **31**: 751-758, 2016.
- ¹⁵⁵ CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. 2004. Resolução nº. 344, de 25 de março de 2004. <https://bit.ly/2HYsWnY>, acessado em 24/05/19.



APÊNDICE

Programa feito para controlar o módulo de análises e fazer a aquisição de dados

Este programa controla os dispositivos usados no procedimento analítico para a determinação fotométrica de mercúrio em águas e executa a aquisição de dados, empregando o microcontrolador Arduino Due, equipado com as interfaces necessárias para controlar todos dispositivos que compõem o instrumental usado. A seguir são apresentadas as definições das funções dos pinos do Arduino Due, os quais em toda programação são reconhecidos como definidos aqui. Em caso de alteração de função, deve ser redefinido novamente. A interface baseada no circuito integrado ULN2803, é usada para controlar parte dos dispositivos do módulo de análise mostrado na FIGURA 14, SEÇÃO 3.1.3. As definições indicadas aqui são as mesmas da figura mencionada.

QUADRO 1. Definição das funções dos pinos do Arduino Due e do acoplamento ao circuito integrado ULN2803.

Função e pino do Arduino Due	Pino da interface ULN2803	Definição
int linhaA = 22;	1	As linhas A, B e C são usadas para selecionar a frequência do motor de passo da bomba de seringas.
int linhaB = 23;	2	
int linhaC = 24;	3	
int direcao = 25;	4	Define a direção de bombeamento.
int habilita = 26;	5	Habilita o funcionamento da bomba de seringa.
Segunda interface ULN2803		
int BombaP1 = 30;	1	Liga/Desliga a bomba P1.
int BombaP2 = 31;	2	Liga/Desliga a bomba P2.
int Seringa1V1 = 32;	3	Seleciona o caminho do fluido
int Seringa2V2 = 33;	4	Seleciona o caminho do fluido.
int ValvulaV3 = 34;	5	Seleciona o caminho do fluido.

QUADRO 2. Definição das funções dos pinos do Arduino Due.

Função e pino do Arduino Due	Descrição da função
int PinoPWM = 4;	Pino usado para controlar a rotação motor do misturador.
int Chave0 = 3;	Entrada digital para verificar a posição das seringas.
int Chave1 = 6;	Estas chaves instaladas no painel, pode executar funções pré-programadas.
int Chave2 = 5;	
int analógico = A0;	Entrada de sinal gerado pelo do fotômetro.
int analogicIF1 = A1;	Entrada do sinal gerado pela chave óptica lfs ₁ .
int analogicIF2 = A2;	Entrada do sinal gerado pela chave óptica lfs ₂ .

Os parâmetros listados a seguir referem-se ao programa, definidos em função das tarefas a ser executadas. O valor expresso aqui pode ser atualizado antes de iniciar a execução do software. O termo "int", indica que não pode ser um número fracionário e se não tiver esta designação, o programa emite uma mensagem de erro e não funciona.

QUADRO 3. Definição das variáveis numéricas usadas no programa.

Variáveis temporais e valor	Descrição: Tempo em milissegundos (ms)
int tempoAmostragem = 20000;	Inserção da amostra.
int tempoDitizona = 8000;	Inserção da ditizona.
int tempoExtracao = 15000;	Reação e extração.
int tempoRepouso = 50000;	Repouso para decantar o complexo.
int tempoEncheCela = 17000;	Enche a cela de fluxo com a fase orgânica.
int tempoLavaCela = 20000;	Lavar a cela de fluxo com a amostra.
int tempoLavacamara = 20000;	Tempo para lavar a cela de fluxo.
Int tempoEsvaziaCamara = 25000;	Tempo esvaziar a câmara de reação.

QUADRO 4. Constantes usadas como referência pelo programa.

Parâmetro/valor	Descrição
float Reflfs ₁ = 600;	Referência para o detector de infravermelho, lfs ₁ .
float Reflfs ₂ = 600;	Referência para o detector de infravermelho, lfs ₂ .
int rotacao = 80;	Define a largura de pulso para rotação de motor.
float Absorbance = 0;	Define absorbância com ponto flutuante.
int vazao = 200;	Vazões possíveis:400, 200, 100, 50, 25, 12 e 6 microlitros/s.
float Referencia = 4000;	Referência para calcular a absorbância.
float Maximo = 0;	Define o sinal máximo com ponto flutuante.
int long Tempoinicio = 0;	Tempo de referência para arquivo de dados.
int replicatas = 3;	Contador de replicatas.
int sinalChave0 = 0;	Define o status da chave não pressionada.
int sinalChave1 = 0;	Define o status da chave não pressionada.
int sinalChave2 = 0;	Define o status da chave não pressionada.

Os parâmetros que estão definidos com valor inicial igual a zero, seus valores são alterados durante a execução das tarefas programadas. A expressão "float" indica que este número pode assumir o valor fracionário.

A instrução abaixo definida como *#include*, habilita o uso da biblioteca interna do Arduino Due para escrever em um display de cristal líquido. Os números entre parêntese na segunda linha, indicam os pinos do Arduino, onde estão conectadas as linhas do display, como indicado na FIGURA 14.

```
#include <LiquidCrystal.h>
```

```
LiquidCrystal lcd(12, 11, 10, 9, 8, 7);
```

Dentro do "loop setup" são definidas como cada pino do Arduino funciona durante a execução do programa. Cada função pode ser reprogramada se estrutura do módulo de análise for alterada. O "loop void setup" é delimitado pelas duas chaves {...}.

```
void setup()
```

```
{
  pinMode(linhaA, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
```

```
pinMode(linhaB, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
pinMode(linhaC, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
pinMode(habilita, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
pinMode(direcao, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
pinMode(Bomba1, OUTPUT); //Saída de sinal digital.
pinMode(Bomba2, OUTPUT); //Saída de sinal digital.
pinMode(Seringa1V1, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
pinMode(Seringa2V2, OUTPUT); //Saída de sinal digital.
pinMode(ValvulaV3, OUTPUT); // Saída de sinal digital.
pinMode(Chave0, INPUT); //Entrada de sinal digital.
pinMode(Chave1, INPUT); //Entrada de sinal digital.
pinMode(Chave2, INPUT); //Entrada de sinal digital.
pinMode(PinoPWM, OUTPUT); //Saída analógica.
pinMode(analogico, INPUT); // Entrada analógica.
pinMode(analogicIF1, INPUT); // Entrada analógica.
pinMode(analogicIF2, INPUT); // Entrada analógica.
```

```
Serial.begin(9600); // Habilita a interface serial: comunicação
com o computador.
```

```
lcd.begin(16, 2); // Define que o display tem duas linhas de 16
caracteres.
```

```
analogReadResolution(12); //Conversor analógico/digital com 12
bits de resolução.
```

A definição da resolução em 12 bits, indica que o sinal lido pelo Arduino Due pode variar de 0 a 4096 unidades digitais. Com o sinal analógico máximo é 3200 mV, então a resolução em termos de sinal de entrada é 0,8 mV (3200/4096).

Calibracao();

Encheditizona();

}

Dentro de “loop void setup” podemos executar algumas tarefas como indicadas acima: Calibração(); e Encheditizona(). Quando o Arduino é conectado à fonte de energia elétrica, ele executa o programa seguindo a ordem apresentada

neste texto, ao encontrar a expressão: `Calibracao()`, ele localiza e executa as instruções programadas, e faz o mesmo com a seguinte.

A expressão “`millis()`” mostrada abaixo, é uma função do Arduino Due e define o tempo inicial quando o microcontrolador foi habilitado. Aqui estamos definindo uma constante “`Tempoinicio`” com ponto flutuante e que será usada com referência de tempo, durante a operação do módulo de análise. A seguir encontramos a função “`void loop()`”. O campo de atuação desta função é sempre delimitado por duas chaves {}, e dentro destas, escrevemos o programa a ser executado.

```
float Tempoinicio = millis();
void loop()
{
  int contador = 0; // Contas as repetições.
  while (Contador < replicatas) // Executa as replicatas
programadas
  {
    TrocAmostra(); // Executa a troca de amostra.
    EsvaziCamara(); //Esvazia a câmara de extração.
    Amostragem(); // Insere a amostra na câmara de extração.
    LavaCela(); // Lava a cela de fluxo com a amostra
    InsereDitizona(); // insere ditizona na câmara de extração.
    ExtracaoRepouso(); // Mistura amostra e solvente.
    EncheCela(); // Enche a cela de fluxo com a fase orgânica.
    Contador = Contador + 1;
  } // Esta chave indica o final da execução do “loop while).
  Contador = 0;
} Esta chave indica o final do “void loop()”.
```

O programa básico termina com esta chave, e retorna ao início do loop e espera que de amostra seja realizada.

```
-----//-----
void Calibracao()
  //Esta rotina permite a calibração do fotômetro e para isso,
faz o uso de outras //rotinas indicadas a seguir.
```

```
{
  lcd.setCursor(0,0); // Cursor na linha 0, coluna 0 do display
de cristal líquido (lcd).
  lcd.print("Chave1:Calibra");
  lcd.setCursor(0,1); // Cursor na linha 1, coluna 0
  lcd.print("Chave2:Retorna");

  sinalChave1 = LOW;
  sinalChave2 = LOW;

  // Neste ponto, o programa fica preso no "loop" até que uma das
chaves seja //pressionada, então ele interpreta o que deverá ser
feito.

  while((sinalChave1 == LOW)&(sinalChave2 == LOW))
  {
    sinalChave1 = digitalRead(Chave1);
    sinalChave2 = digitalRead(Chave2);
  }
  if (sinalChave1 == HIGH) // Verifica se a chave foi
pressionada (HIGH).
  {
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Coloque o branco");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print("Acione a Chave2");

    sinalChave2 = LOW;
    while(sinalChave2 == LOW)
    {
      sinalChave2 = digitalRead(Chave2);
    }
  }
}
```

EsvaziaSeringas ();

```

vazao = 25;
vazaoAmostra(); // Estabelece a vazão de 25 µL.
EncheCela(); // Enche a cela de fluxo.
Calibra();      // solisita o ajuste do sinal gerado pelo
fotômetro.

    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Calibracao");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print("Finalizada");
    delay(1000);

    sinalChave2 = LOW;
    sinalChave1 = LOW;
    EncheSeringas();
    EsvaziCamara();
}
}

```

A rotina a seguir, enche os tubos que compõem o percurso da ditizona. A execução permanece estacionária até o operador pressionar um das chaves, indicando se executa a operação ou não.

```

void Encheditizona()
{
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);          // Cursor na linha 0, coluna 0.
    lcd.print("Ch1:Insere Ditiz");
    lcd.setCursor(0,1);          // Cursor na linha 1, coluna 0.
    lcd.print("Chave2:Retorna");
    delay(1000);
    sinalChave1 = LOW;
    sinalChave2 = LOW;
}

```

```
while((sinalChave1 == LOW)&(sinalChave2 == LOW)) // Espera a
indicação.
{
    sinalChave1 = digitalRead(Chave1); // Lê o estado da chave,
Alto ou baixo.
    sinalChave2 = digitalRead(Chave2); // Lê o estado da chave,
Alto ou baixo.
}
if (sinalChave1 == HIGH)
{
    EsvaziaSeringas ();
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Lava ditizona");

    vazao = 200;
    vazaoAmostra (); // Estabelece vazão de 200 µL/s.

    digitalWrite(direcao,LOW); //Desloca os êmbolos para
baixo, aspira ditizona.
    digitalWrite(habilita,HIGH); //Habilita o movimento do
motor de passo.
    int Tdit = 0;
    int Tinicio = millis();
    while((millis() - Tinicio)<6000) // Aspira ditizona durante
6000 ms.
    {
        int Tempz = ((millis() - Tinicio)/1000);
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(Tempz);
    }
    digitalWrite(habilita,LOW); //Desabilita o bombeamento.
    delay(200);
```

```

digitalWrite(ValvulaV3, HIGH);
delay(200);
digitalWrite(Bomba2, HIGH); //Aciona a bomba para
esvaziamento.

```

```

int Tinicio = millis();
Delay(4000);
RefIfs1= 600; // O loop seguinte é finalizado quando acontecer
uma das condições //estabelecidas: tempo esgotado ou RefIfs1meno
que 300.

```

```

while (((millis() - Tinicio) < tempoEsvaziaCamara) & (RefIfs2
< 300))

```

```

{
int xt = ((millis() - Tinicio)/1000);
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print(xt); // Escreve o tempo em Segundo no display.
RefIfs2= analogRead(analogicIF2); // Lê o sinal do detector de
infravermelho

```

```

}
digitalWrite(Bomba2, LOW);
digitalWrite(ValvulaV3, LOW);
delay(500);
}

```

```

////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////

```

```

void TrocAmostra()

```

```

{
lcd.clear();
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print("Coloque amostra");
lcd.setCursor(0,1); // Cursor na linha 0 coluna 0
lcd.print("Ative Chavel");

sinalChavel = LOW;

```

```

    while(sinalChave1 == LOW) // Espera a mudança de estado da
Chave1.
    {
    sinalChave1 = digitalRead(Chave1);
    }
    while(sinalChave1 == HIGH)
    {
    sinalChave1 = digitalRead(Chave1);
    }
}

```

```

////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////

```

```

void Amostragem() //Desloca a amostra para a câmara de extração.
{
    lcd.clear();    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Bomba amostra"); // Escreve no display o que
está fazendo.
    digitalWrite(Bomba1, HIGH); //Aciona a bomba1 .
    int Tinicio = millis(); //Define o tempo inicial.
    Delay(4000);
    RefIfs1= 600;
    // O loop seguinte é finalizado quando acontecer uma das
condições
    // estabelecidas: tempo esgotado ou RefIfs1meno que 300.
    while(((millis()-Tinicio) < tempoAmostragem) & (RefIfs1
>300))
    {
    int templ = ((millis() - Tinicio)/1000);
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(templ); // Mostra o tempo display.
    RefIfs1= analogRead(analogicIF1); // Lê o sinal de detector
de infravermelho.
    }
}

```

```
    digitalWrite(Bomba1, LOW); //Desliga a bomba.
}

/////////////////////////////////////////////////////////////////

void LavaCela()
{
    EsvaziaSeringas();
    vazao = 100;
    vazaoAmostra(); // Estabelece a vazão de 100 µL/s.
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Lava a cela");
    digitalWrite(direcao, LOW); //Desloca os êmbolos para baixo.
    digitalWrite(Seringa2V2, HIGH); // Liga a válvula que
direciona o fluído para a cela.
    digitalWrite(habilita ,HIGH); // Habilita a rotação do motor
de passo.
    int tempocela = millis();
    while((millis()-tempocela)<(tempoLavaCela))
    {
        int xt = (millis()-tempocela)/1000);
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(xt);
    }
    digitalWrite(habilita, LOW); // Desabilita o funcionamento do
motor.
    digitalWrite(Seringa2V2, LOW); // Desliga a válvula.
}

/////////////////////////////////////////////////////////////////

void InsereDitizona() // Insere ditizona na câmara de extração.
{
    EsvaziaSeringas();
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
```

```
lcd.print("Aspira ditizona");
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("  Vazao: 100");

int Tinicio = millis();
vazao = 100;
vazaoAmostra();

digitalWrite(direcao,LOW);// Aspira ditizona.
digitalWrite(habilita,HIGH); // Habilita a rotação do motor
de passo.
while((millis() - Tinicio)<tempoDitizona)
{
int tepox = ((millis() - Tinicio)/1000);
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print(tepox);
}
digitalWrite(habilita, LOW); //Desabilita o bombeamento.
lcd.clear();
lcd.setCursor(0,0);
lcd.print("Insere ditizona");
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print("  Vazao: 100");

digitalWrite(direcao, HIGH);// Insere ditizona.
digitalWrite(habilita,HIGH);
digitalWrite(Seringa1V1,HIGH);

Tinicio = millis();
analogWrite(PinoPWM, rotacao); // Liga o motor de agitação
para extração.
while((millis() - Tinicio)<tempoDitizona)
{
int Tempz = ((millis() - Tinicio)/1000);
```

```
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(Tempz);
}
digitalWrite(habilita,LOW); //Desabilita o bombeamento.
digitalWrite(Seringa1V1, LOW);
delay(100);
}
```

```
////////////////////////////////////
```

```
void ExtracaoRepouso() // Reação e extração com o motor ligado.
```

```
{
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Etapa:Extracao");
    analogWrite(PinoPWM,rotacao); // Liga o motor para fazer a
mistura.
```

```
    int Tinicial = millis();
    while((millis() - Tinicial)<tempoExtracao)
    {
        int px = ((millis() - Tinicial)/1000);
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(px);
    }
    analogWrite(PinoPWM, LOW); // Desliga o motor:
repouso/separação de fase.
```

```
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Etapa:Repouso");
    delay(100);
    Tinicial = millis();
    while((millis() - Tinicial)<tempoRepouso)
    {
        int px =((millis() - Tinicial)/1000);
```

```
delay(1000);
sinalChave0 = LOW;
}
```

```
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
```

```
// Esta rotina estabelece a vazão programada, combinando os
níveis lógicos alto //(HIGH) e baixo (LOW) das linhas A, B, e C,
definidas na parte geral do programa.
```

```
void vazaoAmostra()
```

```
{
if (vazao == 6)
{
digitalWrite(linhaA,HIGH);
digitalWrite(linhaB,LOW);
digitalWrite(linhaC,LOW);
}
else if(vazao == 12)
{
digitalWrite(linhaA,LOW);
digitalWrite(linhaB,HIGH);
digitalWrite(linhaC,LOW);
}
else if (vazao == 25)
{
digitalWrite(linhaA,HIGH);
digitalWrite(linhaB,HIGH);
digitalWrite(linhaC,LOW);
}
else if (vazao == 50)
{
digitalWrite(linhaA,LOW);
digitalWrite(linhaB,LOW);
```

```
delay(1000);

float Somaw = 0;
float mediaw = 0;
float sinal = 0;
int tempoInicial = millis();
while((millis() - tempoInicial)<tempoEncheCela) // Enche a
cela de fluxo.
{
    Somaw = 0;
    for(int cv =0; cv < 10; cv++) // Le o sinal gerado pelo
fotômetro, 10 vezes.
    {
        sinal = analogRead(analogico); // Lê o fotômetro.
        Somaw = Somaw + sinal;
        delay(2);
    }
    float mediaw = float(Somaw/10); // Calcula a
media.
    float kj = log(10); //Calccula
log neperiano de 10.
    float Refw = float(Referencia/mediaw) ; // Nas 3 linhas
seguintes é realizado
    float Refw1 = float(log(Refw)); // o cálculo
da absorbância
    Absorbance = float(Refw1/kj); // Referencia:
Leitura com cela de fluxo
    float tempw = (millis() - Tempoinicio); // com a amostra
sem solvente.
    float Tempow = float(tempw/1000);

    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(mediaw,1);
    Serial.print(Tempow,2);
```

```
    Serial.print(" ; "); // Escreve a
absorbância com 5 casas decimais na
    Serial.println(Absorbance,5); // tela do computador.
}
digitalWrite(habilita, LOW); // Desabilita o bombeamento.
digitalWrite(Seringa2V2, LOW);
delay(100);

//SinalIF1 = analogRead(analogicIF);
//Serial.println(SinalIF1);
}
```

```
////////////////////////////////////
```

```
void Calibra()
{
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Ajuste Sinal");
    delay(2000);

    sinalChave1 = LOW;
    while(sinalChave1 == LOW) // Espera que a Chave1 seja
pressionada.
    {
        sinalChave1 = digitalRead(Chave1); // Lê a Chave1.
        lcd.clear();
        lcd.setCursor(0,0);
        lcd.print("Ative Chave1");
        int Leitura = analogRead(analogico); Lê o sinal gerado pelo
fotômetro.
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(Leitura); // Mostra o dado lido no display.
        delay(200);
    }
}
```

```
    }

    float soma = 0;
    int y = 0;
    int x = 0;
    int sinal = 0;
    float Media = 0;
    int zy = 0;
    for (x = 0;x <1000; x++) // Lê o sinal gerado pelo fotômetro
1000 vezes.
    {
        sinal = analogRead(analogico);
        soma = soma + sinal;
        zy = zy + 1;
        delay(1);
    }
    Referencia = float(soma/zy); //Calcula a média.
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Valor referencia");
    lcd.setCursor(0,1); // Cursor na linha 1, coluna 0
    lcd.print(Referencia);
    Serial.print("Referencia = ");
    Serial.println(Referencia,1); // Este dado é usado para
calcular a absorbância.
}
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
void EncheSeringas ()
{
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Enchendo seringa");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print(" vazao:400");
    vazao = 400;
```

```
vazaoAmostra ();
    digitalWrite(direcao, LOW); // Desloca os êmbolos para baixo.
    digitalWrite(habilita, HIGH); // Habilita o funcionamento do
motor de passo.
    delay(2000);
    int sinalChave0 = LOW;
    int Tempoinicio = millis();
    while(sinalChave0 == LOW) // Espera até que a chave seja
pressionada.
    {
        int Tempz = ((millis() - Tempoinicio)/1000);
        lcd.setCursor(0,1);
        lcd.print(Tempz);
        sinalChave0 = digitalRead(Chave0); // Lê o estado da chave:
Alto ou Baixo.
    }
    digitalWrite(habilita, LOW); //Deslocamento chegou no,
desabilita o motor.
    delay(1000);
    sinalChave0 = LOW;
}
////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////////
void EsvaziaSeringas ()
{
    vazao = 400;
    vazaoAmostra ();
    lcd.clear ();
    lcd.setCursor(0,0);
    lcd.print("Esvaziando seringa");
    lcd.setCursor(0,1);
    lcd.print("    vazao:400");
    digitalWrite(direcao,HIGH); //Desloca os êmbolos para cima.
    digitalWrite(habilita,HIGH);
```

```
int Tempoinicio = millis();
delay(2000);

int sinalChave0 = LOW;
while(sinalChave0 == LOW)
{
int Tempz = ((millis() - Tempoinicio)/1000);
lcd.setCursor(0,1);
lcd.print(Tempz);
sinalChave0 = digitalRead(Chave0);
}
digitalWrite(habilita,LOW); //Desabilita o bombeamento.
delay(1000);
sinalChave0 = LOW;
}
```