

## Relatório de Estágio

### Descrição das atividades desenvolvidas no Laboratório A. LOGOS

Rita Macieira Francisco

#### Orientadores

Professora Doutora Maria da Conceição Mesquita dos Santos

Eng.<sup>a</sup> Ana Rita Ferreira Pombo

Eng.<sup>a</sup> Sónia Cristina Marques Varino

Relatório de Estágio apresentado à Escola Superior de Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à conclusão do curso de Técnico Superior profissional em Análises Químicas e Biológicas, realizado sob a orientação científica da Professora Doutora Maria da Conceição Mesquita dos Santos, do Instituto Politécnico de Castelo Branco, da Engenheira Ana Rita Ferreira Pombo e da Engenheira Sónia Varino, ambas do Laboratório A.LOGOS.

Julho de 2020



Não me arrependo de nada do que fiz  
porque tudo foi uma experiência . . .



## **Agradecimentos**

Quero agradecer a toda a minha família, ao meu pai, á minha mãe, ao meu irmão e ao meu namorado, e á minha cunhada pelo apoio incondicional que me deram na realização deste relatório. Agradeço a todos os professores das diversas disciplinas, mas um agradecimento em especial a professora Conceição Mesquita.

Um agradecimento também muito especial a toda a equipa do Laboratório A.Logos que foi incansável e deram-me muito apoio, tanto a nível escolar como a nível de desenvolvimento pessoal.

## **Resumo**

O presente relatório foi elaborado no âmbito da unidade curricular de estágio/projeto do Curso Técnico Superior Profissional em Análises Químicas e Biológicas. O estágio decorreu na Associação para o Desenvolvimento de Assessoria e Ensaio Técnico (A.LOGOS), um laboratório acreditado pelo Instituto Português de Acreditação, cuja atividade principal consiste na realização de análises físico-químicas de águas e outras matrizes. O principal objetivo deste estágio consistiu na integração nas atividades correntes do laboratório e na familiarização e execução das técnicas analíticas adotadas pela A.LOGOS, com supervisão, designadamente no âmbito de análises físico-químicas de águas e de águas residuais. Outro dos objetivos deste estágio/projeto consistiu na revisão bibliográfica sobre a metodologia de análise de óleos e gorduras e de hidrocarbonetos totais em águas por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), assim como sobre o plano de validação do referido método analítico.

## **Palavras chave**

Águas, Águas residuais, controlo analítico, FTIR.

## **Abstract**

This internship report was carried out as part of the curricular unit project/internship do Curso Técnico Superior Profissional em Análises Químicas e Biológicas. The internship took place at Association for the Development of Consultancy and Technical Tests (A.LOGOS), a laboratory accredited by the Portuguese Institute for Accreditation that carries out physical and chemical analyses of water, wastewater, among others. The main goal of this internship was the integration in the daily laboratory activities and at the familiarization and implementation of analytical techniques adopted by A.LOGOS under supervision namely in the context of physical-chemical analysis of water and wastewater. This internship also aimed the the implementation of the analysis of oils and fats and total hydrocarbons in waters by Fourier Transform Infrared Spectrophotometry (FTIR)\, however, entering the state of emergency made me interrupted my tracking on the internship. It was not possible to execute the analytical method for determining Oils and Fats and Total Hydrocarbons by Fourier Transform Infrared Spectrophotometry (FTIR).

## **Keywords**

Water, wastewater, analytical control, FTIR.



# Índice

1. Introdução.....	1
2. Caracterização da entidade acolhedora - A. LOGOS.....	2
3. Descrição das atividades desenvolvidas no Laboratório no período de 3 de fevereiro a 20 março de 2020.....	4
3.1. Determinação do valor do pH.....	5
3.2. Determinação da Condutividade elétrica.....	8
3.3. Determinação da Carência Química de Oxigênio (CQO).....	10
3.4. Determinação dos compostos azotados em águas e águas residuais.....	15
3.5. Determinação do Fósforo total em amostras de água.....	18
4. Significado e importância da determinação de óleos e gorduras e hidrocarbonetos em amostras de águas.....	22
4.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	24
4.2. Descrição do princípio do método e escolha do solvente de extração.....	25
4.2.1. Materiais, equipamento e reagentes.....	26
4.3. Validação e controlo de qualidade do método de determinação de óleos e gorduras e hidrocarbonetos por FTIR.....	28
4.3.2. Quantificação.....	30
4.3.2.1. Curvas de Calibração.....	30
4.3.3. Gama de trabalho.....	30
4.3.4. Precisão.....	31
4.3.4.1. Repetibilidade.....	32
4.3.4.2. Reprodutibilidade.....	32
4.3.5. Precisão Intermédia.....	33
4.3.6. Exatidão.....	33
4.3.6.1. Materiais de referência certificados.....	34
4.3.6.2. Ensaio interlaboratoriais.....	34
4.3.6.3. Testes comparativos.....	35
5. Considerações finais.....	36
6. Referências Bibliográficas.....	37



## Índice de figuras

Figura 1 - Macro estrutura da a.logos .....	3
figura 2 - Estrutura interna do laboratório a:logos .....	3
figura 3 - Equipamento de medição de ph por método eletrométrico .....	6
figura 4 - Equipamento de medição de condutividade (condutivímetro) .....	10
figura 5 - Cadeia hidrocarbonada característica dos ácidos gordos (fonte: costa, 2012) .....	23
figura 6 - Diferença entre ligações cis e trans. A- ligação trans encontrada em alguns ácidos gordos que passaram por processos artificiais; b- ligação cis dos ácidos gordos naturais (fonte: costa, 2012).....	23
figura 7 - Divisão dos hidrocarbonetos (tese de mestrado, departamento de engenharia química e biológica, 2012) .....	24



## Lista de tabelas

Tabela 1 - Preparação dos padrões para a curva de calibração.....	17
Tabela 2 - Preparação dos padrões de fósforo total.....	22



## **Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos**

RQ – Responsável da Qualidade;

DT – Diretora Técnica;

RTA – Responsável Técnica da Amostragem;

RTQ – Responsável Técnica Química

RTMAg – Responsável Técnica Microbiologia Águas;

RTMAI – Responsável Técnica Microbiologia Alimentos.



## 1. Introdução

O presente relatório foi desenvolvido no âmbito do Curso Técnico Superior Profissional (CTeSP) em Análises Químicas e Biológicas da Escola Superior Agrária do Instituto Superior Politécnico de Castelo Branco e a sua apresentação visa a descrição das atividades desenvolvidas durante a realização do estágio/projeto relativo a Componente de Formação em Contexto de Trabalho, prevista no n.º 1 do artigo 40º-M do Decreto-Lei n.º 63/2016 de 13 de setembro. Uma parte das atividades descritas decorreram na Associação para o Desenvolvimento de Assessoria e Ensaios Técnicos (A.LOGOS).

O laboratório A.LOGOS foi a Instituição de Acolhimento que proporcionou a realização do referido estágio que teve como objetivo a realização de análises de águas, utilizando os métodos e técnicas laboratoriais implementadas e assegurando a realização do controlo de qualidade associado, permitindo assim desenvolver um conjunto de atividades de forma a colocar em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do curso. Constituiu também como objetivo do presente estágio acompanhar os procedimentos de registo, avaliação e interpretação dos resultados obtidos. Este primeiro período de estágio decorreu entre 03 de fevereiro e 20 de março de 2020. Após este período e até 30 de junho, devido à declaração do estado de emergência devido à Covid-19, o presente trabalho centrou-se ainda no acompanhamento da elaboração dos procedimentos necessários à posterior implementação de um método para determinação de óleos e gorduras e de hidrocarbonetos totais em águas por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) no referido laboratório.

De forma a apresentar as tarefas desenvolvidas durante o período em que decorreu o estágio, elaborou-se o presente documento que compreende 5 capítulos. A introdução, onde é feito um enquadramento do trabalho e os objetivos; O segundo capítulo apresenta a caracterização da instituição de acolhimento; no terceiro capítulo identificam-se e descrevem-se as tarefas desenvolvidas, relativamente aos procedimentos experimentais executados ao nível de controlo de qualidade de água e de águas residuais durante o primeiro período do estágio; no capítulo quatro são descritos os procedimentos necessários à implementação do método para determinação de óleos e gorduras e de hidrocarbonetos totais em águas por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Por fim, no quinto capítulo são apresentadas as considerações finais.

## 2. Caracterização da entidade acolhedora - A. LOGOS

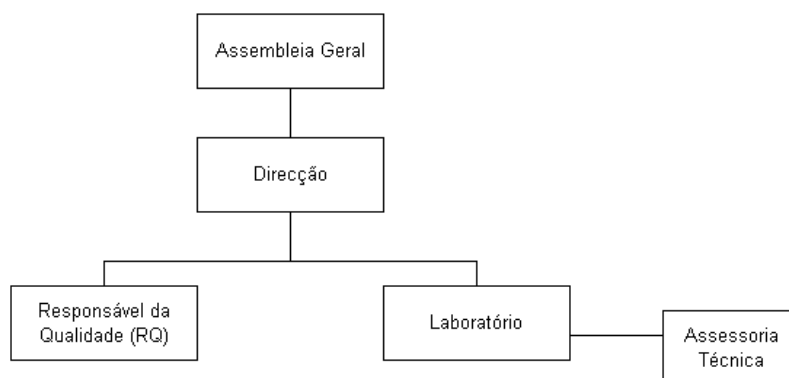
Associação para o Desenvolvimento de Assessoria e Ensaios Técnicos, abreviadamente denominada A.LOGOS, é uma associação de direito privado de interesse público e sem fins lucrativos, anteriormente designada de Centro de Estudos de Gestão do Ambiente do Território (CEGAT). Surgiu em 1997 para dar seguimento às funções do Laboratório de Análises de Água do GAT (antiga designação do laboratório) de Abrantes (LABGATA), cujo funcionamento reporta a 1985. A A.LOGOS tem como associados a Câmara Municipal de Abrantes, a Câmara Municipal de Constância, a Câmara Municipal de Mação, a Câmara Municipal de Ferreira do Zêzere e os Serviços Municipalizados de Tomar. A sua instalação situa-se no Tecnopolo do Vale do Tejo - Rua José Dias Simão - Alferrarede - 2200-062 Abrantes.

A atividade principal desta Associação centra-se no apoio a Autarquias, Empresas, diferentes organismos do Estado e público em geral, desenvolvendo trabalhos no âmbito do controlo de qualidade de águas de abastecimento, efluentes, piscinas, géneros alimentícios e alimentos para animais. A A.LOGOS, para além de serviços analíticos para a indústria agrícola e alimentar, presta ainda serviços no âmbito de programas de gestão de qualidade e segurança, assegurando o cumprimento da legislação nacional e internacional.

A A.LOGOS tem implementado um sistema de qualidade baseado na norma NP EN ISO/IEC 17025, divulgado por todos os seus colaboradores, cujos objetivos são, entre outros, os seguintes:

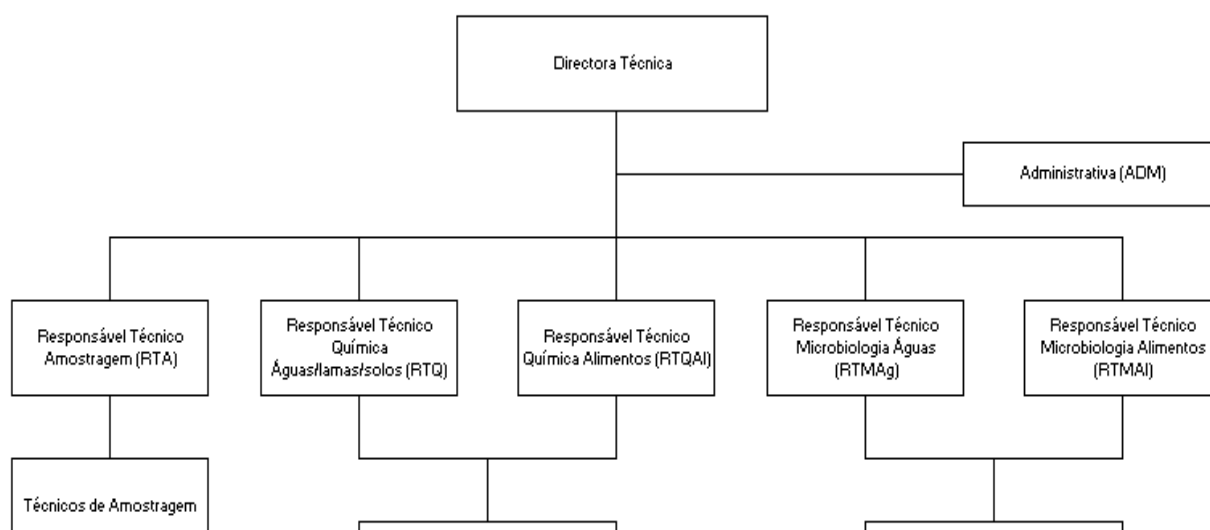
- O desenvolvimento e implementação de um Sistema de Gestão e melhoria contínua da sua eficácia;
- O cumprimento por parte de todos os colaboradores dos procedimentos existentes, de forma a garantir boas práticas laboratoriais e profissionais;
- A gestão e controlo adequados de toda a documentação;
- O nível de higiene e segurança compatíveis com o perigo das atividades desempenhadas;
- A qualidade dos serviços prestados de forma a garantir a qualidade dos resultados transmitidos.

Esta entidade tem uma estrutura organizacional bem definida, a qual é constituída por uma Assembleia Geral que integra todos os associados, uma Direção constituída por um Presidente e dois Vice-Presidentes, eleitos entre os associados, um sistema de qualidade e um laboratório (Figura 1).



**Figura 1** - Macro estrutura da A.LOGOS

O presente estágio foi realizado no laboratório da A.LOGOS, o qual se divide em diferentes departamentos como mostra a figura 2, tendo como diretora do laboratório a Eng.<sup>a</sup> Sónia Varino.



**Figura 2** - Estrutura Interna do laboratório A:LOGOS

Diariamente o serviço recebe aproximadamente 50 amostras para serem analisadas, dentre as quais a grande maioria dos pedidos são dirigidos aos departamentos de análises químicas e microbiológicas.

O presente estágio decorreu no Departamento da área de Química Águas/Lamas/Solos, o qual possui equipamentos que permitem executar análises de química clássica, estando também equipados para a execução de ensaios por espectrometria de absorção atómica e molecular.

O laboratório A.LOGOS tem ainda outras tarefas como:

- Colheitas de amostras de águas;
- Desenvolvimento e implementação de novas técnicas analíticas;
- Participação em ações de formação (estágios, cursos, ...).

### **3. Descrição das atividades desenvolvidas no Laboratório no período de 3 de fevereiro a 20 março de 2020**

A água é um recurso essencial à vida, indispensável para o bem-estar do Homem e para a sobrevivência e manutenção das funções e integridade de todos os ecossistemas. Constitui um elemento essencial para a existência de vida no planeta Terra, uma vez que é o principal constituinte das diferentes formas de vida existentes na terra. De facto, tanto os animais, incluindo o Homem, como as plantas dependem da água para sobreviver.

Porém, a poluição das águas decorrente em grande parte da atividade humana, constitui um dos mais graves problemas ambientais dos nossos dias. Além do impacte ambiental associado à poluição dos sistemas aquáticos, a preocupação com a qualidade da água prende-se também com os potenciais problemas que a sua contaminação pode ter ao nível da saúde humana. Assim, é fundamental proceder-se ao controlo da qualidade da água, seja da água de abastecimento público, seja de águas naturais e/ou residuais, de forma a minimizar os potenciais impactos negativos quer no meio ambiente quer na saúde pública.

A qualidade de uma água é avaliada por um conjunto de análises de natureza físico-química e biológica, sendo que o objetivo da qualidade a avaliar depende da utilização a que for destinada a água. A qualidade é quantificada através de indicadores de qualidade, para os quais são fixados valores de referência que constituem critérios de qualidade. As águas destinadas ao consumo humano têm um controlo bastante apertado, na medida em influenciam direta e/ou indiretamente a saúde pública. O Decreto-lei 152/2017 de 7 de dezembro estabelece os valores paramétricos para os diversos parâmetros caracterizadores da qualidade da água de consumo, os quais correspondem aos valores máximos admitidos de forma a garantir a adequabilidade de água para consumo humano.

relativamente às águas residuais, o Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de junho e o Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de agosto constituem os documentos mais importantes no que respeita à proteção dos recursos hídricos das descargas de águas residuais provenientes, respetivamente, de zonas urbanas e de outras origens que não urbanas, estabelecendo os limites máximos de descarga, designados de Valores Limite de Emissão (VLE) para os vários parâmetros de controlo de qualidade, após o tratamento adequado dessas águas residuais.

O controlo da qualidade de águas e/ou de águas residuais é estabelecido por um conjunto de procedimentos documentados, normativos e regulamentados definidos por entidades reguladoras e legislação nacional e/ou internacional. A esta atividade está intimamente ligado o conceito de métodos analíticos, os quais constituem um conjunto de procedimentos escolhidos de forma a contribuir para otimizar a seletividade e a especificidade relativamente a um determinado analíto, por exemplo, azoto) e a uma matriz específica (por exemplo, água de abastecimento público ou água residual.

Um método experimental é geralmente, dividido em três etapas: operações prévias, como por exemplo a amostragem; a medição propriamente dita, realizada através de operações instrumentais e, finalmente, o registo e tratamento dos dados. Atendendo a que muitas decisões são fundamentadas nos resultados de análises químicas e/ou microbiológicas quantitativas, como por exemplo, verificar o cumprimento de legislação e regulamentação, estimar poluentes ou garantir a qualidade de uma água para consumo humano, é importante assegurar também a qualidade dos resultados analíticos e o grau de confiança que é possível depositar nesses resultados, sendo certo que a qualidade dos resultados finais dependerá sempre dos procedimentos adotados ao longo das diferentes etapas do processo analítico.

Apesar de todos os parâmetros referidos na legislação em vigor para controlo quer de águas para consumo humano quer de águas residuais serem importantes, no presente trabalho apenas serão descritos os procedimentos analíticos que acompanhados ao longo do período de estágio no laboratório da A.LOGOS.

### **3.1. Determinação do valor do pH**

#### **Fundamento do método**

A medição do pH é uma das mais importantes e frequentes análises realizadas no controlo de qualidade de águas e de águas residuais e a sua importância advém do facto de condicionar praticamente todos os equilíbrios químicos que envolvem as reações químicas que ocorrem na matriz aquosa. Sob o ponto de vista sanitário, o pH só por si tem uma importância muito reduzida (Alves, 2010).

O pH corresponde à medida do grau de acidez ( $\text{pH} < 7$ ) ou basicidade ( $\text{pH} > 7$ ) de uma solução; os seus valores estão compreendidos entre 0 e 14, consoante a razão das concentrações dos iões  $\text{H}^+$  e  $\text{OH}^-$ . Em águas puras o valor de pH é neutro, ou seja, a concentração de iões  $\text{H}^+$  e  $\text{OH}^-$  é igual, sendo o valor de  $\text{pH} = 7$ . Por definição, o potencial de hidrogénio (pH) é igual ao logaritmo negativo da concentração de iões hidrogénio ( $\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ ), verificando-se que quanto maior for a concentração de iões  $\text{H}^+$ , menor será o pH da solução (Mendes e Santos Oliveira, 2004).

Contudo, o pH de uma água natural depende muito do percurso que a água faz, sendo fortemente influenciado no caso das águas subterrâneas pela natureza geológica

dos solos com que ela contacta. No caso de , uma água proveniente de zonas calcárias é de pH básico, enquanto que a água com origem numa zona granítica é, geralmente, ácida. Para águas naturais subterrâneas e, sobretudo superficiais, as atividades que se desenvolvem na bacia hidrográfica constituem também um fator importante na determinação do valor de pH dessas águas (Mendes e Santos Oliveira, 2004).

No caso da água destinada ao abastecimento público, o controlo dos valores de pH é muito importante já que a água para consumo humano com pH ácido (<7) pode originar problemas de corrosão de tubagens metálicas, o que eventualmente depois se poderá traduzir na existência de teores elevado de chumbo ou de outros metais pesados na água de consumo (Brito *et al.*, 2014). Se a água apresentar valores de pH > 8 verifica-se que a eficiência do processo de desinfecção pode diminuir, devido ao aparecimento de formas do cloro que têm menor poder de desinfecção. Também para condições alcalinas verifica-se que há uma tendência para aumentar a formação de incrustações nas tubagens e equipamentos, assim como o desenvolvimento de sabores e/ou cheiros desagradáveis (Mendes e Santos Oliveira, 2004). De acordo com a legislação em vigor que fixa os critérios de qualidade para águas de abastecimento público (Decreto-Lei 152/2017 de 7 de dezembro), o pH das águas de abastecimento público poderá variar entre 6,5 e 9,0.

No caso de águas residuais, o valor de pH depende da sua origem (agropecuário, comercial, industrial e/ou doméstico). Estas podem ser descarregadas em rios, lagos ou mares sendo, por isso, importa controlar o seu pH de forma a minimizar potenciais impactos nesses meios recetores naturais.

A medição do pH é feita, preferencialmente, com recurso a potenciômetros (Fig. 3), sendo o método eletrométrico o método de referência.



Figura 3 - Equipamento de medição de pH por método eletrométrico

A determinação do pH deve ser feita no local de recolha, com registo da temperatura, evitando perdas ou ganhos de gases e reduzindo, ao mínimo possível, turbulências na amostra que possam, por exemplo, desencadear reações de oxidação-redução.

O princípio do método baseia-se na determinação da atividade dos iões hidrogénio através da medição potenciométrica usando um eletrodo de vidro, verifica-se aqui o estado da membrana de vidro, especialmente a camada hidratada, que pode estar sujeito a variações ao longo do tempo. Por esta razão, é necessário fazer periodicamente a calibração do potenciómetro antes de se iniciarem as medições de pH das amostras de água a analisar de forma a garantir que a sonda de pH mede corretamente.

No laboratório A.LOGOS a calibração é feita diariamente logo pela manhã, e efetua-se recorrendo a duas soluções tampões comerciais de pH conhecido. Estas duas soluções são selecionadas de modo que as leituras de pH das amostras fiquem dentro do intervalo de calibração. No caso do controlo de águas, normalmente, usam-se como soluções tampão, soluções de  $\text{pH} = 4,00 \pm 0,01$ , de  $\text{pH} = 7,00 \pm 0,01$  ou de  $\text{pH} = 10,00 \pm 0,01$ . Preferencialmente, as duas soluções-tampão utilizadas na calibração não devem diferir mais de 3 unidades de pH entre si (por exemplo, pH 4 e 7 ou pH 7 e 10). Deve-se sempre iniciar a calibração introduzindo o eletrodo na solução-tampão de pH mais elevado.

Durante o estágio, a calibração fez-se de acordo com as instruções do potenciómetro utilizado, tendo-se num primeiro passo lavado o eletrodo com água destilada e seguidamente introduzido na primeira solução-tampão (geralmente foi utilizada a solução-tampão de  $\text{pH} = 7,0$ ) e esperou-se que a leitura estabilizasse. Num segundo passo, lavou-se novamente o eletrodo com água destilada e introduziu-se na segunda solução-tampão (normalmente a de  $\text{pH} = 4,0$ ) e esperou-se novamente pela estabilização da leitura.

Após a calibração e leitura das amostras, o eletrodo era mantido mergulhado numa solução de cloreto de potássio (KCl) 3 Molar para garantir a hidratação da membrana de vidro do eletrodo.

### **Medição do pH em amostras**

Para a determinação do pH das amostras em análise o procedimento era o seguinte:

- Medir 125 mL de amostra a analisar para um copo de precipitação;
- Passar o eletrodo abundantemente por água destilada;
- Emergir o eletrodo na amostra a analisar;
- Agitar levemente o eletrodo dentro da amostra e esperámos que o valor de pH estabilizasse para fazer a leitura e registar o valor;
- Passar o eletrodo novamente por água destilada e colocar noutra amostra, procedendo da mesma forma;

- No final das leituras passar o elétrodo por água destilada e colocá-lo na solução de armazenamento de KCl como referido anteriormente.

Todas as amostras e soluções-tampões devem estar à temperatura ambiente. Assim, se as soluções-tampão estiverem guardadas no frigorífico, devem retirar-se com antecedência para que atinjam naturalmente, temperatura ambiente antes de ser utilizadas.

## **3.2. Determinação da Condutividade elétrica**

### **Fundamento do método**

A Condutividade Elétrica (CE) da água define-se como a capacidade que esta tem em conduzir a corrente elétrica, a qual depende essencialmente da presença de iões, da concentração total de sais ionizados na água, bem como da mobilidade dos iões que, por sua vez, é influenciada pela temperatura (Mendes e Santos Oliveira, 2004). A influência da temperatura está relacionada com o facto de um aumento da temperatura contribuir para a diminuição da viscosidade da água e para o aumento da energia cinética dos iões, o que determina o aumento da sua mobilidade e, por consequência, um aumento da condutividade da solução.

Assim, a CE é a quantidade total de iões dissolvidos na água e, por isso, podemos dizer que a CE permite avaliar de uma forma rápida, global e indireta, o grau de mineralização (sólidos dissolvidos totais (SDT)) da água, embora não permita a distinção química das substâncias questão presentes nessa água (Mendes e Santos Oliveira, 2004).

No caso de soluções aquosas, quanto mais puras forem menores será a sua CE devido à menor concentração de iões dissolvidos, como é o caso da água desmineralizada que se utiliza nos laboratórios para a preparação de soluções e/ou amostras, relativamente às águas que se encontram na natureza (subterrâneas, de rios e de oceanos) apresentam uma condutividade superior devido à existência de maior quantidade total de sólidos dissolvidos.

A CE não constitui em si mesma um problema para a saúde do Homem, embora, alguns dos iões presentes na água, em função da sua natureza e características específicas, possam causar alguns problemas de saúde (Mendes e Santos Oliveira, 2004). Contudo, verifica-se que águas com elevada mineralização tendem a apresentar normalmente sabores desagradáveis ou estar na origem de processos de corrosão.

As aplicações práticas para o controlo da CE de uma água estão relacionadas não só com a indicação do grau de mineralização da água, mas sobretudo no caso das águas de abastecimento público, com o facto dessa medição nos permitir uma indicação rápida de variações nas concentrações de iões dissolvidos, o que poderá indicar um potencial problema de contaminação de origem inorgânica. Assim, a CE fornece boas indicações de alterações na composição da concentração iónica total da água.

A CE é expressa no sistema internacional de unidades em Siemens por metro (S/m), sendo também habitual exprimir as medições de condutividade da água na forma de Siemens por centímetro (S/cm), ou o micro Siemens por centímetro ( $\mu\text{S/cm}$ ) para os casos em que a água apresenta um elevado grau de pureza. O Decreto-Lei 152/2017 de 7 de dezembro fixa o valor paramétrico em 2500  $\mu\text{S/cm}$  a 20 °C para águas que se destinam ao consumo humano.

### Procedimento experimental

Este parâmetro foi determinado através do valor da condutividade lida diretamente num equipamento designado de condutivímetro, em que existe correção automática da temperatura. As análises de condutividade foram efetuadas com um equipamento de análise da marca MeterLab e modelo CDM230 (Fig. 4), tendo-se procedido da seguinte forma:

- Ligar o condutivímetro e deixou-se estabilizar durante 30 minutos;
- Medir 150 mL de amostra para um copo de precipitação;
- Passar a célula do condutivímetro por água destilada (porém, se a célula tiver sido exposta a solventes imiscíveis na água, previamente tem que ser limpa com um solvente imiscível com água, por exemplo, acetona e enxaguar cuidadosamente com água destilada);
- Colocar o elétrodo dentro da amostra agitando um pouco;
- Esperar que o valor estabilize e registá-lo;
- Voltar a lavar o elétrodo com água destilada e passar à leitura de outra amostra;

Entre leituras, manter a ponta da célula em água destilada e após todas as leituras a célula deve ser guardada na cápsula de proteção. Periodicamente, para remover eventuais depósitos que se formem à volta da célula condutimétrica, deve-se mergulhar a mesma numa solução comercial designada como “RENOVO\_N, Normal Cleaning Solution” cerca de 1 hora. Em seguida lava-se muito bem com água destilada. Outro cuidado a ter diariamente no laboratório aquando da leitura da CE é que quando há análises de águas residuais, estas devem sempre ser lidas após a análise de águas “limpas”.

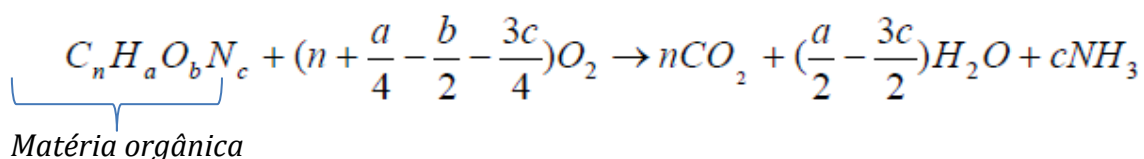


Figura 4 - Equipamento de medição de condutividade (condutivímetro)

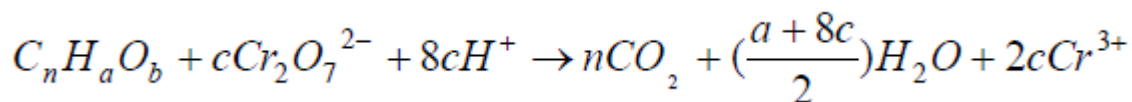
### 3.3. Determinação da Carência Química de Oxigénio (CQO)

A Carência Química de Oxigénio (CQO) é um dos parâmetros analíticos que caracteriza não só as águas residuais que chegam às Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR's) como também as águas residuais após o seu tratamento, de forma a monitorizar a sua qualidade e conformidade com a legislação, para que a sua descarga não provoque alterações de qualidade no meio recetor final (um rio, por exemplo). É também um parâmetro importante para caracterizar o nível de poluição de águas naturais. Este parâmetro mede de forma indireta o nível de matéria orgânica presente nesses diferentes tipos de água.

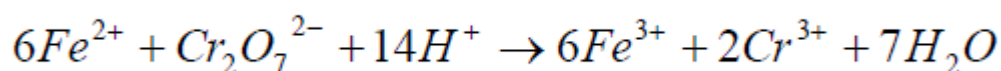
Há vários métodos para a determinação deste parâmetro, contudo no laboratório A. LOGOS utiliza-se o método analítico de refluxo aberto com dicromato de potássio descrito na Norma Portuguesa NP 4329:1996 (Quinteiro, 2012). Este método baseia-se na medição da quantidade de oxigénio necessária para oxidar, por via química, a matéria orgânica presente numa amostra com formação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e (H<sub>2</sub>O), de acordo com a seguinte equação:



A matéria orgânica presente na amostra é oxidada (digerida) pelo dicromato de potássio (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>), em meio fortemente acidificado com ácido sulfúrico, na presença de sulfato de mercúrio e de um catalisador de prata e à temperatura de 150°C, durante 2 horas (Costa, 2011). Dado que podem existir no meio substâncias voláteis e que há outras que se podem formar durante a digestão, utiliza-se um condensador de refluxo para evitar perdas, durante a oxidação (digestão) da amostra. Durante a reação uma parte do dicromato é reduzido pelas matérias oxidáveis presentes de acordo com a reação seguinte:



O método utilizado baseia-se numa quantificação por titulação visual, em que o excesso de dicromato que não é consumido durante a reação de oxidação (isto é, que não foi reduzido) é titulado com uma solução de sulfato ferroso amoniacal agente redutor fácil de obter no estado puro e relativamente estável em solução. A reação de titulação é a seguinte:



O ponto de equivalência da titulação ocorre quando se dá a viragem no potencial de oxidação-redução do meio. Esta viragem é determinada por meio de um indicador de oxidação-redução, neste caso a ferroína, passando a solução de azul para vermelho acastanhado.

O método de refluxo aberto tem como vantagem, em relação a outros métodos, o facto de ser indicado para determinação da CQO num intervalo de valores elevado, devido ao facto de permitir analisar um maior volume de amostra, como acontece quando são esperados valores mais baixos de matéria orgânica na amostra. O método é aplicável a amostras com uma concentração de CQO esperado entre 30 mg/L e 700 mg/L e uma concentração de cloretos que não ultrapasse preferencialmente os 1000 mg/L. Caso o valor da CCQ exceda os 700 mg. L<sup>-1</sup>, a amostra tem que ser diluída com água destilada.

A CQO é calculada a partir da quantidade de dicromato reduzida, que é determinada em termos de oxigénio equivalente, sabendo-se que 1 mole de dicromato (Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>) é equivalente a 1,5 mole de oxigénio (O<sub>2</sub>) (Costa, 2011).

O método é sensível a algumas interferências, a mais importante das quais é devida à oxidação de substâncias inorgânicos que podem estar presentes na amostra, tais como: Cloretos, nitritos, ferro, manganês e sulfuretos. Destes elementos, o mais importante em termos de interferência são normalmente os cloretos, sendo esta atenuada pela adição de sulfato de mercúrio (HgSO<sub>4</sub>). Para garantir que os compostos orgânicos voláteis eventualmente presentes na amostra oxidam em maior extensão durante a reação de oxidação, adiciona-se o já referido sulfato de prata (Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) que atua como catalisador dessa reação.

Quando as amostras chegam ao laboratório e no caso de não ser possível executar de imediato a análise são conservadas, preferencialmente em frascos de vidro, ou em recipientes individuais de plástico de polietileno. Para conservar as amostras ou se procede à congelação ou adiciona-se ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) concentrado até baixar o pH para valores pH ≤ 2 e posteriormente são refrigeradas no frigorífico entre 4±2 °C, durante um limite máximo de conservação de 28 dias (Cerdeira, 2008). O volume mínimo de amostra a colher para o parâmetro de CQO é de 100 mL (Cerdeira, 2008).

## Procedimento experimental

Reagentes comerciais utilizados na preparação das soluções:

- Ácido Sulfúrico (Honeywell/Fluka), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 95-97% (v/v), p.a., ρ=1,84 g. mL<sup>-1</sup>, M=98,09 g.mol<sup>-1</sup>
- Dicromato de Potássio (VWR), K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 99,5% (m/m), p.a., M= 294,19 g.mol<sup>-1</sup>
- Sulfato de Prata (VWR), Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 99,5% (m/m), p.a., M= 311,8 g.mol<sup>-1</sup>

- Sulfato de Mercúrio (Carlo Erba),  $\text{HgSO}_4$ , 99,0% (m/m), p.a.,  $M = 296,65 \text{ g.mol}^{-1}$
- Sulfato ferroso amoniacal Hexahidratado (PanReac Applichem),  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ , 99,0% -101%(m/m), p.a.,  $M = 392,14 \text{ g.mol}^{-1}$
- Hidrogenoftalato de Potássio (Chemicals),  $\text{KC}_8\text{H}_5\text{O}_4$ , 99,95% -100,05% (m/m), p.a.,  $M = 204,23 \text{ g.mol}^{-1}$

#### Soluções a preparar para a determinação da CQO:

Solução-mãe de dicromato de potássio 0,250N (0,0417 M):

Pesa-se 12,259 g de dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) puro, previamente seco a  $103 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , numa estufa durante 2 horas e dissolve-se, num balão volumétrico de 1L, em água destilada, perfazendo o volume de 1000 mL. A solução é estável durante, pelo menos, um mês.

Solução padrão de dicromato de potássio 0,025N (0,00417M):

A partir da solução-mãe, Pipetar 100 mL da solução-mãe de dicromato de potássio 0,25N para um balão volumétrico de 1L e perfazer o volume com água destilada.

#### Solução catalisadora de sulfato de prata

Dissolver 10 g de sulfato de prata puro em 965 mL de ácido sulfúrico concentrado e 35 mL de água destilada. Efetua-se esta diluição adicionando primeiro um pequeno volume de água (15 mL) ao sulfato de prata e posteriormente um pequeno volume de ácido. Dissolver a mistura e transferir para balão de 1000 mL. Deixar em repouso 1 ou 2 dias para dissolver completamente, agitando de vez em quando.

#### Solução indicadora de ferroína

Pesar 1 g de sulfato ferroso amoniacal hexadidratado puro para um balão volumétrico de 100 mL e dissolver com água destilada. Adicionar 1,5 g de 1,10-fenantrolina mono-hidratada ( $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e agitar até dissolução completa. Perfazer o volume com água destilada a 100 mL. Esta solução é estável durante vários meses se conservada ao abrigo da luz. Também pode ser adquirida esta solução já preparada comercialmente.

Solução titulante de sulfato de ferro II e amónio (sulfato ferroso amoniacal), aproximadamente 0,25 N.

Pesar 98,0 g de sulfato ferroso amoniacal puro e dissolver em água destilada, verter para um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionar lentamente 20 mL de ácido sulfúrico deixando arrefecer. Perfazer o volume a 1000 mL com água destilada. Normalmente prepara-se apenas 250 mL desta solução devido a esta solução ser muito instável. É necessário fazer a sua padronização, utilizando uma solução padrão de dicromato de potássio 0,25 N.

Solução titulante de sulfato de ferro II e amónio (sulfato ferroso amoniacal), aproximadamente 0,025 N (solução utilizada na titulação).

Diluir com água destilada, 100 mL da solução de sulfato ferroso amoniacal 0,25 N em 1000 mL de água destilada. Proceder à padronização frequente, usando a solução de dicromato de potássio 0,025 N.

Solução Padrão de Hidrogenoftalato de Potássio utilizada no controle de qualidade do ensaio

Secar hidrogenoftalato de potássio puro a  $103 \pm 2$  °C a  $105$  °C até peso constante. Após a secagem, dissolver 0,04251 g deste reagente em água destilada e diluir a 100 mL. Esta solução tem uma CQO teórica de 500 mg.L<sup>-1</sup> e é estável durante pelo menos uma semana se for conservada a cerca de 4 °C. Para preparar uma solução padrão com uma CQO teórica de 30 mg.L<sup>-1</sup>, dilui-se a solução anterior com água destilada na proporção 3/50 mL.

**Procedimento experimental:**

É necessário, antes de realizar o ensaio, proceder à determinação do título da solução de sulfato ferroso amoniacal, devendo proceder-se da seguinte forma:

- Medir 10 mL de solução padrão de dicromato de potássio 0,25N (VA) e diluir com ácido sulfúrico diluído até cerca de 100 mL e deixar arrefecer. Deitar 2 a 3 gotas de ferroína. Ácido sulfúrico diluído: adicionar lentamente 220 mL de ácido sulfúrico concentrado a 500 mL água e deixar arrefecer, diluir a 1000 mL;
- Titular esta solução com a solução de sulfato ferroso amoniacal até viragem de azul esverdeado para vermelho acastanhado (volume titulante gasto, VB).

Cálculo do título da solução sulfato ferroso amoniacal:

$$V_A \times 0,25 = V_B \times N$$

Onde:

$V_A$  – Volume de solução padrão de dicromato de potássio 0,25N utilizada na padronização do sulfato ferroso amoniacal

$V_B$  - Valor de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação

$N$  – É a normalidade do sulfato ferroso amoniacal que queremos determinar.

Procedimento experimental de CQO nas amostras:

- Ligar o digestor de CQO, para que este atinja a temperatura dos  $\pm 150$  °C;
- Pesar 0,4 g de sulfato de mercúrio e colocar no tubo de digestão. (se a amostra tiver grande quantidade de cloretos, é necessário adicionar maior quantidade de sulfato de mercúrio, mantendo-se a razão  $HgSO_4/Cl^-$  de 10:1);
- Adicionar 10 mL de amostra, previamente homogeneizada (V) (ou 10 mL de amostra diluída se necessário);
- Juntar lentamente 5 mL de solução catalisadora, agitar com cuidado, até completa dissolução do sulfato de mercúrio.

- Juntar 10 mL de solução de dicromato de potássio 0,250 N, seguida de adição lenta de 25 mL de solução catalisadora, agitando cuidadosamente;
- Ligar o condensador ao tubo de digestão, colocando-o no digestor, a 150 °C, durante duas horas.
- Deixar arrefecer até á temperatura ambiente.
- Transferir a amostra digerida, para um copo precipitação com volume de 100 mL;
- Lavar com água destilada o tubo de digestão e adicionar essa água de lavagem ao conteúdo do copo de precipitação;
- Titular com a solução de sulfato de ferro e amónio 0,25N, em presença de 2 gotas de indicador ferroína. O ponto de viragem é indicado pela mudança de cor, de azul esverdeado para vermelho acastanhado.
- Paralelamente é necessário fazer um ensaio em branco:
  - Medir 10 mL de água destilada em vez dos 10 mL de amostra e proceder à Determinação de igual modo.

Se a amostra contém um baixo valor de CQO, deve-se proceder do mesmo modo, substituindo as soluções 0,250 N de dicromato de potássio e sulfato de ferro II e amónio por soluções de 0,025N.

Como forma de controlar a precisão interna dos resultados produzidos o laboratório efetua-se um Controlo de Qualidade Interno, que engloba a realização de: ensaios em brancos em paralelo com as amostras, como referido, análises em duplicado, e padrões de controlo internos.

Para o ensaio padrão de controlo interno substitui-se os 10 mL de amostra por 10 mL da solução padrão de Hidrogenoftalato de Potássio, cujo valor teórico de CQO é conhecido (há soluções comerciais cuja CQO é de 30 mg/L, para amostras com valores de CQO mais baixa e há soluções padrão com valor de CQO de 500 mg/L, quando estamos a ler amostras cujos valores de CQO são elevados) e procede-se da mesma forma que para as amostras. Como critério de aceitação considera-se que um erro relativo máximo de 10% para o caso padrão com uma CQO = 500 mg O<sub>2</sub>/L e um erro relativo máximo de 20% para o caso da solução-padrão com uma CQO = 30 mg O<sub>2</sub>/L.

Se na amostra é esperado que contenha um baixo valor de CQO, deve-se proceder do mesmo modo, substituindo as soluções 0,25N de dicromato de potássio e sulfato ferroso amoniacal por soluções de 0,025N.

#### Cálculo da CQO de uma amostra:

Registrar o volume de titulante gasto na amostra (b), no ensaio em branco (a) e no Padrão de Controlo (V<sub>pc</sub>) e determinar o valor da CQO da amostra utilizando a seguinte expressão:

$$CQO = \frac{(a - b) \times N \times 8000}{V}$$

Em que:

a - Volume de solução titulante gasto no ensaio em branco, mL

b - Volume da solução titulante gasto na amostra, mL

V - Volume de amostra utilizado para a determinação, mL.

N - Concentração da solução titulante (solução de sulfato ferro II e amónio).

Repetir os cálculos para a determinação da CQO no padrão de controlo substituindo na expressão o b, pelo volume de titulante gasto no Padrão de Controlo (V<sub>pc</sub>).

O resultado é expresso em mg de O<sub>2</sub>/L e o resultado apresenta-se arredondado às décimas.

### 3.4. Determinação dos compostos azotados em águas e águas residuais

Os compostos de azoto presentes em águas e em águas residuais podem apresentar-se na forma reduzida, nomeadamente o azoto orgânico (proteínas, aminoácidos ou ureia) e o azoto amoniacal. Consoante as condições de pH e temperatura da água e/ou água residual, o azoto amoniacal pode surgir sob a forma ionizada, designando-se por ião amónio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou sob a forma não ionizada, o chamado amoníaco (NH<sub>3</sub>). A soma do azoto orgânico e amoniacal presente numa água e/ou água residual é designada por azoto Kjeldahl (N-Kjeldahl). Para além das formas reduzidas, nas amostras de água e/ou água residual, o azoto pode também estar presente na forma oxidada, designadamente como nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) e/ou nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Cerdeira, 2008).

Os diferentes compostos de azoto podem-se converter uns nos outros mediante as condições em que a água e/ou água residual se encontra, sendo por isso essencial que se deva monitorizar não só a concentração total de azoto (que corresponde à soma da concentração das formas reduzidas e oxidadas presentes numa amostra), mas também a concentração de cada forma de azoto, no sentido de minimizar o impacto que estes compostos poderão causar nos ecossistemas aquáticos (Quinteiro, 2012).

A concentração dos diferentes compostos azotados constitui também um indicador do estado da poluição nas águas naturais, verificando-se que a poluição é mais recente quando as amostras evidenciam uma elevada concentração de azoto orgânico ou amoniacal e mais antiga quando predominam as formas de azoto oxidadas que resultam das formas reduzidas por ação de bactérias oxidantes designadas de nitrificantes (Costa, 2011).

De forma a minimizar o impacto ambiental associado a estes compostos, encontram-se definidos pelos Decretos-lei 152/97 de 19 Junho e 236/1998 de 1 de

Agosto os valores limites de emissão (VLE) para os diferentes compostos de azoto, permitidos para a descarga de águas residuais em meios hídricos, de forma a proteger os sistemas aquáticos. Entre os potenciais efeitos negativos associados à presença destes compostos nas águas naturais, pode-se referir como um dos mais importantes a sua contribuição para a ocorrência do fenómeno de eutrofização que está associado ao crescimento de algas e plantas no meio aquático devido ao enriquecimento deste meio em nutrientes, como é o caso do azoto. Como resultado deste fenómeno, a concentração de oxigénio dissolvido tende a diminuir no meio aquático devido ao consumo por parte de consumidores primários que se desenvolvem em excesso devido ao crescimento de algas, o que pode provocar a morte de alguns organismos, nomeadamente das espécies piscícolas. Também o processo de nitrificação, isto é, a oxidação bioquímica do ião amónio a nitritos e nitratos, está associado a um consumo de oxigénio dissolvido, podendo também contribuir para a falta de oxigenação dos sistemas aquáticos.

O excesso de nitritos na água de consumo humano também pode ter consequências ao nível da saúde pública, na medida em que podem estar na origem de algumas doenças como é o caso da metahemoglobinémia e de cancro ao nível do estômago. De facto, o nitrito tende a combinar-se com a hemoglobina originando a metahemoglobina, composto que, ao contrário da hemoglobina, não tem capacidade de fixar o oxigénio, impossibilitando assim o transporte e a absorção do oxigénio necessário para as células do corpo humano. Os nitritos parecem também contribuir para a formação de nitrosaminas no estômago, as quais parecem estar associadas a uma maior incidência do cancro no estomago.

Assim, os compostos azotados são parâmetros importantes no controlo de qualidade de águas de consumo, águas naturais e, ainda, de águas residuais.

### **Procedimento experimental**

No Laboratório A.LOGOS tive oportunidade de determinar apenas o teor de azoto total e/ou azoto Kjeldahl em águas residuais, lamas e solos. O princípio do método do persulfato permite determinar o azoto total por oxidação de todos os compostos azotados a nitratos. A oxidação dá-se em meio alcalino e à temperatura de 121°C, convertendo o azoto orgânico e inorgânico em nitratos. O azoto total é determinado analisando o teor em nitratos da amostra digerida. A determinação do azoto Kjeldahl é feita por meio de cálculos.

Os equipamentos utilizados neste método são:

- Autoclave
- Espectrofotómetro
- Material de uso corrente em laboratório

É importante referir que todo o material de medida de volumes utilizado na preparação dos padrões e das amostras tem de ser volumétrico.

A sua determinação deve ser isolada para águas de abastecimento e águas residuais, lamas e solos, ou seja, quando se efetuar uma reta de calibração com base nela apenas devem ser feitas amostras de águas residuais, lamas e solos ou, apenas amostras de águas de abastecimento, para assim evitar qualquer tipo de contaminação.

### Preparação de soluções

#### Reagente de digestão

Dissolver 20,1 g de persulfato de potássio  $K_2S_2O_8$  (baixo teor de azoto  $<0,001\%N$ ) e 3,0 g de NaOH em água e diluir para 1000mL.

#### Solução tampão de borato

Dissolver 61,8 g de ácido bórico  $H_3BO_3$  e 8,0 g de NaOH em água e diluir para 1000mL.

#### Solução-padrão de nitratos 1000mg/L

São necessárias duas soluções padrão de lotes diferentes, uma para preparação dos padrões da reta e outra para preparação do(s) padrão(ões) de controlo.

#### Solução-padrão de nitratos 100mg/L

Para balão volumétrico, de 200 mL medem-se, com uma pipeta, 20 mL da solução padrão de nitrato de 1000 mg/L. Perfaz-se o volume com água até ao traço e homogeneiza-se.

Padrão (mg/L)	Solução de partida (mg/L)	Volume de solução de partida (mL)	Volume dos balões (mL)
0	100	0	100
5	100	5	100
20	100	20	100
40	100	40	100
50	100	50	100

Tabela 1 – Preparação dos padrões para a curva de calibração

A solução padrão deve ser conservada em frasco de vidro e refrigerada por um período não superior a um mês.

#### Procedimento experimental:

- Introduzir em cada frasco de schott 10 ml de padrão

- Pipetar 5,0 ml de reagente de digestão
- Rolhar bem e misturar
- Levar à autoclave durante 30 minutos
- Arrefecer lentamente à temperatura ambiente
- Adicionar 1 ml de solução tampão de borato e agitar
- Determinar a concentração em nitratos segundo, utilizando o ensaio em branco para acertar o zero.

### 3.5. Determinação do Fósforo total em amostras de água

O fósforo é um elemento químico que pode estar presente nas águas naturais e águas residuais, na forma de compostos inorgânicos (como ortofosfatos:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ou polifosfatos:  $(\text{Na}_3(\text{PO}_3)_6$ ,  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  e  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) ou na forma de compostos orgânicos, contribuindo em conjunto com os compostos de azoto para o crescimento descontrolado de fitoplâncton e algas, levando à eutrofização dos meios aquáticos como referido anteriormente (Costa, 2011). Por essa razão, é importante um controlo da concentração de fósforo nos meios hídricos e também é fundamental que haja um controlo dos níveis deste elemento nas águas residuais, antes da sua descarga para os sistemas aquáticos.

Para a determinação de fósforo total, é necessário proceder à degradação da matéria orgânica, libertando o fósforo na forma de ortofosfatos (Francisco, 2008). Esta digestão pode-se fazer recorrendo a diferentes métodos de digestão: com ácido perclórico, com ácido sulfúrico e nítrico e através da oxidação com persulfato (APHA-AWWA-WEF, 2005). Este último foi o método que utilizámos no laboratório para determinação do teor de fósforo total em amostras de água e de água residual.

Após a digestão da amostra, a quantificação dos teores de fósforo total faz-se recorrendo à chamada análise colorimétrica, técnica utilizada quando é necessário quantificar substâncias em misturas complexas. Deste modo o composto a quantificar é posto em contacto com um reagente específico, de modo a desenvolver uma cor cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra.

#### **Procedimento experimental**

##### Preparação de soluções

Durante a análise, todos os reagentes devem ser de qualidade analítica reconhecida e a água deve ser destilada ou de pureza equivalente.

##### Solução aquosa de indicador de fenolftaleína

Dissolver 80mg de fenolftaleína em 100ml de metanol.

##### Solução de ácido sulfúrico a 5,4 mol L<sup>-1</sup>

Adicionar cuidadosamente **300 mL** de ácido sulfúrico **H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** concentrado a **600 mL** de água destilada e dilua até **1 L** com água destilada.

Persulfato de amónio, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> sólido

Hidróxido de sódio, NaOH, 1 mol L<sup>-1</sup>

Dissolva **40 g** de **NaOH** em **1 L** de água destilada.

Ácido sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 N

Diluir **70 mL** de ácido concentrado em **500 mL** de água destilada.

Solução de tartarato de potássio e antimónio

Dissolver **1,3715 g** de **K(SbO)C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> · ½ H<sub>2</sub>O** (145) em **400 mL** de água destilada e transferir para um balão de **500 mL** e completar o volume. Armazenar num frasco de vidro.

Solução de molibdato de amónio

Dissolver **20 g** de **(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4 H<sub>2</sub>O** em **500 mL** de água destilada.

Armazenar num frasco de vidro.

Ácido ascórbico, 0,1 mol L<sup>-1</sup>

Dissolver **1,76 g** de ácido ascórbico em **100 mL** de água destilada.

Esta solução é estável durante cerca de uma semana a 4 °C.

Reagente combinado

Misturar os reagentes acima nas seguintes proporções para **200 mL** de reagente combinado:

- 100 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 5 N, 10 mL de solução de tartarato de potássio e antimónio
- 30 mL de solução de molibdato de amónio
- 60 mL de solução de ácido ascórbico
- Deve-se misturar a seguir à adição de cada reagente.

Deixar todos os reagentes atingirem a temperatura ambiente antes de serem misturados e adicioná-los na ordem sequencial referida. Caso se forme turvação no reagente combinado, agitar e deixar repousar durante uns minutos até a turvação desaparecer e só depois prosseguir. Este reagente é estável por 4 h.

Solução-padrão de fosfatos a 1000 mg/L

São necessárias duas soluções padrão de lotes diferentes, uma para preparação dos padrões da reta e outra para preparação do(s) padrão(ões) de controlo:

Solução-padrão de fosfatos a 50 mg/L

Pipetar 5,0 mL da solução-padrão de fosfatos e transfira para um balão de 100 mL e complete com água destilada.

#### Preparação dos padrões e das amostras

- Pipetar 50,0 mL de padrão/amostra bem agitada para frascos Schott
- Adicionar 0,05 mL (1 gota) de indicadora fenolftaleína
- Se se desenvolver uma cor vermelha, adicionar gota a gota solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5,4 mol  $\text{L}^{-1}$  até a cor desaparecer
- Adicionar 1,0 mL de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$
- 0,4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  sólido
- Levar à autoclave durante 30 minutos
- Deixar arrefecer
- Adicione 0,05 mL (1 gota) de indicadora fenolftaleína
- Neutralize com NaOH até se atingir uma cor rosa ténue
- Dilua até 100 mL com água destilada.

#### Nota:

Em alguns casos poder-se-á formar um precipitado, mas não se deve filtrá-lo. Para qualquer subdivisão da amostra, agite bem. O precipitado (possivelmente de fosfato de cálcio) redissolve nas condições ácidas do método do ácido ascórbico. Os padrões também são submetidos à digestão. No caso de amostras de solo ou lamas, deve ser pesada a amostra e registado o seu valor.

#### Procedimento experimental do fósforo total em amostras e padrões:

- Pipetar para um erlenmeyer 50,0 ml da amostra;
- De seguida, adicionar 0,05 ml (1 gota) de indicador de fenolftaleína (se se desenvolver uma cor rosa, adicionar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 5 N gota a gota até a cor desaparecer);
- Adicionar com uma pipeta 8,0 ml de reagente combinado e misturar bem;
- Depois de aguardar pelo menos 10 min, mas não mais de 30 min, mede-se a absorvância de cada padrão/amostra a 880 nm, utilizando o branco como a solução de referência.

#### No caso de amostras de lamas ou solos:

- Pesar cerca de 0,5 g de amostra;
- Em seguida, juntar 50,0 ml de água destilada;
- Posteriormente, seguir as mesmas etapas de uma amostra líquida se tratasse.

#### Para águas turvas ou com coloração elevada:

- Iniciar por preparar um branco através da adição de todos os reagentes, exceto o ácido ascórbico e o tartarato de potássio e antimónio à amostra;
- De seguida, subtrair a absorvância do branco à absorvância de cada amostra.

#### Considerações a ter:

- Após a receção das amostras, e se não se iniciar de imediato a análise, estas devem ser acidificadas com  $H_2SO_4$  concentrado a  $pH < 2$  e deverão ser guardadas no frigorífico a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .
- Todo o material de vidro utilizado nesta determinação, bem como o da amostragem, deve ser previamente lavado com solução de ácido clorídrico a 10% e passado várias vezes por água destilada, para eliminar a contaminação por detergentes.
- Deve-se evitar o uso de detergentes comerciais uma vez que apresentam fósforo na sua composição.

Relativamente ao procedimento experimental na determinação do fósforo total em águas naturais e em residuais engloba 2 etapas gerais:

- Primeira consiste na digestão ácida da amostra para oxidação da matéria orgânica e libertação do fósforo orgânico sob a forma de ortofosfatos dissolvidos.
- Segunda etapa refere-se ao método colorimétrico para determinação da concentração de fósforo total presente na amostra.

O método utilizado, aplicável a águas residuais e águas naturais com uma concentração de Fósforo Total entre 1,0 e 5,0 mg P/L, é o seguinte:

- A oxidação prévia de todas as formas de fosfatos a ortofosfatos por digestão com peroxidossulfato na presença do metaborato de sódio como catalisador e na posterior reação do ião fosfato com os iões de molibdato e antimónio, em solução ácida, formando um complexo, o heteropoliácido 12-molibdofosfórico que, na presença de ácido ascórbico, se reduz a azul de fosfomolibdato, um complexo de cor azul determinado fotometricamente a 880 nm.
- O método colorimétrico envolve a elaboração de uma curva de calibração e posteriormente a análise da amostra.

Para elaborar a curva de calibração, prepararam-se padrões medindo os volumes indicados na tabela 2 e após 10 minutos realizou-se a leitura das absorvâncias a  $\lambda = 880\text{ nm}$ .

Preparar os seguintes padrões, para balões de **100 mL**:

Padrões (mg/L) Concentração final	V solução 50mg/L
0	0 ml
0,25	1 ml
1	4 ml
2	8 ml

2.5	10 ml
-----	-------

Tabela 2 -Preparação dos padrões de fósforo total

- Em águas:
- Em lamas e solos:

$$mg / LP = \frac{C1 \times 0.3261}{50} \times \text{fator de diluição}$$

$$mg / g \text{ matéria seca} = \frac{\text{Concentração } mg / LP \times 50 / 1000}{m} \times \text{fator de diluição}$$

**Onde:**

**C<sub>1</sub>** – concentração em PO<sub>43</sub>- em aproximadamente 58mL de volume final, expresso em miligramas por litro

**m** – Massa de amostra pesada (g)

Implementação da análise de óleos e gorduras e de hidrocarbonetos totais em águas por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

## 4. Significado e importância da determinação de óleos e gorduras e hidrocarbonetos em amostras de águas

### Óleos de gorduras:

Os óleos e as gorduras são duas substâncias, maioritariamente formada por lípidos, são também constituídos por um conjunto de biomoléculas insolúveis em águas e solúveis em solventes não polares. O grupo dos lípidos exerce as seguintes funções, expulsão da água, reserva de energia e são utilizados como componentes estruturais, sendo que são muito relevantes na formação de membranas celulares.

Os ácidos gordos fazem parte da estrutura química dos óleos e gorduras, e têm uma ligação com o glicerol na formação de glicerolípidos (McMurry,2012) Estes ácidos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, em que têm como característica, uma extremidade polar e outra extremidade apolar, em que esta primeira é composta por um grupo carboxílico, sendo também hidrófilas. Já a outra extremidade, é composta por hidrocarbonada que fornece a esta, funções hidrofóbicas (fig. 5)

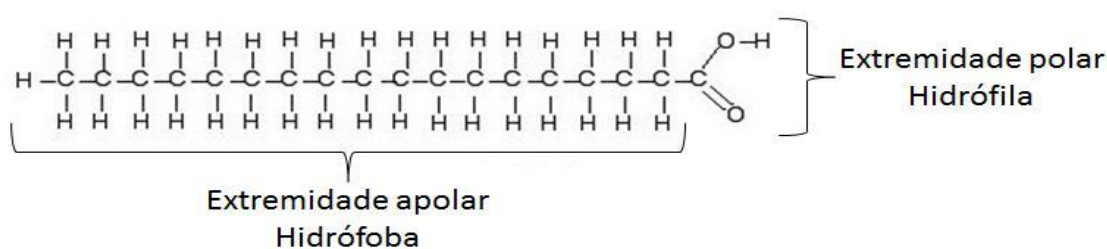


Figura 5 - cadeia hidrocarbonada característica dos ácidos gordos (Fonte: Costa, 2012)

Os ácidos gordos insaturados estabelecem mais do que uma ligação dupla, estando estas separadas por um grupo de metileno. Nas cadeias de ligações duplas, sendo essas ligações “*cis*” (fig. 6) nos ácidos gordos insaturados provocam uma duplicação na cadeira, não acontecendo nos ácidos gordos saturados. Relativamente aos insaturados, o facto de haver uma duplicação causara uma desordem, formando agregados mais fluentes. Já os saturados possuem uma estrutura mais linear, tendo uma organização mais compacta e formando agregados mais rígidos, não havendo uma duplicação da cadeia. Estas ligações “*cis*” influenciam também as forças intermoleculares, sendo que nos ácidos gordos insaturados são mais fracos.

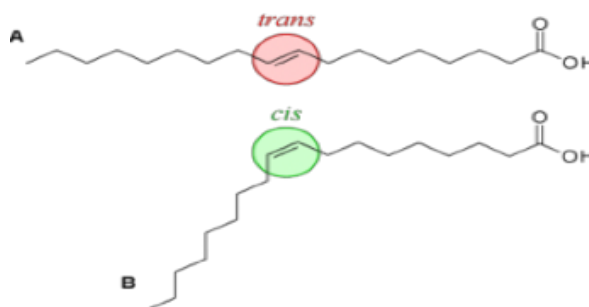


Figura 6 - Diferença entre ligações cis e trans. A- Ligação trans encontrada em alguns ácidos gordos que passaram por processos artificiais; B- Ligação cis dos ácidos gordos naturais (Fonte: Costa, 2012).

### Hidrocarbonetos:

Os hidrocarbonetos, são compostos químicos em que apenas estão presentes átomos de carbono e hidrogénio, em que existe dois tipos de ligação, carbono-hidrogénio e carbono-carbono. Esta última ligação, divide-se em três ligações covalentes simples, duplas e triplas. Relativamente as ligações covalentes simples, existe na cadeia carbonatada, pois trata-se de um hidrocarboneto saturado, nas ligações covalentes duplas ou triplas entre os átomos de carbono, trata-se de hidrocarbonetos insaturados.

Os hidrocarbonetos, têm uma composição apolar, ou seja, a sua solubilidade é mais fraca com compostos polares, e bastante solvente em composto apolar. Esta característica físico-química é muito importante na sua separação dos óleos e gorduras.

Existe dois grandes grupos que constituem os hidrocarbonetos, os hidrocarbonetos alifáticos, dentro deste pode existir a probabilidade de serem constituídos por cadeias carbonatadas abertas (lineares e ramificadas) ou fechadas, e os hidrocarbonetos aromáticos (Fig.7).

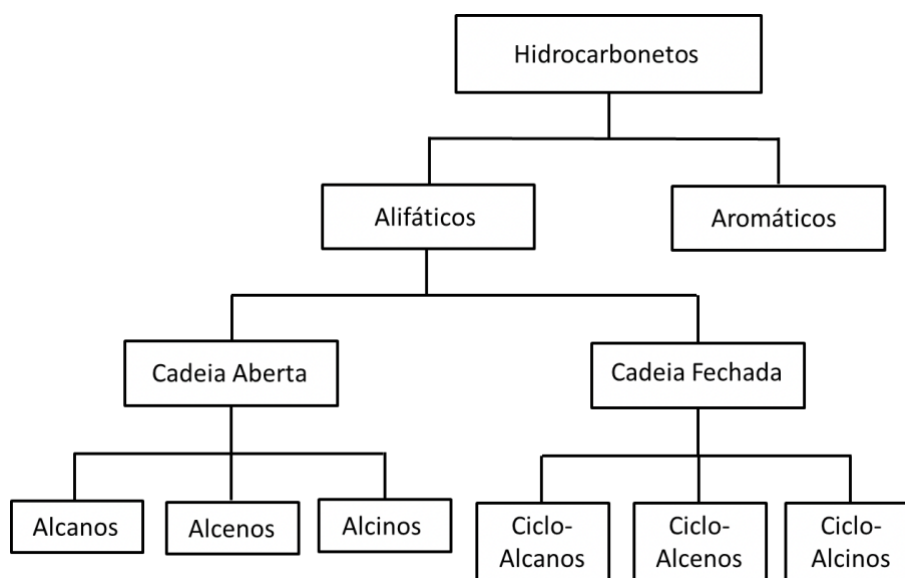


Figura 7 - Divisão dos hidrocarbonetos (Costa, 2012)

#### 4.1. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As grandes preocupações mundiais são a saúde pública e ambiental e a poluição que nelas é exercida. Algumas ações que contribuem para esta poluição, nomeadamente nas águas superficiais e subterrâneas, bem como nos oceanos do planeta, são o crescimento populacional, a expansão industrial e as práticas agrícolas intensivas, mais grave ainda é o aumento de hidrocarbonetos devido ao escoamento industrial. Sendo que este último é um dos principais motivos para o aumento da poluição por hidrocarbonetos de vias negáveis que pode ser rastreado a óleos, lubrificantes, combustíveis ou subprodutos e lamas produzidos por plantas industriais pontuais. (Sistema Nacional de Saúde, 2020)

A espectroscopia infravermelha é uma técnica experimental utilizada com mais frequência para a determinação dos níveis de hidrocarbonetos no ambiente. As matérias relevantes nestas análises podem ser classificadas como hidrocarbonetos de petróleo totais (TPH), orgânicos de gama de gasolina (GRO), óleo e graxa (OG), ou simplesmente óleo na água (OIW). Segundo o método de análise tradicional, neste método era extraído uma amostra de água ou solo com um solvente halogenado que não continha ligações C-H e a magnitude do pico de hidrocarbonetos (C-H), era analisada em uma célula líquida de longo curso com janelas transparentes infravermelhas. Os solventes mais utilizados foram o tetracloreto de carbono e alguns Freons. A extração líquida com solventes halogenados para análise com FT-IR é a base

de muitos métodos governamentais e da indústria em todo o mundo, incluindo muitos países europeus e asiáticos. (thermo Fisher, scientific, 2013)

## 4.2. Descrição do princípio do método e escolha do solvente de extração

Existem três métodos experimentais utilizados para análise dos parâmetros referidos em amostras líquidas: gravímetro, o Soxhlet é o método de escolha quando estão presentes compostos polares, frações de petróleo pesadas ou quando níveis de gorduras não voláteis podem alterar o limite de solubilidade do solvente.

A amostra deverá ser recolhida em frasco de vidro bem lavado com detergente, passado por água e em seguida por solvente para eliminar resíduos e interferência. Como alternativa à lavagem com solvente, os frascos devem ser tapados com papel de alumínio e colocados na mufla a uma temperatura entre os 200°C e 250°C, durante 1 hora. Os frascos não devem ser cheios até ao topo, nem a amostra deve ser subdividida no laboratório. Se não der início à análise no período de 2 horas, deverá proceder-se à acidificação da amostra com Acido Clorídrico 1:1 até pH inferior a 2 e refrigerá-la.

Relativamente às interferências, os solventes orgânicos têm a capacidade de não dissolver os óleos e gorduras, mas também as outras substâncias orgânicas, tais como, os sulfatos, complexos aromáticos, corantes e orgânicos e certos derivados de hidrocarbonetos. Estes compostos são extraídos e considerados como óleos e gorduras. Não existem nenhum solvente para óleos e gorduras. Trata-se de um método experimental. No método gravimétrico, existe a perda de ligação H-C de cadeia curta e de compostos simples aromáticos por volatilização. Durante a pesagem poderá ocorrer um aumento de peso devido à absorção da humidade do ar senão houver o cuidado de manter a amostra num exsiccador. Este método é geralmente aplicado na determinação de óleos e gorduras em amostras de águas superficiais, subterrâneas, de abastecimento, residuais, costeiras e de estuário. A gama de aplicação relativamente a este método refere-se a concentrações superiores a 0,2 mg/L de óleos e gorduras.

O equipamento FTIR é utilizado para a determinação de óleos e gorduras (OG) e hidrocarbonetos (HDE) baseando-se na determinação da energia eletromagnética na região do infravermelho que é absorvida pela ligações C-H que os óleos, gorduras e hidrocarbonetos possuem (Costa, 2012)

O processo de extração líquido-líquido em que o solvente extrator tem de ser imiscível com a amostra para que possa haver separação de fases, sendo que, o solvente terá necessariamente de estar livre de ligações C-H para não interferir com a concentração real no analíto presente na amostra. O método de análise utilizado é baseado no que é proposto no *“Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”* (APHA-AWWA-WEF)

O procedimento experimental de óleos e gorduras:

- Colocar numa ampola de decantação, uma porção representativa de amostra;
- Após o processo de transferência da amostra para ampola de decantação são colocados 20 ml de tetracloroetano;
- Inicia-se a agitação vigoroso durante 2 min para aumentar a área de contacto das fases que são imiscíveis;
- Coloca-se ampola num suporte de ampolas e repousar até se atingir a separação de fases;
- Quando as fases estiverem separadas, a parte inferior (contendo o solvente e os OG e HDE) é drenada através de um funil contendo sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para dentro de um balão de diluição de 50ml.

O sulfato de sódio é utilizado para remover a humidade que a fase do solvente drenado possa conter. Este processo de separação líquido-líquido é repetido mais duas vezes. No final das extrações, o sulfato de sódio é lavado com o solvente extrator com objetivo de o limpar do analito em análise sendo o balão de diluição posteriormente aferido. O extrato é então analisado num equipamento FTIR através de uma célula de quartzo para se determinar os óleos, gorduras e hidrocarbonetos presentes na amostra.

Quando o objetivo é a determinação de hidrocarbonetos presentes na amostra é necessário adicionar sílica gel ao balão de diluição e agitar para promover o contacto entre a sílica gel e o extrato. A sílica gel tem a capacidade de remover compostos polares tais como os óleos e gorduras, deixando apenas os compostos apolares como os hidrocarbonetos. O extrato contendo a sílica é então filtrado através de fibra de vidro e analisado no equipamento FTIR (Pinho *et al.*, 2011).

O equipamento FTIR tem a capacidade de varrer a zona do espectro eletromagnético referente ao infravermelho. É nesta zona do espectro que ocorre a absorção correspondente às ligações C-H.

#### 4.2.1. Materiais, equipamento e reagentes

Nesta técnica são necessários equipamentos específicos para a sua implementação, nomeadamente:

- O espectrofotómetro de infravermelho (utilizado a  $2930\text{ cm}^{-1}$  com células fotométricas de 10 cm de percurso óptico)
- Agitador magnético munido de uma barra de agitação de 4cm, como mínimo revestida a teflon.

Relativamente ao material de vidro utilizado:

- (Todo este material deverá ser previamente passado por freon ou tetracloroeto)
- Ampolas de decantação com tampa de teflon
- Funis de vidro com 7 cm de diâmetro

- Pipetas de 1ml e 25 ml de capacidade
- Papel de filtro (Watman N° 40)
- Matraz ou coluna de cromatografia (1cm de diâmetro, +/- 20 cm de altura)
- Balões volumétricos com tampas de teflon
- 2 células fotométricas de 10 com de percurso ótico

Os reagentes utilizados nesta técnica são os seguintes:

- Ácido clorídrico concentrado 1:1
- Tetracloroetano ( $C_2Cl_4$ ) de carbono para fins espectrofotométricos de IV
- Cloreto de Sódio, NaCl, anidro; Sulfato de sódio,  $Na_2SO_4$ , anidro
- Hexadecano ( $C_{14}H_{34}$ )
- Isoctano ( $C_8H_{18}$ )
- Benzeno ( $C_6H_6$ )
- Sílica Gel ( $SiO_2$ )
- Relativamente á preparação da solução mãe:
- Pipetar para um balão volumétrico, de vidro e de tampa de teflon, 15 ml de hexadecano, 15 ml de isoctano e 10 ml de benzeno.

Para a realização da solução stock:

- Pipetamos 1 ml da solução mãe para um balão volumétrico de 200 ml e completar com solvente.
- Nos padrões preparamos uma serie de padrões, partindo da solução stock, de 100, 200, 300, 400 e 500 ppb.

Procedimento experimental:

- Marcar a garrafa da amostra com um marcador de vidro, para mais tarde determinar o volume.
- Adicione 5 ml de ácido clorídrico 1:1 por cada litro de amostra (se a amostra não for acidificada na altura da colheita)
- Levar a agitação forte com o auxílio de barra de agitação magnética verificando se o ph da solução é inferior a 2. (caso não seja adicionar mais ácido clorídrico até o valor ser inferior a 2)
- Introdução da amostra na ampola de extração 1 litro
- Introduzir 30 ml de tetracloroetano de carbono
- Agitar vigorosamente durante 2 minutos (este procedimento deverá ser faseado acrescentando 15 ml de cada vez).
- Passar o solvente pelo frasco de amostragem antes da sua introdução na ampola de extração
- Por último deixamos decantar por 10 minutos.

Procedimento experimental de óleos totais:

- Colocar aproximadamente 10 g de sulfato de sódio anidro

- Decantar o extrato passando por um filtro whatman 40 (previamente lavado com solvente)
- Recolher o filtrado para a célula
- Determinar o pico máximo de absorção de 2930  $\text{cm}^{-1}$  (tendo como referência o solvente)

#### Procedimento experimental dos hidrocarbonetos:

- Iniciar com a passagem do filtrado previamente lido no item anterior (contido na célula espectrofotométrica) para uma erlenmeyer com 3g de sílica de gel –por cada 100 mg de óleos e gorduras (no máximo de 30g), o qual está colocado sobre um agitador magnético. Realizar a extração durante 5 minutos com agitação.
- Nas vias da coluna cromatográfica, passamos o filtrado previamente lido no item anterior (contido na célula espectrofotométrica) por uma coluna cromatográfica previamente limpa com solvente e cujo enchimento é feito com 5 cm de absorvente e uma colher de sulfato de sódio anidro. Por fim recolher o extrato final e colocar na célula de leitura, determinando o pico máximo a 2930  $\text{cm}^{-1}$  tendo como referência o solvente.

### **4.3. Validação e controlo de qualidade do método de determinação de óleos e gorduras e hidrocarbonetos por FTIR**

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. É por isso fundamental que os Laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrarem, através de um plano de validação, que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida. (Relacre, 2000)

A descrição dos métodos internos de ensaio deve ser feita em documentos, de forma detalhada, de modo que qualquer pessoa com formação adequada o consiga executar (Relacre, 2000)

Sempre que um laboratório pratica métodos internos de ensaio terá que instruir um processo de validação desses métodos, que inclua todos os registos obtidos. Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa, mas em geral compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros seguintes:

- Gama de trabalho/Linearidade;
- Limiares analíticos (Deteção e Quantificação);
- Sensibilidade;
- Precisão;

- Exatidão.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação direta e por avaliação indireta e deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo reconhecido. (Relacre, 2000)

A validação é efetuada por determinação e evidência de parâmetros característicos inerentes ao método, nomeadamente os que descrevemos a seguir (Relacre, 2000):

#### 4.3.1. Especificidade/seletividade

A Seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito, em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende, no entanto, do tipo de compostos a analisar.

Por outro lado, diz-se que um método é específico se tiver a capacidade de identificar e diferenciar um determinado analito relativamente a outras substâncias presentes na amostra e sem que estas interfiram com os resultados (OIE, 2020). Para avaliar a interferência de outras substâncias no método analítico, é fundamental proceder a um teste de recuperação em que se utiliza uma série de amostras, de igual matriz (por exemplo terá que ser aquosa se estamos a analisar águas), em que o único fator que varia é a concentração (conhecidas) do analito e que deverão estar dentro da gama de trabalho. As amostras devem ser analisadas em duplicado e sob condições que permitam a repetibilidade (Relacre, 2000).

Um método de ensaio pode ser considerado como específico e seletivo quando após a realização do teste de recuperação, se constatar que as taxas de recuperação são próximas dos 100 % (Relacre, 2000).

A sensibilidade constitui outro parâmetro importante na validação de um método analítico. A sensibilidade define-se como quociente entre a resposta de um instrumento de medição e a correspondente variação do estímulo (Relacre, 2000). Este parâmetro pode depender do valor da grandeza a medir e a variação de grandeza que se pretende medir deve ser maior que a resolução. De facto, a sensibilidade determina a capacidade de um determinado método de identificar pequenas diferenças de uma dada grandeza do analito. É um parâmetro importante quando se pretende compara vários métodos analíticos na determinação de um dado analito (Relacre, 2000). Pequenas variações da concentração do analito podem ter um efeito significativo no resultado final da grandeza medida quando estamos perante métodos sensíveis. Tal critério representa a capacidade do método de criar uma variação no valor da grandeza em estudo, através de um pequeno aumento da concentração ou quantidade do analito (Brito *et al.*, 2003). Em termos práticos, podemos dizer que a sensibilidade corresponde ao declive da curva de calibração que é obtida entre a resposta e a concentração do analito (Relacre, 2000).

### 4.3.2. Quantificação

Para interpretar as informações veiculadas pelos estudos e ensaios efetuados, o analista apoia-se no cálculo de vários parâmetros, entre os quais se destacam (Relacre, 2000):

- Curvas de calibração;
- Limiares analíticos do método de ensaio.

#### 4.3.2.1. Curvas de Calibração

Em análises quantitativas, a calibração indica um processo pelo qual a resposta dum sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Em métodos instrumentais de análise, a calibração analítica do equipamento processa-se geralmente do seguinte modo (Relacre, 2000):

- O analista prepara uma série de soluções-padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida;
- Estas soluções-padrão de calibração são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar;
- Estabelece-se um gráfico de calibração (sinal do equipamento em função da concentração) e determina-se a concentração do parâmetro nas amostras, por interpolação.

A forma algébrica da equação de uma reta é dada pela seguinte expressão:

$$y = a + b x$$

Em que **a** representa a ordenada na origem e **b** o declive da reta. Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes,  $(x_1, y_1)$ ;  $(x_2, y_2)$ ;...;  $(x_i, y_i)$ ;...;  $(x_N, y_N)$  que deverá corresponder a **N** pontos marcados na reta. O ponto  $(x_1, y_1)$  pertence geralmente ao branco. A média de valores de **x** (concentração dos padrões utilizados) representa-se por  $\bar{x}$  e a média dos valores de **y** (sinal instrumental) representa-se por  $\bar{y}$  (Relacre, 2000)

#### 4.3.3. Gama de trabalho

Podemos definir gama de trabalho como sendo o intervalo entre os níveis superior e inferior de um procedimento analítico para a qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade (Relacre, 2000). O intervalo é normalmente expresso nas mesmas unidades que os resultados dos ensaios (por exemplo, percentagem, partes por milhão) obtidos pelo método analítico.

O Limite de Detecção (L.D.) pode ser definido como o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detetada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exato.

Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa, obviamente, a ausência do analito a medir. Apenas se pode afirmar que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um determinado valor. Em termos práticos, o conceito de limite de deteção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, ou seja, de uma amostra que contém a mesma matriz, mas não contém o analito (note-se que existem vários tipos de brancos) (Relacre, 2000).

Para uma correta definição do limite de deteção é necessário introduzir dois conceitos de estatística: erro do tipo I e erro do tipo II. O erro do tipo I (risco  $\alpha$ ) é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise quando de facto não existe esse componente na amostra, enquanto o erro do tipo II (risco  $\beta$ ) é a probabilidade de concluir pela ausência do componente em análise, quando ele de facto existe. Para uma correta análise dos limiares analíticos, estes dois tipos de erros devem ser minimizados, optando-se por usar as recomendações da IUPAC ( $\alpha = \beta = 5\%$ ) (Relacre, 2000).

Quanto ao Limite de Quantificação (L.Q.), pode-se dizer que corresponde à menor concentração que é possível ser medida pelo método analítico utilizado, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória. Este teste pode ser realizado através da passagem, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação. Segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados) para estes padrões não deve exceder 10% (Relacre, 2000)

#### 4.3.4. Precisão

A precisão é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É importante salientar que será mais realista estudar preferencialmente a precisão sobre amostras, para minimizar efeitos de matriz. Existem duas medidas extremas para avaliar esta dispersão, designada por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou

variabilidade intralaboratorial. Convém referir que geralmente a precisão varia com a gama de concentrações (Relacre, 2000)

#### **4.3.4.1. Repetibilidade**

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efetuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como:

- Mesmo Laboratório;
- Mesmo analista;
- Mesmo equipamento;
- Mesmo tipo de reagentes;
- Curtos intervalos de tempo.

O limite de repetibilidade ( $r$ ) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio ( $X_i, X_{i-1}$ ), obtidos nas condições acima referidas. Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se  $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ . Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite, dever-se-á, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas, nomeadamente a Norma ISO 5725-2 e ISO 5725-6 (Relacre, 2000).

A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio intralaboratorial ou a partir de ensaios efetuados no próprio Laboratório (Relacre, 2000).

Para determinar a repetibilidade de um método no próprio Laboratório, efetuam-se um conjunto de medições ( $n > 10$ ) sobre uma mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Caso se justifique, este procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentração, devendo cobrir todo o domínio de aplicação do método (Relacre, 2000).

Quando se pretende avaliar a repetibilidade através de um ensaio intralaboratorial, o número de medições, em cada nível de concentrações, poderá ser inferior ( $n \geq 2$ ). Em ambos os casos, o cálculo é efetuado separadamente para cada nível de concentração  $i$ , a partir dos resultados obtidos e eliminando os valores aberrantes (ISO 5725-2, ASTM E178) (Relacre, 2000)

#### **4.3.4.2. Reprodutibilidade**

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efetuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como:

- Diferentes laboratórios;
- Diferentes operadores;
- Diferentes equipamentos;
- E/ou épocas diferentes;

O limite de reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições referidas (Relacre, 2000).

#### 4.3.5. Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como (relacre, 2000):

- Diferentes analistas;
- Diferentes equipamentos;
- Diferentes épocas;
- Com/sem verificação da calibração.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar, pelo que se desenvolverá, neste guia, apenas a situação intralaboratorial (Relacre, 2000).

Para determinar a precisão intermédia de um método, efetuam-se **n** medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outras gamas de concentração (Relacre, 2000).

Na maioria dos casos, o valor da precisão intermédia é função da gama de concentração do ensaio e o seu cálculo é efetuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados aberrantes (ISO 5725-2, ASTM E178). A visualização gráfica dos valores também pode ser útil para identificar a existência de valores aberrantes (ISO 5725-3). (relacre, 2000)

#### 4.3.6. Exatidão

A exatidão pode ser definida como sendo a conformidade entre o valor dado como verdadeiro, ou esperado, e o valor resultante da medição (Brito et al., 2003; Relacre, 2000). Este parâmetro consiste numa agregação entre os componentes de erros aleatórios e os componentes de erros sistemáticos (Relacre).

Os processos usados para determinar a exatidão de um método são, entre outros:

- Materiais de referência certificados;
- Ensaio interlaboratoriais;
- Testes comparativos;
- Ensaio fortificados.

A exatidão corresponde à comparação entre os valores obtidos pelo método que se pretende validar com os obtidos, na mesma amostra, por um outro método já validado. Posteriormente, é calculada a diferença entre ambos os valores. O valor obtido será comparado com o valor que seria esperado obter: o valor zero (Brito *et al.*, 2003; Relacre, 2000). É, então, estabelecido o nível de confiança tendo em consideração o intervalo de concentração.

#### **4.3.6.1. Materiais de referência certificados**

Sempre que possível, os Materiais de Referência Certificados (MRC) devem ser usados no processo de validação de um método de ensaio. Além disso, estes materiais constituem uma excelente ferramenta no Controlo Externo da Qualidade de uma análise química (Relacre, 2000).

Um material de referência certificado tem associado um valor de concentração, ou outra grandeza, para cada parâmetro e uma incerteza. Estes materiais têm como objetivo avaliar o desempenho dos laboratórios e controlar a exatidão dos ensaios realizados (Relacre, 2000). O valor obtido através dos MRC é então comparado com respetivo valor certificado, de modo a que seja possível a determinação do erro e da exatidão da análise. No caso de se verificar que o valor obtido não se encontra dentro do intervalo de incerteza definido para o valor certificado, deve-se tentar identificar o motivo pelo qual ocorreu tal desvio e tentar eliminá-lo.

Os materiais de referência certificados são importantes para avaliar o desempenho de um laboratório ou para avaliar um método padronizado que esteja a ser aplicado pela primeira vez no laboratório ou para avaliar o desempenho de um analista (Relacre).

#### **4.3.6.2. Ensaio interlaboratoriais**

Os ensaios interlaboratoriais, permitem que um laboratório evolua de forma gradual, uma vez que faz com que se trabalhe com diferentes amostras e cujo valor dito como verdadeiro não é conhecido, dando assim origem a novos desafios (Relacre, 2000). Existem vários tipos de ensaios interlaboratoriais, entre os quais os chamados de aptidão, de exatidão e de normalização.

Os laboratórios devem realizar de forma regular ensaios de aptidão, que têm como propósito avaliar a conduta dos laboratórios. Participar em ensaios de certificação ou de normalização contribui com informação e experiência importantes (relacre, 2000). Os ensaios interlaboratoriais de normalização destinam-se a estudar as características

de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e repetibilidade. Neste caso, é condição de acesso a utilização exclusiva do método estipulado para esses ensaios (Relacre, 2000)

Em termos práticos, quando o Laboratório pretenda avaliar a repetibilidade e a reprodutibilidade de um método, demonstrando em simultâneo que tem uma precisão compatível com a de outros laboratórios, pode recorrer a um ensaio do tipo de normalização. Quando tem por objetivo evidenciar a exatidão dos seus resultados, então pode participar em ensaios do tipo de aptidão (Relacre, 2000).

Os resultados obtidos pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais em que participa devem ser objeto de uma análise cuidada, de que poderá resultar um plano de ações corretivas (Relacre, 2000)

#### **4.3.6.3. Testes comparativos**

Um outro contributo importante na validação de um método interno de ensaio consiste na comparação dos resultados obtidos a partir desse método com os resultados conseguidos através de um método de referência. Pretende-se assim determinar a proximidade existente entre os seus resultados, ou seja, determinar a exatidão do método interno, em relação ao método de referência. Na prática, efetuam-se análises em duplicado, utilizando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras. Este estudo poderá ser realizado numa gama restrita de concentrações ou em toda a gama de concentrações em que se pretende validar o método (Relacre, 2000).

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, nomeadamente (Relacre, 2000):

- Teste de hipótese: teste t das médias;
- Teste de hipótese: teste t das diferenças (amostras emparelhadas);
- Teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio.

## 5. Considerações finais

A integração nas atividades do Laboratório A.LOGOS, bem como o enquadramento com a documentação utilizada no laboratório, sobretudo a nível de controlo de qualidade, permitiu desenvolver as competências no manuseio de equipamentos, materiais e reagentes de laboratório. Também a familiarização com as práticas do Laboratório, assim como o acompanhamento dos técnicos na execução das várias metodologias em vigor e a execução analítica das metodologias em amostras reais com supervisão foi atingido com sucesso, uma vez que no decorrer do período de 03/02/2020 a 20/03/2020 foi possível adquirir competências em métodos analíticos referentes à análise de vários tipos águas, sendo possível aplicar os conhecimentos que foram obtidos ao longo do curso.

Este período proporcionou ainda a possibilidade de ter um contacto mais concreto com o mundo laboral, resultando numa evolução da capacidade e experiência profissional, tornando-se muito importante a aprendizagem e aumento significativo dos conhecimentos adquiridos.

Infelizmente, devido ao estado de emergência, não consegui contribuir na prática para implementar a nova técnica de análise no equipamento FTIR, de óleos e gorduras em águas. Contudo, a revisão bibliográfica sobre a metodologia analítica para determinação de óleos e gorduras e hidrocarbonetos totais, em águas residuais, por espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), utilizando como solvente de extração tetracloroetileno e sobre o plano de validação deste método analítico, foi igualmente importante para a formação não só em termos técnicos, mas sobretudo em termos científicos, já que permitiu também desenvolver competências da pesquisa e escrita de relatórios técnico-científicos.

## 6. Referências Bibliográficas

Alves, C. (2010). Tratamento de Águas de Abastecimento. 3ª Edição, Ed. Publindústria. ISBN: 9789728953461.

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation (APHA-AWWA-WEF) (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21ª edição, Washington. ISBN: 978-0875530478.

Brito, N.M, Amarante Junior, O.P., Polese, L., Ribeiro, M.L. (2003). Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, 13, p. 129-146.

Brito, A.G., Oliveira, J.M.M., Peixoto, J. M. (2014). Tratamento de Água para Consumo Humano e Uso Industrial - 2ª edição, Ed. Publindústria. ISBN: 9789899889606.

Cerdeira, L. (2008). Acompanhamento do Arranque/Exploração de uma ETAR. Dissertação de Mestrado, Mestrado em Engenharia Química. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto.

Costa, A. L. (2012). Determinação de Óleos e Gorduras e Hidrocarbonetos Totais, por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier, com recurso ao solvente de extração tetracloroetileno. Relatório de Estágio apresentado para a obtenção do grau de Mestre em Processos Químicos e Biológicos, Departamento de Engenharia Química e Biologia.

Costa, D.C. (2011). Caracterização e Tratamento de Efluentes Resultantes da Actividade de Produção de Queijo. Dissertação de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

Decreto de lei nº 152/2017, de 7 de dezembro. Diário da República nº 235 - I Série A. Ministério do Ambiente. Lisboa.

Decreto-Lei 152/97, de 19 de Junho, transposição da Directiva 91/271/CEE, de 21 de Maio de 1991, relativa ao tratamento de águas residuais urbanas. In Diário da República nº 139/97 - Série I-A de 19-6-1997, 2959-2966.

Decreto- Lei 236/98, de 1 de Agosto. In Diário da República nº 176/98 Série I-A de 1-8-1998, 3677-3722.

McMurry, J. (2012). Organic Chemistry. 8th Edition, ed. Brooks/Cole Cengage Learning. ISBN-13: 978-0840054449.

Mendes, B. e Santos Oliveira, J.F., (2004). Qualidade da água para consumo humano. Edições Técnicas, Lidel, Lisboa. ISBN: 9789727572748.

Pinho Carina, Mansilha Catarina, Gameiro Paula (2011). Evaluation of the actual standard procedures for analysis of total extractable hydrocarbons in environmental water matrices. *Desalination* 273, 308–315.

Quinteiro, A. C. M. (2012). Análise da eficiência relativa de remoção dos leitos percoladores da ETAR do Choupal. Dissertação de Mestrado em Processos Químicos e Biológicos: Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior de Engenharia de Coimbra.

Relacre (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal) (2000). Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. Guia n.º 13, Ed. Relacre, Lisboa. ISBN: 9728574029.

World Organisation for Animal Health (OIE). *Guia para a Validação dos Métodos Analíticos para a determinação de resíduos em matrizes biológicas de origem animal*. World Organisation for Animal Health. [acedido: 5 de julho de 2020.] <http://www.rr-americas.oie.int/index.php?id=315>.

Thermo Fisher Scientific Inc. (NYSE: TMO) (2013). Marca de venda de produtos científicos. <https://corporate.thermofisher.com/en/home.html>