



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Validação e Controlo de Qualidade do Fósforo
Total em Águas Residuais
Análise da Qualidade da Água
(Versão Final)**

Patrícia Cristina Lopes Fernandes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Industrial
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof^a. Doutora Albertina Maria Mendes Marques Bento Amaro
Coorientadora: Mestre Lígia Maria Baptista Calado Borges

Covilhã, Junho de 2015

Agradecimentos

A elaboração desta dissertação não seria possível trabalhando sozinha. Sendo assim, quero agradecer a colaboração das várias pessoas envolvidas.

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais pela oportunidade, esforço financeiro, dedicação, pelas palavras de coragem que permitiram que esta etapa da minha vida se concretizasse.

De uma maneira especial quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Albertina Maria Mendes Marques Bento Amaro pela oportunidade de me proporcionar esta experiência enriquecedora, de fazer a parte experimental desta dissertação na empresa Aquimisa - Consultores Agro-industriais, Lda, o que me permitiu ter uma ideia do que é trabalhar numa empresa e qual o espírito envolvente, preparando-me para o futuro. Da mesma forma agradeço pela confiança que depositou em mim, pela orientação, paciência e disponibilidade.

Não posso deixar de agradecer à empresa Aquimisa - Consultores Agro-industriais, Lda, por me acolher e disponibilizar o seu laboratório de físico-química para o desenvolvimento da parte experimental. Dentro desta empresa agradeço especialmente à Mestre Lígia Borges pela dedicação, orientação, disponibilidade, tempo e pelos ensinamentos transmitidos, que permitiram aumentar os meus conhecimentos especialmente na área de controlo de qualidade. Também não posso deixar de agradecer aos técnicos do laboratório pelo incentivo e pelos momentos agradáveis e divertidos passados.

Quero também agradecer aos meus amigos, que nos piores momentos me deram força para continuar, especialmente à Margarida Gomes pela troca de ideias e de vivências.

A todos que me ajudaram e me acompanharam nesta etapa, o meu sincero obrigada!

Resumo

No presente trabalho implementou-se e validou-se um método de determinação do fósforo total em águas residuais utilizando a espectrofotometria de absorção molecular no Ultravioleta- Visível (UV-VIS), com o intuito do método ser usado em rotina no laboratório de físico-química da empresa Aquimisa.

O método estabelecido consiste na digestão da amostra e posterior quantificação através de um método colorimétrico, apresentando uma gama de trabalho de 1 mg P/L a 15 mg P/L.

A validação de um método garante a qualidade e a credibilidade dos resultados obtidos. Para assegurar estas propriedades realizou-se o estudo de vários parâmetros, como: a precisão, a exatidão, a sensibilidade, a gama de trabalho, a linearidade e os limiares analíticos. Após a validação do método, este encontrou-se apto para entrar em rotina. Após a validação, o método encontra-se apto a entrar em rotina.

Quando o método entra em rotina o laboratório tem de garantir o controlo de qualidade da análise química, que é assegurada através do controlo de qualidade interno e externo. O controlo interno foi assegurado através da verificação da sensibilidade e da linearidade da curva de calibração, da verificação do limite de quantificação do método e pela utilização de brancos digeridos, duplicados de amostras, recuperações de amostras e de padrões de controlo digeridos e não digeridos. O controlo de qualidade externo é assegurado pelos ensaios interlaboratoriais.

Neste mesmo trabalho realizou-se a determinação de pH, condutividade, turvação, nitratos, oxidabilidade, nitritos, cor, cheiro e sabor e azoto amoniacal numa água para consumo humano com o objetivo de averiguar a qualidade da água, ou seja, se se encontra apta para consumo. Após estas análises conclui-se que esta água estava de acordo com os valores paramétricos descritos no Decreto-lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, que se encontra em vigor.

Com o mesmo intuito realizou-se a determinação da carência química de oxigénio, a carência bioquímica de oxigénio e os sólidos suspensos totais numa água residual. Depois de obtidos os valores consultou-se o Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto, onde estão presente os valores de limite de emissão na descarga de águas residuais, concluindo-se que esta água não poderia ser descarregada.

Palavras-chave

Fósforo total, Espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS, Validação de métodos internos, Controlo de qualidade.

Abstract

In the present work it is implemented and validated a method for determining total phosphorus in wastewater using molecular absorption in the ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-VIS). The objective of this work is to use the method in the physical-chemistry laboratory of Aquimisa Company in routine procedures.

The established method consists of the acidic digestion of the sample and subsequent quantification by a colorimetric method, with a working range of 1 to 15 mg P/L.

Validation of a method ensures the quality and credibility of the results obtained. To ensure these properties the study of various parameters such as precision, accuracy, sensitivity, working range, linearity and analytical thresholds were performed. After validation of the method, this was found fit to enter routine.

When the method comes into routine laboratory must ensure quality control of chemical analysis, which is attained by controlling the internal and external quality. Internal control was assured by checking the sensitivity and linearity of the calibration curve, verifying the quantification limit of the method and the use of digested blanks, duplicate samples, recoveries of samples and standards control digested and undigested. Control of external quality is ensured by inter-laboratory tests.

In this same work it was carried out the determination of pH, conductivity, turbidity, nitrates, oxidisability, nitrites, color, smell and taste and ammoniacal nitrogen in a human consumed water for the purpose of ascertaining the quality of water, i.e. if it is suitable for consumption. After this analysis, it is concluded that this water was according the parametric values set out in “Decreto-lei nº 306/2007, de 27 de Agosto”, which has been in operation.

With the same purpose it was determined the chemical oxygen demand, biochemical oxygen demand and total suspended solids in a wastewater sample. After obtaining the consulted values the, where the “Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto”, emission limit values in the discharge of wastewater are presented, it was concluded that this water could not be discharged.

Keywords

Total phosphorus, Molecular absorption UV-VIS spectrophotometry, Internal validation methods, Quality control.

Índice

1	Introdução	1
1.1	Objetivos	2
1.2	Estrutura da dissertação	2
1.3	Empresa - Aquimisa, Lda.	4
2	Fósforo total em águas residuais	5
2.1	Aspetos teóricos.....	5
2.1.1	Seleção do método.....	7
2.1.2	Preservação e armazenamento de amostras de água (ISO 5667-3:2012).....	8
2.1.2.1	Recipientes	8
2.1.2.2	Procedimento para análise físico-química	8
2.1.2.3	Transporte e receção	9
2.1.3	Espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS	10
2.1.4	Validação de métodos internos	12
2.1.4.1	Avaliação indireta	12
2.1.4.2	Estimativa da incerteza	18
2.1.4.3	Avaliação direta	23
2.1.5	Controlo de qualidade	27
2.2	Parte experimental.....	33
2.2.1	Equipamento e reagentes.....	33
2.2.2	Procedimento	34
2.2.2.1	Digestão.....	34
2.2.2.2	Método colorimétrico.....	35
2.3	Análise de resultados	37
2.3.1	Digestão.....	37
2.3.2	Validação do método	38
2.3.2.1	Avaliação indireta	38
2.3.2.2	Estimativa da incerteza	51
2.3.2.3	Avaliação direta	59
2.3.3	Controlo de qualidade interno	61

2.4 Conclusões	70
3 Parâmetros físico-químicos acreditados	74
3.1 Introdução.....	74
3.2 Análise de resultados	76
3.2.1 Água de consumo humano	76
3.2.1.1 pH.....	76
3.2.1.2 Condutividade	77
3.2.1.3 Turvação	78
3.2.1.4 Nitratos	79
3.2.1.5 Oxidabilidade	80
3.2.1.6 Nitritos	81
3.2.1.7 Cor	81
3.2.1.8 Cheiro e sabor	82
3.2.1.9 Azoto amoniacal.....	83
3.2.2 Água residual	84
3.2.2.1 Carência química de oxigénio, (CQO)	84
3.2.2.2 Carência bioquímica de oxigénio, (CBO ₅).....	85
3.2.2.3 Sólidos suspensos totais, (SST).....	85
3.3 Conclusões	88
4 Perspetivas futuras	90
Referências bibliográficas	92
Anexo 1: Procedimentos	95
A. Determinação do pH	95
B. Determinação da condutividade	97
C. Determinação da turvação	99
D. Determinação de nitratos	101
E. Determinação da oxidabilidade	103
F. Determinação de nitritos	106
G. Determinação da cor	109
H. Determinação do cheiro e sabor	111
I. Determinação do Azoto amoniacal	114

J.	Determinação da carência química de oxigénio.....	117
K.	Determinação da carência bioquímica de oxigénio.....	120
L.	Determinação dos sólidos suspensos totais.....	124
Anexo 2: Tabelas.....		128

Índice de Figuras

Figura 1.1- Esquema da dissertação.	2
Figura 1.2- Esquema da dissertação (continuação).	3
Figura 1.3- Esquema da dissertação (continuação).	3
Figura 2.1- Dispersão da radiação eletromagnética monocromática ao incidir numa célula que contém uma solução absorvente [14].	11
Figura 2.2- Distribuição dos resíduos.	42
Figura 2.3- Representação gráfica das recuperações na validação do método.	46
Figura 2.4- Carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L na validação do método.	47
Figura 2.5- Carta de controlo de amplitude móveis para o padrão 4 mg P/L na validação do método.	48
Figura 2.6- Carta de controlo de indivíduos do padrão de controlo digerido de 4 mg P/L na validação do método.	49
Figura 2.7- Carta de controlo de amplitudes móveis do padrão de controlo digerido de 4 mg P/L na validação do método.	50
Figura 2.8- Representação gráfica dos z-scores obtidos no ensaio bilateral.	61
Figura 2.9- Carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L em rotina.	63
Figura 2.10- Carta de controlo de amplitudes móveis do padrão de 4 mg P/L em rotina.	64
Figura 2.11- Carta de Controlo de indivíduos do padrão 4 mg P/L digerido em rotina.	65
Figura 2.12- Carta de controlo de amplitudes móveis do padrão 4 mg P/L digerido em rotina.	65
Figura 2.13- Carta de controlo de amplitudes relativas de duplicados obtida na validação. .	66
Figura 2.14- Carta de controlo de amplitudes relativas para os duplicados em rotina.	67
Figura 2.15- Representação gráfica das recuperações do método em rotina.	69

Índice de Tabelas

Tabela 2.1- Valor de limite de emissão do fósforo total na descarga de águas residuais [11].	. 6
Tabela 2.2- Limites da carta de controlo de indivíduos para o padrão de controlo.....	31
Tabela 2.3- Limites da carta de amplitudes móveis para o padrão de controlo	31
Tabela 2.4- Limites da carta de amplitudes relativas para duplicados.....	32
Tabela 2.5- Equipamento utilizado para a determinação do fósforo total em águas residuais	33
Tabela 2.6- Reagentes.....	33
Tabela 2.7- Preparação de soluções	34
Tabela 2.8 - Preparação dos padrões de fósforo total.....	36
Tabela 2.9- Concentração de fósforo total obtidas após digestão na autoclave.....	37
Tabela 2.10- Concentrações de fósforo total: digestão em placa de aquecimento	38
Tabela 2.11- Valores de absorvância dos padrão 1 mg P/L e 15 mg P/L.....	39
Tabela 2.12- Teste de homogeneidade de variâncias	40
Tabela 2.13- Curvas de calibração e coeficientes de correlação.....	40
Tabela 2.14- Concentrações dos padrões e respetivas absorvâncias	41
Tabela 2.15- Resíduos	42
Tabela 2.16- Parâmetros necessários para a determinação do SY2.....	42
Tabela 2.17- Teste de linearidade	43
Tabela 2.18- Declives das curvas de calibração e erro relativo associado.....	43
Tabela 2.19- Concentrações obtidas do padrão de 1 mg P/L	44
Tabela 2.20- Limiares analíticos	45
Tabela 2.21- Recuperação de amostras.....	45
Tabela 2.22- Dados da representação gráfica das recuperações	46

Tabela 2.23- Padrão 4 mg P/ L	47
Tabela 2.24- Dados da carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L.	47
Tabela 2.25- Dados da carta de controlo de amplitudes móveis do padrão de 4 mg P/L.	48
Tabela 2.26- Concentrações do padrão de controlo digerido de 4 mg P/L.	49
Tabela 2.27- Dados da carta de controlo de indivíduos do padrão digerido de 4 mg P/L.	49
Tabela 2.28- Dados da carta de controlo de amplitudes móveis do padrão digerido de 4 mg P/L.	50
Tabela 2.29- Precisão e exatidão experimental e do Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto.	51
Tabela 2.30-Valores de absorvâncias para os padrões da curva de calibração.	51
Tabela 2.31- Valores do padrão de 4 mg P/L.	52
Tabela 2.32- Valores para a determinação do u_{reta}	52
Tabela 2.33- Duplicados das amostras.	53
Tabela 2.34- Solução-mãe de 50 mg P/L.	54
Tabela 2.35- Recuperação de amostras.	56
Tabela 2.36- Valores de parâmetros para a determinação de $u(R_m)$	57
Tabela 2.37- Resultados do método a validar e do método de referência.	59
Tabela 2.38- Parâmetros necessários para a determinação do teste t das diferenças.	60
Tabela 2.39- Valores obtidos pelo laboratório e valores da subcontratação com o respetivo z-score.	61
Tabela 2.40- Parâmetros de controlo de qualidade na análise da amostra 1.	62
Tabela 2.41- Parâmetros de controlo de qualidade da análise da amostra 2.	62
Tabela 2.42- Valores obtidos para a análise da curva de calibração.	63
Tabela 2.43- Concentração das amostras e dos seus duplicados.	66
Tabela 2.44- Dados da carta de controlo de amplitudes relativas dos duplicados.	66

Tabela 2.45- Concentrações dos vários brancos do processo.	68
Tabela 2.46- Análise de brancos com o método em rotina.	68
Tabela 2.47- Verificação do L.Q. com o método em rotina.	70
Tabela 3.1- Valores paramétricos da água de consumo humano dos parâmetros de estudo [36].	75
Tabela 3.2- Valores limite de emissão de descarga de águas residuais [11].	75
Tabela 3.3- Critérios da calibração e intervalos de aceitação.	76
Tabela 3.4- Tabela resumo da carta de indivíduos do padrão controlo de pH = 7,00.	77
Tabela 3.5- Tabela resumo da carta de indivíduos do padrão de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$	78
Tabela 3.6- Branco e padrões de 0,02 UNT e 1000 UNT.....	78
Tabela 3.7- Padrões para a verificação da curva de calibração dos nitratos.	79
Tabela 3.8- Padrões da curva de calibração dos nitritos.....	81
Tabela 3.9- Padrões para a verificação da curva de calibração da cor.....	82
Tabela 3.10- Padrões da curva de calibração do azoto amoniacal.	83
Tabela 3.11- Massas dos conjuntos de amostra e do padrão de controlo.	86
Tabela 3.12- Valores obtidos na análise à água de consumo humano.	88
Tabela 3.13- Valores dos parâmetros obtidos da água residual.	88

1 Introdução

O fósforo é um elemento químico que necessita de controlo antes da sua descarga para os vários recursos hídricos, apresentando-se na forma de ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-), polifosfatos e fosfatos orgânicos e inorgânicos. Quando é descarregado em excesso nos cursos de águas, favorece o crescimento descontrolado de fitoplâncton e algas, levando à eutrofização do meio [1].

O processo de eutrofização consiste no enriquecimento das águas por nutrientes (essencialmente azoto e fósforo) que levam ao rápido crescimento do fitoplâncton aumentando a turbidez da água. Com o aumento da turbidez, a luz não alcança a profundidade da água, não permitindo a realização da fotossíntese pelas algas mais profundas, que acabam por morrer e entram em decomposição. Com a perda da vegetação aquática submersa desaparece o alimento, o habitat e o oxigénio libertado pela fotossíntese. Resultando na morte da vida aquática devido à drástica redução de oxigénio [2].

A presença de fósforo em águas provém de várias fontes: erosão das rochas ricas neste elemento, decomposição da matéria orgânica, lançamento de esgotos, detergentes, rações, medicamentos, indústria entre outras fontes [3].

As águas residuais apresentam uma mistura não caracterizada e indefinida de compostos, como compostos orgânicos que podem ser moléculas pequenas de cadeias simples ou moléculas mais complexas [4]. Em termos de fósforo, estas águas podem conter uma concentração entre 10 mg P/L e 30 mg P/L. Contudo, segundo o Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto, a concentração de fósforo total nas descargas de águas residuais é de 3 mg P/L em águas que alimentam lagoas ou albufeiras, 0,5 mg P/L em águas das próprias lagoas ou albufeiras e 10 mg P/L nas restantes águas, tornando-se evidente a necessidade da sua quantificação nas águas residuais [2].

O fósforo resultante das descargas por instalações de tratamento de águas residuais está na forma dissolvida. Esta substância é limitante na produção piscícola pois, senão estiver presente no meio aquático compromete toda a cadeia trófica existente [3]. Também é um dos elementos essenciais para o crescimento de algas e fitoplâncton que servem de alimento para os vários peixes [5].

Os cientistas estão preocupados relativamente à poluição da água de consumo humano devido ao aumento das atividades urbanas, agrícolas e industriais, colocando em risco a qualidade da água [6].

A água de consumo humano é legislada através do Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, onde se encontram os vários valores paramétricos que garantem a qualidade e a segurança do consumo da água potável, protegendo a saúde do consumidor [7].

1.1 Objetivos

O presente trabalho foi realizado para a obtenção do grau de Mestre em Química Industrial. Toda a parte experimental foi realizada no laboratório de físico-química da empresa Aquimisa- Consultores Agro-industriais, Lda. Este trabalho teve como principais objetivos:

- Elaboração de um procedimento experimental para a determinação do fósforo total em águas residuais, utilizando a espectrofotometria de absorção molecular UV-VIS;
- Implementação e validação do ensaio;
- Definição de um programa para garantir o controlo de qualidade interno do ensaio;
- Estudo em paralelo de vários parâmetros acreditados no laboratório, aplicados a uma água de consumo humano e uma água residual.

1.2 Estrutura da dissertação

Esta dissertação é constituída por capítulos. Nas figuras 1.1 a 1.3 encontra-se esquematizada a sua estrutura.

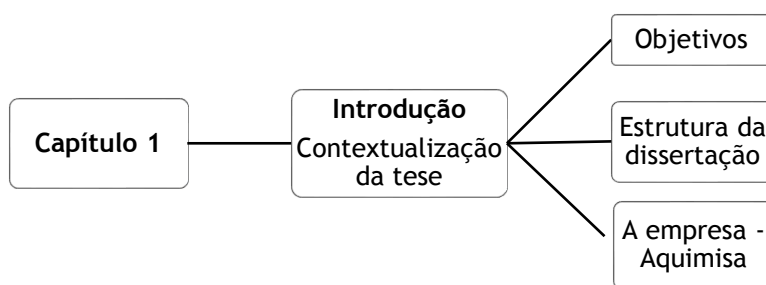


Figura 1.1- Esquema da dissertação.

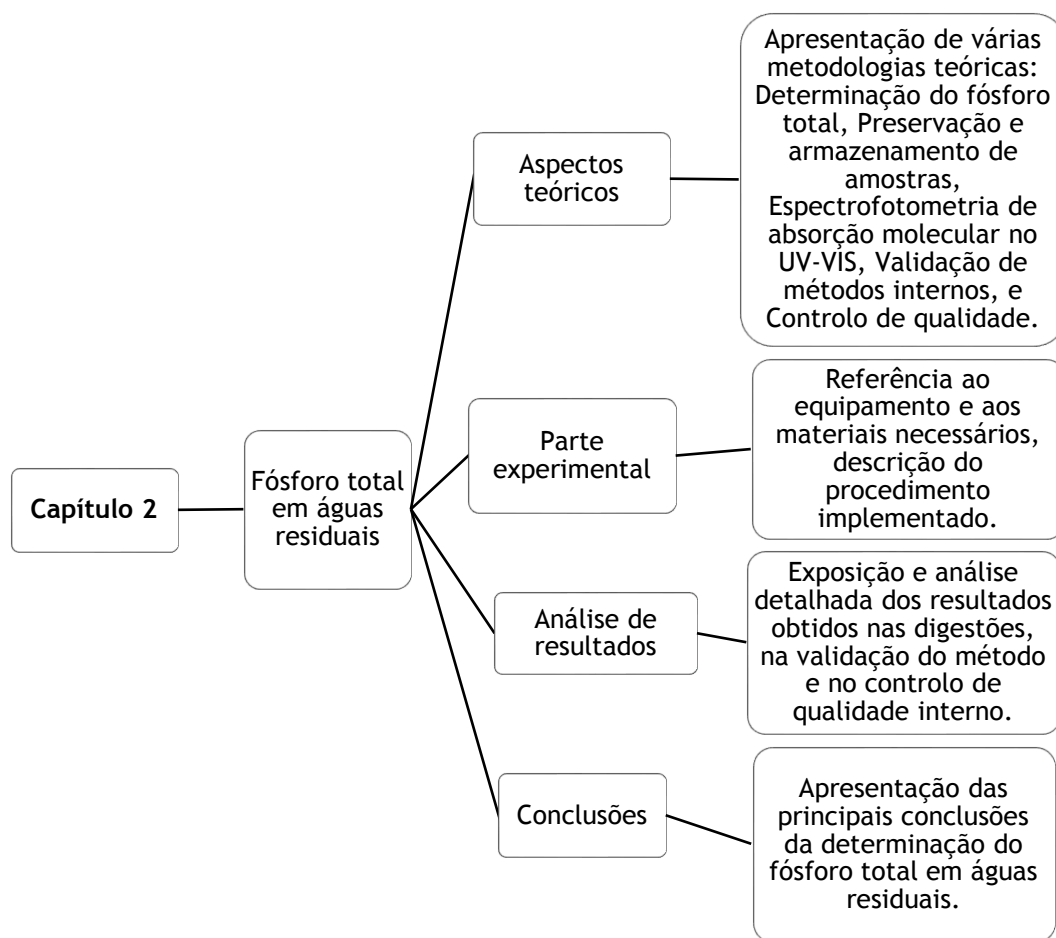


Figura 1.3- Esquema da dissertação (continuação).

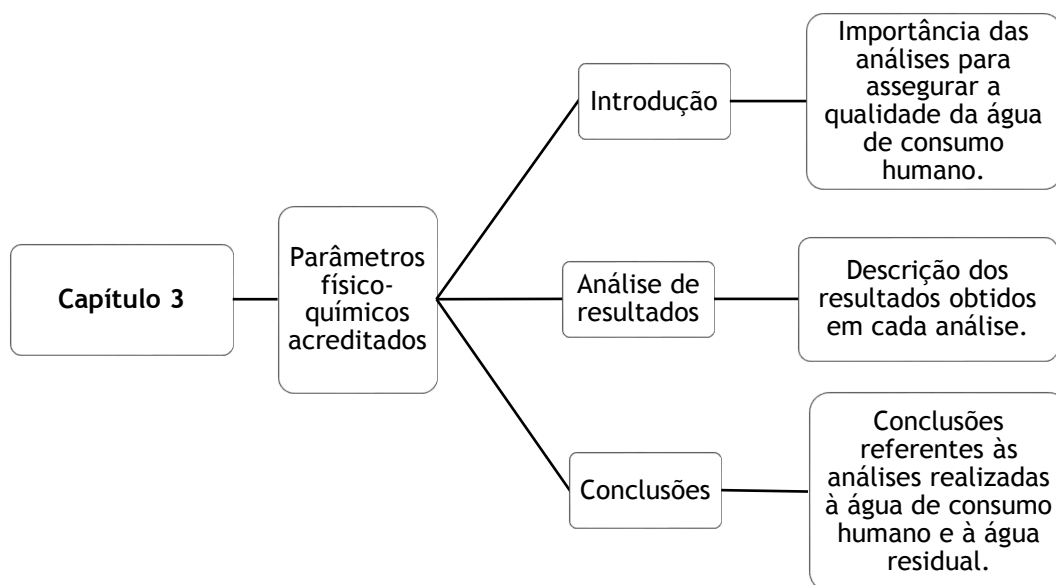


Figura 1.2- Esquema da dissertação (continuação).

1.3 Empresa - Aquimisa, Lda.



A empresa Aquimisa - Consultores Agro - Industriais, Lda foi constituída em 2000. Esta empresa situa-se em Castelo Branco, na seguinte morada: Zona Industrial, Rua S, Lote 41.

Esta empresa de consultoria e de análises na área agro-industrial tem como objetivo a prestação de serviços de assistência e segurança alimentar a todas as indústrias do sector alimentar, que pretendam ajuda e colaboração exterior, por falta de meios e serviços próprios para o fazerem.

Outra característica da Aquimisa, Lda consiste em satisfazer as necessidades dos clientes e realizar as suas atividades de ensaios de modo a cumprir os requisitos da Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005.

A Aquimisa possui um laboratório de análises com 4 departamentos, que se complementam: sala de recolhas; laboratório de microbiologia; laboratório de físico-química; e laboratório de DPH (produtos de drogaria, perfumaria e higiene).

Para garantir a qualidade dos resultados de análise realiza-se por cada ensaio um plano de controlo de qualidade interno. O controlo de qualidade externo é assegurado pela participação nos programas de ensaios interlaboratoriais adequados à determinação em causa.

Posteriormente, os resultados dos planos de controlo de qualidade são interpretados pela direção técnica e expostos nas reuniões do comité da qualidade.

Para avaliar a operacionalidade e a eficácia do Sistema de Gestão (SG) implementado, esta empresa realiza auditorias internas da qualidade. As auditorias internas têm como objetivo abranger todos os elementos do SG, incluindo as atividades de ensaio.

2 Fósforo total em águas residuais

2.1 Aspetos teóricos

O fósforo (P) é um elemento químico situado no grupo 15 e período 3 da tabela periódica. É o décimo segundo elemento mais abundante na natureza encontrando-se na forma de rochas fosfatadas.

Os rios transportam para os oceanos cerca de 21×10^{12} g P/ano e só 10% está disponível para o uso dos ecossistemas marinhos, os restantes 90% estão ligados a partículas do solo que sedimentam rapidamente.

Este elemento é um macronutriente essencial para as plantas e para os animais, sendo um componente essencial do ácido desoxirribonucleico (DNA), do ácido ribonucleico (RNA), da adenosina trifosfato (ATP) e dos fosfolípidos [2]. A assimilação pelas plantas realiza-se quando o fósforo está na forma inorgânica, ou seja, na forma de ortofosfatos (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- e H_3PO_4) [3].

As principais fontes de fósforo nas águas devem-se a:

- Erosão das rochas ricas neste elemento e erosão de solos;
- Decomposição de material orgânico;
- Lançamento de esgotos, detergentes, rações e medicamentos [2],
- Resíduos humanos;
- Degradação metabólica das proteínas;
- Eliminação dos fosfatos libertados na urina [3].

Outra atividade que gera elevadas concentrações de fósforo é a agricultura nomeadamente a adição de fertilizantes para o crescimento de plantas. A sua adição é feita em excesso levando à acumulação deste elemento no solo contaminando as águas superficiais.

Na Europa, as emissões de fósforo em águas doces ultrapassam 0,1 Kg/há/ano afetando a biodiversidade vegetal em ecossistemas naturais e perturbando o equilíbrio biológico. Existem estratégias corretivas porém, estas são muito caras e a recuperação é bastante lenta [8].

O fósforo pode ser encontrado na água nas seguintes formas:

- Ortofosfatos, composto que se encontra em maior quantidade podendo estar presente na descarga do efluente ou resultar da hidrólise de outros compostos;
- Fosfato orgânico, resulta dos dejetos, restos de alimentos e outros, é um composto que pode estar dissolvido ou em suspensão, não apresentando um papel revelante nas águas residuais, uma vez que tem uma duração relativamente curta devido à sua hidrólise que dá origem aos ortofosfatos;
- Polifosfato orgânico ou inorgânico, composto que pode estar dissolvido ou em suspensão, permanecendo na forma de polifosfato. Através de um processo lento de hidrólise transformam-se em ortofosfatos.

Todas estas formas de fosfatos são englobadas na quantificação do fósforo total nas águas residuais [9].

O fósforo nas águas residuais apresenta uma concentração entre 10 mg P/L a 30 mg P/L nas formas de ortofosfatos, polifosfatos (P_2O_7) e fósforo orgânico [2]. O tratamento de águas residuais é realizado para evitar:

- Riscos para a saúde pública;
- Poluição dos recursos hídricos para os quais são descarregados efluentes, nomeadamente na rede hidrográfica, nos lagos e no mar;
- Poluição do ambiente em geral, sob a forma de odores desagradáveis ou paisagem alterada e contaminação das águas subterrâneas [9].

O tratamento destas águas engloba várias operações unitárias durante o tratamento primário, secundário e terciário do efluente. No tratamento primário utilizam-se processos físicos como a sedimentação para a remoção de sólidos e resíduos. No caso do tratamento secundário usam-se processos químicos e biológicos com o objetivo de remover a matéria orgânica. Por último o tratamento terciário emprega operações unitárias para a remoção do azoto e do fósforo [10].

Na Tabela 2.1 encontra-se o valor limite de emissão do fósforo total nas descargas de águas residuais segundo o Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto. O seu valor limite de emissão depende do destino que a água residual apresentar.

Tabela 2.1- Valor de limite de emissão do fósforo total na descarga de águas residuais [11].

Parâmetro	Valor limite de emissão	Unidades
	10	
Fósforo total	3 (em águas que alimentam lagoas ou albufeiras) 0,5 (em lagoas ou albufeiras)	mg/L P

2.1.1 Seleção do método

Para a determinação do fósforo total é necessário realizar inicialmente uma digestão e posteriormente encontrar um método colorimétrico que se ajuste à gama de concentrações desejada.

O fósforo total pode estar combinado com a matéria orgânica, devendo o método de digestão ser capaz de degradar a matéria orgânica libertando o fósforo em forma de ortofosfatos. A digestão ácida pode ser realizada por três métodos diferentes: ácido perclorídrico, ácido sulfúrico e nítrico e oxidação com persulfato.

A digestão com ácido perclorídrico é o método mais drástico e mais demorado sendo ideal para amostras de sedimentos. A utilização da digestão ácida do ácido sulfúrico e nítrico é recomendada para a maioria das amostras. Por último o método de oxidação com persulfato apresenta-se como o mais simples, tendo sido o escolhido para este trabalho.

Após a digestão, é utilizado um método colorimétrico para a determinação do fósforo. Existem também três métodos dependendo da concentração de fósforo na amostra. O método do ácido vanadomolibdofosfórico utiliza-se para análises de rotina com uma gama de 1 a 20 mg P/ L.

No caso do método do cloreto de estanho (II) e do método do ácido ascórbico a gama ideal situa-se entre os 0,01 a 6 mg P/ L.

Neste trabalho selecionou-se o método colorimétrico do ácido vanadomolibdofosfórico, uma vez que é o método que se ajusta melhor à nossa gama de concentrações de fósforo total em amostras.

Numa amostra com ortofosfatos, em meio ácido, o molibdato de amónio reage com o ião fosfato dando origem ao ácido molibdofosfórico. Posteriormente, com a presença do vanádio origina-se o ácido vanadomolibdofosfórico que apresenta uma coloração amarela. A intensidade da cloração depende da concentração de ortofosfatos presentes.

Este método apresenta algumas interferências que aumentam o sinal que é o caso da sílica e do arseniato. Outros interferentes são: fluoreto, tório, bismuto, sulfureto, tiosulfato, tiocianato ou o excesso de molibdato [5].

É necessário lavar todo o material de vidro com ácido clorídrico (HCl) diluído e posteriormente passa-se por água ultrapura de grau 3. Deve-se evitar o uso de detergentes comerciais uma vez que apresentam fósforo na sua composição.

2.1.2 Preservação e armazenamento de amostras de água (ISO 5667-3:2012)

A preservação da amostra consiste num procedimento aplicado à amostra de maneira que as propriedades que serão analisadas sejam mantidas estáveis desde a recolha até à análise. É necessário ter em conta que analitos diferentes provenientes da mesma fonte podem requerer diferentes processos para a sua estabilização.

Por sua vez, o armazenamento da amostra refere-se ao processo de manter a amostra disponível sob condições pré-definidas durante um intervalo de tempo especificado que corresponde ao tempo entre a recolha e a análise da amostra.

O processo de conservação e armazenamento da amostra envolve vários passos, para tal todas as etapas devem ser documentadas para garantir a qualidade da amostra. Estas etapas devem ser verificadas para garantir que não ocorrem interferências positivas ou negativas.

2.1.2.1 Recipientes

Os recipientes das amostras tem de ser feitos de um material apropriado para conservarem as propriedades naturais da amostra e dos contaminantes esperados.

Os recipientes utilizados podem ser de vidro, polietileno (PE) ou politetrafluoretileno (PTFE).

No caso de amostras que serão congeladas deve-se utilizar recipientes adequados, como por exemplo recipientes de polietileno (PE) ou de politetrafluoretileno (PTFE) que devem impedir a rutura.

É preferível a utilização de recipientes descartáveis. Alguns recipientes vêm com um certificado de limpeza do fornecedor, não sendo necessário limpar ou lavar os recipientes antes do uso.

2.1.2.2 Procedimento para análise físico-química

Nos vários tipos de águas podem ocorrer mudanças na sua constituição devido a reações físicas, químicas e biológicas que decorrem durante a recolha da amostra até ao início da análise. A velocidade destas reações leva a que haja diferenças entre a concentração de um analito determinado no laboratório e a concentração que existia no momento da amostragem, para tal têm de ser tomadas algumas medidas de precaução durante a amostragem, transporte e armazenamento.

Os fatores que levam à alteração da amostra dependem da natureza química e biológica desta contendo, depende também da temperatura, da exposição à luz, do tipo de recipiente utilizado, do tempo entre a amostragem e a análise, das condições a que é submetida e da agitação durante o transporte.

Outras causas específicas são listadas a seguir:

- A presença de bactérias, algas e outros organismos podem consumir certos constituintes da amostra, dando origem a novos constituintes.
- Certos compostos podem ser oxidados através do oxigénio dissolvido ou pelo oxigénio atmosférico presente na amostra (compostos orgânicos, Fe II e sulfuretos).
- Algumas substâncias podem precipitar como por exemplo o carbonato de cálcio, metais e compostos metálicos, ou alguns compostos podem passar para a fase de vapor (oxigénio, cianetos e mercúrio).
- O pH da amostra pode sofrer alterações devido à absorção do dióxido de carbono presente no ar. Este mesmo composto pode alterar a condutividade e a concentração de dióxido de carbono dissolvido.
- Compostos de amónia e fluoreto de silício presentes nos recipientes de plástico podem passar para a amostras podendo afetar o pH e a condutividade.
- Metais dissolvidos ou metais no estado coloidal e compostos orgânicos podem ser adsorvidos pelas superfícies dos recipientes ou por materiais sólidos das amostras.
- Produtos poliméricos podem despolimerizar e posteriormente outros compostos mais simples podem polimerizar.
- Condições sazonais.

Estas alterações são suficientemente rápidas para modificarem consideravelmente a amostra num curto espaço de tempo.

No Anexo 2, Tabela 4, encontram-se as condições de armazenamento e preservação de amostras para os vários analitos estudados neste trabalho, com o respetivo tempo máximo de armazenamento e com a indicação se se trata de um método de preservação validado ou se é a melhor técnica.

2.1.2.3 Transporte e receção

No transporte das amostras deve-se ter em conta:

- O tempo de recolha e o início do transporte;
- Tempo de transporte;
- O tempo de chegada ao laboratório e o início da análise no laboratório.

A temperatura adequada para a refrigeração da maioria das amostras durante o transporte é de 5 ± 3 °C. Esta temperatura pode ser monitorizada durante todo o transporte através de uma sonda de temperatura colocada na mala térmica onde são colocadas as amostras após colheita. No congelamento da amostra deve existir um controlo detalhado do processo de forma a garantir que após o descongelamento a amostra se encontra no estado em que foi recolhida e com as propriedades iniciais.

Durante o transporte os recipientes das amostras devem ser protegidos e selados de forma que não ocorra a deterioração ou perda de alguma parte do seu conteúdo. O condicionamento dos recipientes deve proteger de possíveis contaminações externas e não deve ser uma fonte de contaminação.

Relativamente aos recipientes de vidro estes devem ser colocados em embalagens adequadas (malas térmicas) de forma a ficarem protegidos de possíveis quedas.

Quando o laboratório que realiza a colheita não é o mesmo que efetua a determinação do fósforo, é necessário o envio ou o transporte para um laboratório subcontratado. Neste caso, torna-se também necessário assegurar as condições da amostra durante o transporte.

Quando as amostras chegam ao seu destino, o laboratório deve receber a informação referente à preservação da amostra e das condições de transporte. O número de amostras recebidas no laboratório deve ser verificado com o número de recipientes de amostras submetidas.

2.1.3 Espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS

A espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS é uma das técnicas analíticas mais utilizadas na determinação quantitativa de espécies moleculares inorgânicas, orgânicas e biológicas [12]. Embora seja bastante utilizada, há mais de 50 anos, esta técnica continua a ser notável no monitoramento de processos de polimerização, biológicos, petroquímicos e farmacêuticos [13].

Este método analítico consiste na absorção de radiação na zona do ultravioleta (200-400 nm) e do visível (400-800 nm) por moléculas, átomos ou iões e consequentemente ocorrem transições eletrónicas [14]. Estas ocorrem quando um feixe de luz monocromática passa pela cuvette ou célula contendo uma solução a analisar e por consequência um eletrão é promovido de um estado de energia menor para outro nível de energia superior [15].

A intensidade de um feixe de radiação eletromagnético é reduzida quando este atravessa o meio onde se encontra a substância absorvente, devido a sucessivos processos de absorção, reflexão nas paredes da cuvette e de fenómenos de dispersão (Fig. 2.1).

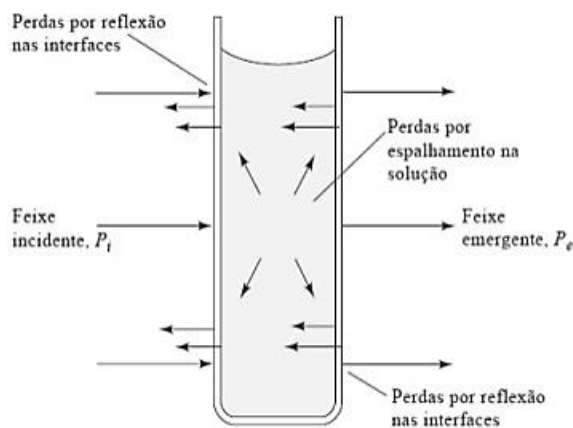


Figura 2.1- Dispersão da radiação eletromagnética monocromática ao incidir numa célula que contém uma solução absorvente [14].

Considerando somente o processo de absorção, a intensidade do feixe transmitido, I , relaciona-se com a do feixe incidente, I_0 (paralelo e monocromático de comprimento de onda, (λ)), pela lei de Beer, Eq. 2.1.

$$I = I_0 10^{-\epsilon(\lambda)cb} \quad (2.1)$$

em que, C é a concentração da espécie absorvente (mol/L), ϵ é o coeficiente de absorção molar ao comprimento de onda [$L/(mol\ cm)$] e b o percurso ótico da radiação (cm).

Experimentalmente, mede-se a razão de intensidade, denominada por transmitância através da Eq. 2.2. Quando um meio é totalmente absorvente a transmitância é nula ($I=0$), no caso de meios completamente transparentes este parâmetro é unitário ($I=I_0$).

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon(\lambda)cb} \quad (2.2)$$

A transmitância é um parâmetro intuitivo contudo, é substituído pela absorvância, Eq. 2.3, que tem como vantagem variar linearmente com a concentração, percurso ótico e com o coeficiente de absorção molar.

$$A = -\log_{10} T = \epsilon(\lambda)cb \quad (2.3)$$

Resumindo a quantidade de luz monocromática absorvida depende da concentração, do coeficiente de absorção molar da espécie absorvente e do percurso ótico [14].

2.1.4 Validação de métodos internos

Um método experimental é um processo que está sujeito à acumulação de erros sistemáticos ou aleatórios, sendo fundamental a existência de meios e critérios que demonstrem através da validação a credibilidade e a qualidade dos resultados fornecidos pelos laboratórios.

A validação tem assim como objetivo garantir a qualidade dos resultados analíticos, conferindo-lhe rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a toma de decisões [16].

Para a validação de métodos internos é utilizada a avaliação direta e indireta. No caso da avaliação direta, esta engloba a análise somente da exatidão [17].

2.1.4.1 Avaliação indireta

A avaliação indireta engloba a especificidade/seletividade, a quantificação, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e robustez.

➤ Especificidade/ seletividade

A especificidade/seletividade averigua se o método tem a capacidade de identificar somente o analito em estudo numa mistura complexa. Para tal é necessário avaliar as interferências realizando-se um teste de recuperação numa série de amostras com a característica de conterem a mesma matriz variando somente a concentração de analito que é conhecida [17]. É necessário que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade. Um método é considerado específico e seletivo se a taxa de recuperação for próxima de 100% [18].

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{concentração (amostra+padrão)} - \text{concentração(amostra)}}{\text{concentração padrão}} \times 100 \quad (2.4)$$

➤ Quantificação

O parâmetro de quantificação abrange a utilização da curva de calibração, a determinação dos limites de deteção e quantificação, linearidade e a sensibilidade [17].

I. Curva de calibração

A curva de calibração relaciona o sinal obtido por um sistema com a concentração ou quantidade de substância conhecida. Na prática o analista prepara uma série de padrões em que a concentração do analito é conhecida, de seguida estas soluções são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições da amostra a analisar. Os padrões utilizados

deverão distribuir-se pela gama de trabalho. Posteriormente, obtém-se um gráfico de calibração onde através de interpolação é possível determinar a concentração da amostra.

A forma algébrica da equação de uma curva de calibração é dada pela Eq. 2.5:

$$Y = a + bx \quad (2.5)$$

onde a representa a ordenada na origem e b o declive da curva.

As curvas de calibração devem ser abrangidas por critérios internos relativos à linearidade e à estabilidade das mesmas, para tal recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1:1990 [17].

II. Gama de trabalho

Quando se utiliza o traçado de uma curva de calibração a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade de variâncias, sendo a norma ISO 8466-1:1990 recomendada para modelos lineares e a norma ISO 8466-2:1993 para modelos polinomiais de segundo grau. No caso de métodos que não utilizam a curva de calibração, a gama de trabalho pode ser determinada através dos volumes gastos no caso de volumetrias, pela visualização dos pontos de viragem ou pela quantidade de amostra disponível.

O teste de homogeneidade de variâncias engloba os seguintes passos:

- Determinação das variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S_1^2 e S_{10}^2).
- Cálculo do PG conforme as Eqs. 2.6 ou 2.7 dependendo do valor de variância dos padrões.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}; \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2 \quad (2.6)$$

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2 \quad (2.7)$$

- Comparação do valor do PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para n-1 graus de liberdade.

Se $PG \leq F$: as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada.

Se $PG > F$: as diferenças de variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser ajustada para um $PG \leq F$ [17].

III. Linearidade

Para o estudo da linearidade recorre-se ao coeficiente de correlação da curva de calibração e ao teste de linearidade.

- a) Representação gráfica da curva de calibração e a determinação do seu coeficiente de correlação.

Esta análise deve ser feita com cuidado, uma vez que, os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação mas não necessariamente de linearidade.

Os coeficientes de correlação da curva de calibração podem tomar valores entre $-1 \leq R \leq +1$, sendo o valor positivo uma correlação positiva e o valor negativo uma correlação negativa.

Em análises químicas as curvas de calibração devem apresentar um coeficiente de correlação superior a 0,995. Este valor é utilizado como referência em laboratórios que utilizam como metodologia a curva de calibração [17].

- b) Teste de linearidade

Teste de linearidade consiste na comparação estatística do valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Fisher.

Para avaliar a linearidade utiliza-se a norma ISO 8466-1:1990 e para modelos não lineares utiliza-se a norma ISO 8466-2:1993. Estas normas baseiam-se em modelos estatísticos e na determinação dos desvios-padrão residuais da regressão linear ($S_{Y/X}$) e da regressão não linear (S_{y2}) [17].

O $S_{Y/X}$ é obtido através do método dos mínimos quadrados. Esta técnica consiste na otimização matemática que procura o melhor ajuste para um conjunto de dados minimizando os resíduos existentes.

Um gráfico de resíduos corresponde à diferença entre o valor de y observado e o valor de y previsto. Este gráfico permite detetar problemas no ajuste da curva de calibração, como por exemplo, desvios da linearidade, presença de amostras atípicas, dependência entre erros e variâncias oscilantes. Um ajuste ideal para uma regressão linear tem como pressupostos apresentar erros com distribuição uniforme, média zero, variância constante e ausência de amostras atípicas [19].

O teste de linearidade consiste em:

1. Determinação do $S_{Y/X}$ pela Eq. 2.8:

$$S_{Y/X} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + b \times x_i)]^2}{N-2}} \quad (2.8)$$

2. Determinação do valor de S_{y2} pela Eq. 2.9:

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}} \text{ onde } \hat{y}_i = a + b.x + c.x_i^2 \quad (2.9)$$

em que:

X_i - concentração da amostra padrão;

Y_i - variável de resposta para uma concentração x_i ;

\hat{y}_i - variável de resposta para uma concentração x_i calculado a partir da função de calibração;

N - é o número de padrões de calibração [18].

3. Cálculo da diferença de variâncias (DS^2) pela seguinte Eq. 2.10:

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (2.10)$$

4. Determinação do valor do PG pela Eq. 2.11:

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad (2.11)$$

5. Comparação do valor do PG com o valor de F da distribuição de Fisher:

Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear.

Se $PG > F$: a função de calibração é não linear [17].

➤ Limiares analíticos

O limite de deteção (L.D.) refere-se à menor concentração de analito que é possível detetar, mas não necessariamente quantificar, pois a sua quantificação está sujeita a erros significativos. Em termos qualitativos, o L.D. corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco, pois esta solução contém a mesma matriz, não contendo o analito.

O limite de quantificação (L.Q.) é definido como a menor concentração de analito que é possível quantificar com exatidão e precisão aceitável [20].

O padrão de menor concentração sem ser o branco corresponde ao L.Q.

a) Determinação experimental a partir de brancos, Eqs. 2.12 e 2.13:

$$L.D. = X_0 + 3,3 \times \sigma_0 \quad (2.12)$$

$$L.Q. = X_0 + 10 \times \sigma_0 \quad (2.13)$$

onde X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos e σ_0 é o desvio-padrão associado a X_0 [17].

b) Determinação experimental a partir de padrões vestigiais, Eqs. 2.14 e 2.15:

$$L.D. = 3,3 \sigma_0 \quad (2.14)$$

$$L.Q. = 10\sigma_0 \quad (2.15)$$

onde σ_0 é o desvio-padrão da série de padrões vestigiais.

c) Determinação a partir da utilização da curva de calibração linear, Eqs. 2.16 e 2.17:

$$L.D. = \frac{3,3 S_{y/x}}{b} \quad (2.16)$$

$$L.Q. = \frac{10 S_{y/x}}{b} \quad (2.17)$$

onde $S_{y/x}$ é o desvio-padrão residual da curva de calibração e b é o declive da mesma [21].

➤ Sensibilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta consoante a variação da concentração do analito. Em geral, a sensibilidade é a capacidade do método em distinguir duas concentrações próximas com um determinado nível de confiança [20]. Pode ser determinada através do declive da curva de regressão linear de calibração. Deste modo este parâmetro pode ser expresso pela Eq. 2.18 [22].

$$S = \frac{dy}{dx} \quad (2.18)$$

Um método é sensível quando uma pequena variação na concentração do analito resulta numa grande variação no valor do sinal do analito medido.

O interesse existente na determinação deste parâmetro prende-se com o averiguar da evolução desta grandeza ao longo do tempo, com a possível comparação da sensibilidade de vários métodos analíticos utilizando o mesmo modelo linear para o mesmo analito e a possibilidade de comparação da sensibilidade por métodos diferentes [23].

➤ Precisão

A precisão é um termo geral que avalia a dispersão dos resultados, ou seja, quando se analisa a mesma amostra várias vezes estes resultados são precisos se forem bastantes próximos entre si [17]. Esta característica pode ser determinada pelo desvio-padrão (S), variância (S^2) e coeficiente de variação (CV) [22].

Caso geral definido pela Eq. 2.19:

$$CV = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \quad (2.19)$$

O termo de precisão é expresso pela repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

A repetibilidade e a reprodutividade dependem da concentração do analito, para tal devem ser determinadas para um diferente número de concentrações [22].

I. Repetibilidade

A repetibilidade refere-se ao grau de concordância dos resultados obtidos nas várias análises sucessivas, à mesma amostra sob as mesmas condições de medição [17]. As medições são realizadas no mesmo laboratório, com o mesmo operador, o mesmo equipamento, os mesmos reagentes e durante um curto intervalo de tempo [22].

O limite de repetibilidade (r) corresponde ao valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95 % a diferença entre dois resultados de ensaios (X_i , X_{i-1}), obtidos nas condições anteriormente mencionadas. Na prática, aceita-se o resultado de duas determinações se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ [17].

II. Precisão intermédia

Entende-se como precisão intermédia a precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas estabelecendo quais as condições a variar, como por exemplo, diferentes épocas, diferentes analistas, equipamentos diferentes, com ou sem verificação da calibração [18].

Este parâmetro é o mais representativo da variabilidade dos resultados num laboratório por isso, é conveniente a sua determinação. O objetivo da validação da precisão intermédia é averiguar que não existirá variação dos resultados obtidos no mesmo laboratório por aquele método [24].

Para determinar este parâmetro, realizam-se n medições em replicado, duplicado ou ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas. Dependendo do ensaio e do tipo de

aplicação, o controlo e determinação da precisão intermédia pode ser obtida através de cartas de controlo de amplitude que podem ser aplicadas a réplicas, duplicados de amostras e para padrões estáveis ao longo do tempo [18].

III. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão obtida quando se variam as condições de tratamento da amostra (diferentes laboratórios, operadores, equipamento e intervalos de tempo) [17].

Este parâmetro permite expressar a precisão do método independentemente do lugar onde é realizado e é obtido através de ensaios interlaboratoriais [23].

O limite de reprodutibilidade consiste no valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições mencionadas [18].

➤ Robustez

A robustez mede a sensibilidade que o método apresenta quando ocorrem pequenas variações na sua execução.

Para determinar a robustez pode-se recorrer ao teste de Youden. Este teste é simples e além de permitir avaliar a robustez também indica qual o tipo de influência de cada uma dessas variações [17].

Quanto maior a robustez do método maior será a sua confiança relativamente à sua precisão [22].

Como alternativa pode-se testar o método em condições de precisão intermédia, que consiste em fazer variar as condições operacionais dentro do laboratório de acordo com a precisão intermédia, ao longo de um elevado número de dias, obtendo-se um número significativo de resultados. Por último, deverá ser elaborada uma análise detalhada e cuidada dos resultados em termos de precisão do método. Este processo fornece informação valiosa acerca do comportamento da metodologia em condições de trabalho diferentes [17].

2.1.4.2 Estimativa da incerteza

A incerteza é um parâmetro que está associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores relativos à grandeza medida. Quando a incerteza é corretamente estimada, este parâmetro pode ser considerado como uma medida da qualidade do resultado, ou seja, quanto menor a incerteza, maior a qualidade [25].

➤ Fontes de incerteza

A incerteza do resultado pode ter várias origens tais como:

- Amostragem;
- Condições de armazenamento;
- Efeitos instrumentais;
- Pureza de reagentes;
- Erros aleatórios;
- Efeitos de matriz e interferências;
- Condições experimentais;
- Incerteza do equipamento de avaliação de massas e de volumes;
- Valores de referência [26].

➤ Abordagem para a quantificação da incerteza da medição

As formas mais usuais da determinação da incerteza da medição, são:

- I. Abordagem “passo a passo”, “componente a componente”;
- II. Abordagem baseada em ensaios interlaboratoriais;
- III. Abordagem baseada em dados de validação e do controlo interno da qualidade [27].

➤ Incertezas aplicadas neste trabalho

Existem diversas determinações da incerteza consoante a fonte que lhe dá origem. Perante esta situação serão somente apresentadas as incertezas determinadas neste trabalho.

1. Incerteza associada à interpolação linear, (u_{reta})

Quando a curva de calibração é descrita segundo o modelo de regressão “método dos mínimos quadrados” do polinómio do primeiro grau, a incerteza é dada pela Eq. 2.20:

$$u_{\text{reta}} = \frac{S_y}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.20)$$

em que:

S_y - desvio-padrão residual da curva de calibração;

b - declive da curva de calibração;

N- número de leituras de padrões utilizados no traçado da curva de calibração;

n- número de leituras utilizadas para determinar o teor da amostra;

\bar{y}_a - valor médio das n leituras da amostra;

\bar{y} - valor médio das N leituras dos padrões de calibração;

X_i - concentração de cada um (i) dos N padrões de calibração;

\bar{X} - valor médio das concentrações de cada um (i) dos N padrões de calibração [27].

2. Incerteza associada à precisão, ($u_{\text{precisão}}$)

Nos ensaios químicos a precisão é um componente maioritário da incerteza global, por isso é necessário ser avaliada em todo o âmbito de aplicação do método.

A incerteza associada à precisão pode ser determinada através da precisão intermédia estimada a partir de duplicados de várias amostra ou padrões. Esta metodologia consiste na análise de várias amostra ou padrões fazendo variar vários parâmetros, quando as análises são realizadas em dias deferentes assume-se que varia aleatoriamente grande parte dos parâmetros. Para esta determinação é recomendado que se efetuem pelo menos 15 medições. A incerteza padrão associada à precisão do método ($u_{\text{precisão}}$) é determinada através do desvio-padrão dos resultados em duplicado ($S_{\text{precisão}}$), Eq. 2.21:

$$S_{\text{precisão}} = \frac{\bar{A}}{1,128} \quad (2.21)$$

em que, \bar{A} representa as amplitudes médias absolutas e relativas de um conjunto de duplicados. \bar{A} pode ser obtida através da carta de controlo de amplitudes relativas dos duplicados.

Quando o método apresenta uma gama restrita de concentrações verifica-se a seguinte igualdade (Eq. 2.22) [27]:

$$(S_{\text{precisão}}) = (u_{\text{precisão}}) \quad (2.22)$$

3. Incerteza associada à exatidão, (U_e)

O erro corresponde à diferença entre o resultado da medição e o valor verdadeiro. Este erro resulta de erros sistemáticos e aleatórios que ocorrem durante a medição. O erro sistemático de uma medição pode ser obtido através da incerteza desprezável, pela diferença entre a média de resultados de múltiplos ensaios replicados e o valor verdadeiro. Alguns itens que

podem ser usados para determinar os erros sistemáticos dos ensaios são: materiais de referência certificados, amostras fortificadas ou amostras analisadas por um método de referência.

Em química analítica, através de amostras, com analito nativo e fortificadas no laboratório é possível quantificar a exatidão do método. Quanto mais perto de 1 for a recuperação, melhor é a exatidão do método [22]. Esta foi a abordagem realizada neste trabalho para a obtenção da incerteza associada à exatidão. A Eq. 2.23 permite estimar a recuperação média do método por esta metodologia.

$$\overline{R}_m = \frac{\overline{C}_{obs} - \overline{C}_{nativa}}{C_{fortificada}} \quad (2.23)$$

onde:

\overline{C}_{nativa} - concentração média de analito na amostra não fortificada;

\overline{C}_{obs} - concentração média da amostra fortificada;

$C_{fortificação}$ - concentração do padrão de fortificação.

Neste caso, a incerteza padrão ($u(\overline{R}_m)$) associada a \overline{R}_m , é estimada pela Eq. 2.24:

$$u(\overline{R}_m) = \overline{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{obs}^2/n + S_{nativa}^2}{(\overline{C}_{obs} - \overline{C}_{nativa})^2} \right) + \left(\frac{u(C_{fortificada})}{C_{fortificada}} \right)^2} \quad (2.24)$$

onde:

S_{nativa} - desvio-padrão de uma série de análises de amostras não fortificadas;

S_{obs} - desvio-padrão de uma série de amostras fortificadas;

$u(C_{fortificada})$ - incerteza padrão associada à fortificação das amostras [27].

A determinação do U_e é dada pela seguinte igualdade (Eq. 2.25):

$$U_e = (u(\overline{R}_m)) \quad (2.25)$$

4. Expressão de resultados

A expressão do resultado com incerteza, nos relatórios de ensaio, deve ser realizada de acordo com o definido no “Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement”, (GUM):

Resultado = $y \pm U$ [unidades]

U é uma incerteza expandida determinada com um nível de confiança aproximadamente igual a 95% e y corresponde a uma concentração [27].

Para realizar a expressão da incerteza de uma amostra inicialmente tem de se determinar a incerteza combinada e posteriormente a incerteza expandida, estas duas incertezas são relativas à amostra em estudo.

a) Cálculo da incerteza combinada, (U_c)

Esta incerteza baseia-se na Lei da Propagação das Incertezas. Quando o método é aplicado a uma gama restrita de concentrações, as componentes da incerteza podem ser contabilizadas como componentes independentes de uma expressão aditiva. Sendo a U_c dada pela Eq. 2.26.

$$U_c = \sqrt{(u_p \times y)^2 + (u_e \times y)^2 + u_{\text{reta}}^2} \quad (2.26)$$

em que:

u_p - incerteza associada à precisão;

u_e - incerteza associada à exatidão;

u_{reta} - incerteza associada à curva de calibração;

y- concentração da amostra [27].

b) Incerteza expandida, (U_y)

Sempre que as incertezas relativas à precisão e exatidão são estimadas recorrendo a um número reduzido de ensaios experimentais (menor do que 6), a incerteza expandida para um nível de confiança aproximadamente igual a 95%, é obtida através de um fator de expansão retirado da tabela t-student bilateral através do número de graus de liberdade igual ao menor número de ensaios efetuados na quantificação da precisão ou da exatidão, menos 1 [27].

2.1.4.3 Avaliação direta

Esta avaliação assenta essencialmente na determinação e análise da exatidão do método de ensaio. A exatidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro [25].

Este parâmetro quando aplicado a uma série de resultados implica a combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos.

Os processos utilizados para analisar a exatidão são nomeadamente, os materiais de referência certificados, ensaios interlaboratoriais e testes de comparação [17].

➤ Materiais de referência certificados, (MRCs)

Os MRCs são acompanhados de um certificado que possui o valor de concentração ou outra grandeza, com a incerteza associada.

A aquisição destes materiais é feita a um organismo fornecedor reconhecido e credível. O alto custo dos MRCs e a abrangência limitada de matrizes e analitos restringem o seu uso [17].

O processo de avaliação através destes materiais consiste em analisar um número considerável de amostras iguais desse material e comparar os valores obtidos com os valores certificados [20].

A determinação da exatidão com a utilização dos MRCs pode ser feita através de vários processos:

Erro relativo (ER) - componente de erros sistemáticos. O seu grau de exigência em termos da exatidão é definido pelo laboratório que deve ter por base dados bibliográficos ou na ausência deste utilizar critérios de bom senso. O ER é expresso através da Eq. 2.27 em percentagem:

$$Er = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad (2.27)$$

sendo,

X_{lab} - valor obtido experimentalmente;

X_v - valor aceite como verdadeiro, o valor certificado do MRC [17].

Teste de hipóteses (teste t) - componente de erros sistemáticos associados ao método praticado, usando um teste t. O teste t expressa-se pela Eq. 2.28:

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{S_{X_{lab}}} \quad (2.28)$$

em que:

X_{lab} - média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório;

N- número de amostras ensaiadas;

$S_{X_{lab}}$ - desvio-padrão associado à média dos valores do laboratório.

Se $|t| \geq t_{trab}$, não ficou estatisticamente comprovado a existência de erros sistemáticos, logo o ensaio é satisfatório.

Se $|t| > t_{trab}$, ficou estatisticamente comprovado a existência de erros sistemáticos, logo o ensaio não é satisfatório [17].

Fator de desempenho Z (“Z-score”) - técnica de avaliação do desempenho do laboratório. É obtido pela Eq. 2.29.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (2.29)$$

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro, isto é, o valor do certificado do MRC;

S- unidade de desvio pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna.

Se $|Z| \leq 2$: Satisfatório;

Se $2 < |Z| \leq 3$: Questionável;

Se $|Z| > 3$: Incorreto.

Este fator é função da unidade de desvio adotada, ou seja, pode-se utilizar outra escala de pontuação diferente da exposta anteriormente [17].

Erro normalizado (En) - metodologia de avaliar o desempenho quando o laboratório calcula a incerteza do seu resultado. É adquirido de acordo com a Eq. 2.30.

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (2.30)$$

em que:

U_{lab} - incerteza do resultado do laboratório;

X_v - valor verdadeiro;

X_{lab} - intervalo de incerteza;

U_{ref} - incerteza associada ao valor verdadeiro.

Se $|E_n| \leq 1$, então U_{lab} está bem estimada [17].

➤ Testes comparativos

Consiste na comparação dos resultados obtidos pelo método em desenvolvimento em relação aos resultados obtidos por um método de referência, avaliando assim o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos [17]. Na prática, realizam-se análises em replicado utilizando os dois métodos em separado nas mesmas amostras [24].

Existem várias técnicas para comparar os resultados obtidos por dois métodos, sendo elas, o teste de hipóteses: teste t das médias; teste de hipóteses: teste t das diferenças (amostras emparelhadas); teste de regressão linear entre dois métodos de ensaio. Na prática a utilização de software “Microsoft Excel” permite aceder facilmente aos testes estatísticos anteriormente mencionados [17].

Neste trabalho será abordado o teste t das diferenças (amostras emparelhadas) uma vez que é empregue na validação deste método.

Este teste consiste na comparação de amostras iguais ou similares, na mesma gama de trabalho, por dois métodos. Para tal determina-se dois valores de t: t_{exp} (t experimental) e o t_{tab} (t tabelado). Estes dois parâmetros são comparados tendo como critério de aceitação:

$$t_{exp} \leq t_{tab}$$

que significa, que os resultados dos dois métodos não apresentam desvios significativos.

O valor de t_{exp} é obtido através da Eq 2.31.

$$t_{exp} = \frac{D_m}{S_m} \times \sqrt{N} \quad (2.31)$$

onde:

N- número de amostras ensaiadas pelos dois métodos;

D_m - média aritmética das diferenças;

S_m - desvio-padrão associado à média das diferenças.

O valor de t_{tab} é determinado a partir de um certo grau de confiança e para N-1 graus de liberdade [22].

➤ Ensaios interlaboratoriais

Um ensaio interlaboratorial consiste na organização, realização e avaliação de ensaios realizados à mesma amostra ou material por dois ou mais laboratórios diferentes, de acordo com condições pré-definidas [17]. O mesmo ensaio ajuda a analisar a repetibilidade, reprodutibilidade, identificar erros sistemáticos e avaliar o desempenho do laboratório. No caso de se tratar de ensaios acreditados pelo IPAC, é obrigatória a participação em ensaios interlaboratoriais, pelo menos uma vez, em cada ciclo de acreditação (4 anos) [28].

Existem vários tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante o objetivo pretendido, nomeadamente:

Ensaio interlaboratorial de aptidão: tem como objetivo a avaliação do desempenho dos participantes e também permite avaliar a exatidão dos resultados do laboratório.

Esta avaliação é realizada segundo critérios pré-estabelecidos que permitem a comparação entre os vários participantes [29].

Ensaio Interlaboratorial de Normalização: consiste no estudo das características de reprodutividade e repetibilidade de um método de análise [17].

A avaliação do desempenho do laboratório pode ser avaliada através do Z-score definido pela Eq. 2.32:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (2.32)$$

em que:

X_{lab} - valor obtido pelo Laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro, isto é, o valor estabelecido no ensaio interlaboratorial;

S- unidade de desvio, pode ser o desvio-padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial ou a incerteza de Xv.

Se $|Z| \leq 2$: avaliação satisfatória

Se $2 < |Z| \leq 3$: avaliação questionável

Se $|Z| > 3$: avaliação incorreta

Este fator é função da unidade de desvio adotada, ou seja, pode-se utilizar outra escala de pontuação diferente da exposta anteriormente [17].

2.1.5 Controlo de qualidade

Segundo a NP EN ISO 9000:2005 a qualidade é o grau de satisfação de requisitos dados por um conjunto de caraterísticas intrínsecas [30] .

Todas as análises químicas estão sujeitas a erros, sendo essencial minimiza-los e controla-los. Atualmente, os laboratórios de ensaio para garantirem que os seus resultados são fidedignos devem usar métodos validados, possuírem um controlo de qualidade interno, participarem em programas de ensaios interlaboratoriais e serem acreditados segundo a norma portuguesa NP EN ISO/IEC 17025:2010 [31].

Os laboratórios químicos também têm que ser capazes de conhecer e identificar as potenciais causas de erros e tentar eliminá-las, contudo devem possuir um sistema de deteção de erros baseado no controlo do processo analítico. Sendo assim, o laboratório deve possuir um sistema de controlo de qualidade [29]. Segundo a ISO 8402:1994, o controlo de qualidade é definido como um “conjunto de técnicas e atividades de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade.” O objetivo do sistema de controlo de qualidade é controlar e garantir a qualidade dos resultados. Este sistema é subdividido em controlo de qualidade interno, externo e cartas de controlo [25].

a) Controlo de qualidade interno

Tem como pressuposto controlar a precisão dos resultados produzidos pelo laboratório. Este controlo pode ser realizado através:

- i. Análise de brancos em paralelo com as amostras;
- ii. Uso do método de adição padrão;
- iii. Uso de amostras em duplicados;
- iv. Ensaio de recuperação de amostras;
- v. Comparação de resultados obtidos por diferentes técnicas;

- vi. Repetição de análises anteriormente efetuadas (amostras cegas) [29].

O uso de brancos permite detetar contaminações ou deterioração de reagentes, a adição padrão elimina o efeito da matriz, os duplicados garantem a repetibilidade e as recuperações controlam as perdas ou contaminações e avaliam a presença de interferentes [25].

b) Controlo de qualidade externo

Analisa-se a exatidão dos resultados obtidos. Este parâmetro é estudado através da utilização dos MRCs e de ensaios interlaboratoriais, contudo, os ensaios interlaboratoriais são os mais utilizados. Estes dois parâmetros encontram-se referenciados no subcapítulo 2.1.4.3.

c) Cartas de controlo

As cartas de controlo são um método gráfico de controlo de qualidade de resultados (produtos) que permite a deteção de situações anormais/erros. As cartas de controlo são umas das ferramentas estatísticas mais usuais e efetivas para a monitorização de um processo produtivo, tendo como objetivo:

- I. Controlo de equipamentos automático;
- II. Validação de calibrações;
- III. Controlo da precisão e da exatidão da técnica;
- IV. Controlo das operações relativas à realização do método de ensaio.

Esta ferramenta estatística mostra a evolução ao longo do tempo de uma característica, permitindo identificar a presença de variações e auxilia numa melhoria contínua do processo com o objetivo de produzir-se de acordo com as especificações mantendo o processo sob controlo estatístico [32]. O controlo estatístico é assegurado através das linhas dos limites de controlo que permitem em tempo real analisar o andamento do processo [33].

Existem dois tipos de cartas mais comuns: as cartas de médias ou de indivíduos e as cartas de amplitude ou de amplitude móveis.

As cartas de médias ou de indivíduos são cartas que representam ao longo do tempo um determinado parâmetro ou uma média em função do teor do analito. Nestas cartas existe uma linha central (LC), duas linhas de aviso superior e inferior (LSA e LIA) e duas linhas de controlo

superior e inferior (LCS e LCI). As duas linhas de aviso indicam ao analista que poderá estar numa zona de perigo. Quando pontos saem fora das duas linhas de controlo significa que existe um erro anormal que pode afetar os resultados, perante esta situação torna-se necessário a paragem do processo e a análise das causas do erro.

Para a carta de média ou de indivíduos utilizam-se as seguintes regras básicas de análise em rotina e as seguintes ações corretivas:

a) Limites de controlo

Se 1 ponto exceder os limites de controlo deve-se repetir as análises:

- se durante essa repetição se verificar que o novo ponto se encontrar entre os limites de controlo, continua-se as análises e aceita-se os resultados;
- se durante a repetição se verificar que o novo ponto se situa fora dos limites de controlo, interrompe-se as análises e corrige-se o problema.

b) Limites de aviso

Se 2 em 3 pontos consecutivos ultrapassarem os limites de aviso deve-se analisar outro ponto:

- se durante essa repetição se verificar que o novo ponto se encontrar entre os limites de aviso, continua-se as análises e aceita-se os resultados;
- se durante a repetição se verificar que o novo ponto se situa fora dos limites de aviso, interrompe-se as análises e corrige-se o problema.

c) Linha central

Quando 6 pontos consecutivos se situarem todos acima ou abaixo da linha central, deve-se analisar a localização do próximo ponto:

- se esse ponto se localizar do outro lado da linha central, continua-se e aceita-se os resultados das análises;
- se esse ponto se localizar do mesmo lado da linha central, interrompe-se as análise e corrige-se o problema [32].

As cartas de amplitude ou de amplitude móveis são cartas que demonstram ao longo do tempo a diferença ou a amplitude de valores entre vários ensaios repetidos do mesmo material ou de materiais diferentes dentro de uma gama de trabalho. Neste gráfico existem normalmente 3 linhas: linha central (R), linha de aviso (LA) e linha de controlo (LC) [32].

Na carta de amplitudes ou de amplitudes móveis as regras básicas e as ações corretivas a ter em conta são:

a) Limites de controlo

Se 1 ponto excede os limites de controlo deve-se repetir as análises:

- se durante essa repetição se verificar que o novo ponto se encontrar entre os limites de controlo, continua-se as análises e aceita-se os resultados;
- se durante a repetição se verificar que o novo ponto se situa fora dos limites de controlo, interrompe-se as análises e corrige-se o problema.

b) Linha central

Quando 7 pontos consecutivos se localizarem todos acima ou abaixo da linha central, deve-se analisar o ponto seguinte com atenção:

- se esse ponto se localizar abaixo da linha central, continua-se e aceita-se os resultados das análises;
- se esse ponto se localizar acima da linha central, interrompe-se as análise e corrige-se o problema.

c) Tendências

Se 7 pontos consecutivos apresentarem uma tendência crescente ou decrescente deve-se ter em atenção a localização do próximo ponto:

- se esse ponto quebrar essa tendência, continua-se a análise e aceita-se os resultados;
- se esse ponto continuar essa tendência, interrompe-se as análises e corrige-se o problema [32].

Neste trabalho, o processo de validação e controlo de qualidade interno do fósforo total em águas residuais utiliza cartas de controlo de indivíduos e de amplitudes móveis para os padrões de controlo e para os duplicados de amostras utiliza-se cartas de amplitudes relativas, avaliando parâmetros desconhecidos. A determinação das várias linhas para as cartas dos padrões de controlo e para os duplicados de amostras encontram-se a seguir:

a) Cartas dos padrões de controlo

I. Carta de controlo de indivíduos

Na Tabela 2.2 encontram-se as expressões para a determinação dos cinco limites da carta de controlo de indivíduos para um padrão de controlo.

Tabela 2.2- Limites da carta de controlo de indivíduos para o padrão de controlo

Limites	Expressão
LSC	$\bar{X} + \frac{3}{d_2} \times \bar{R}$
LSA	$\bar{X} + \frac{2}{d_2} \times \bar{R}$
LC	\bar{X}
LIA	$\bar{X} - \frac{2}{d_2} \times \bar{R}$
LIC	$\bar{X} - \frac{3}{d_2} \times \bar{R}$

em que:

$$d_2 = 1,128$$

II. Carta de controlo de amplitudes móveis

Na Tabela 2.3 encontram-se as expressões que permitem determinar os limites da carta de amplitudes móveis para um padrão.

Tabela 2.3- Limites da carta de amplitudes móveis para o padrão de controlo

Limites	Expressão
LSC	$D_4 \times \bar{R}$
LSA	$D'_4 \times \bar{R}$
LC	\bar{R}
LIA	$D'_3 \times \bar{R}$
LIC	$D_3 \times \bar{R}$

em que:

$$D'_3 = D_3 = 0;$$

$$D_4' = 2,512;$$

$$D_4 = 3,267.$$

Sendo:

\bar{X} - média aritmética dos valores individuais recolhidos;

\bar{R} - média aritmética das amplitudes móveis (diferença, em módulo, entre o valor do padrão de controlo de uma análise/dia e o valor do padrão de controlo da análise/dia anterior).

b) Carta dos duplicados de amostras

Para os duplicados utiliza-se a carta de amplitudes relativas e as linhas são determinadas segundo a Tabela 2.4.

Tabela 2.4- Limites da carta de amplitudes relativas para duplicados

Limites	Expressão
LSC	$D_4 \times \bar{R}$
LSA	$D_4' \times \bar{R}$
LC	\bar{R}
LIA	$D_3' \times \bar{R}$
LIC	$D_3 \times \bar{R}$

em que:

$$D_3 = D_3' = 0;$$

$$D_4' = 2,512;$$

$$D_4 = 3,267.$$

Sendo:

\bar{R} a média aritmética das amplitudes relativas “R” (diferença entre os dois valores obtidos num duplicado de amostra a dividir pela média aritmética desses mesmos dois valores).

$$\text{Isto é, } R = \frac{x_1 - x_2}{\left(\frac{x_1 + x_2}{2}\right)} \text{ [32].}$$

2.2 Parte experimental

2.2.1 Equipamento e reagentes

Neste trabalho prático utilizou-se como equipamento específico o referido na Tabela 2.5.

Tabela 2.5- Equipamento utilizado para a determinação do fósforo total em águas residuais

Equipamento	Marca
Balança analítica	Shimadzu modelo AUX220
Espectrofotómetro de UV-VIS	Hach Lange modelo DR 5000
Cuvette de quartzo de 10 mm de percurso ótico	Hellma Analytics

Na Tabela 2.6 encontram-se as informações relativas aos vários reagentes utilizados na determinação do fósforo total em águas residuais.

Tabela 2.6- Reagentes

Reagentes	Fórmula Química	Massa molecular g/mol	Composição	Marca
Fenolftaleína em 1% de etanol	/	/	/	Merck
Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,07	95% (m/m)	Fisher Chemical
Persulfato de amónio sólido	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	228,19	99,1% (m/m)	VWR BDH Prolabo
Hidróxido de sódio	NaOH	40,00	40% (m/v)	Scharlau
Carvão ativado	C	12,01	/	Panreac AppliChem
Molibdato de amónio	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1235,86	99% (m/m)	Scharlau
Metavanadato de amónio	NH ₄ VO ₃	116,98	99,5% (m/m)	Scharlau
Ácido clorídrico	HCl	36,46	37% (m/v)	Fisher Chemical
Dihidrogénofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	136,09	/	VWR Prolabo
Dihidrogénofosfato de potássio	KH ₂ PO ₄	136,09	99,5% (m/m)	Scharlau

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura de grau 3 com uma condutividade de

Soluções		Preparação
Solução-mãe de fósforo, 50 mg P/L		Pesar 109,75 mg de KH_2PO_4 , e transferir para um balão de 500 mL, perfazer o volume com água ultrapura de grau 3.
Solução vanadato-molibdato (reagente colorimétrico)	Solução A	Dissolver 12,5 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em 150 mL de água ultrapura de grau 3.
	Solução B	Dissolver 0,625 g de NH_4VO_3 , por aquecimento até à ebulição em 150 mL de água ultrapura de grau 3. Deixar arrefecer e adicionar 165 mL de HCl concentrado. Arrefecer a mistura à temperatura ambiente.
		Adicionar a solução A na B, misturar e diluir para 500 mL com água ultrapura de grau 3.
Ácido sulfúrico (H_2SO_4)		Num balão de 100 mL adicionar 60 mL de água ultrapura de grau 3 e 30 mL de H_2SO_4 concentrado e perfazer o volume com água ultrapura de grau 3.

0,093 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura de 16,9 °C.

As soluções necessárias para este trabalho e a sua preparação encontram-se descritas nas Tabela 2.7.

Tabela 2.7- Preparação de soluções

Preservação e armazenamento das amostras

Após a receção das amostras, estas devem ser acidificadas com H_2SO_4 concentrado a pH <2 e guardadas na câmara de frio a 4 °C.

2.2.2 Procedimento

O material utilizado na determinação do fósforo total em águas residuais deve ser lavado com uma solução de H_2SO_4 4 M e passado por água ultrapura de grau 3 duas vezes.

O procedimento para a determinação do fósforo total em águas residuais engloba duas etapas. A primeira consiste na digestão ácida da amostra e a última etapa refere-se ao método colorimétrico.

2.2.2.1 Digestão

Realizaram-se duas digestões diferentes em autoclave e em placa de aquecimento. A seguir encontra-se o procedimento para cada uma.

I. Autoclave

Colocar nos frascos de Schott, 50 mL de amostra, adicionar 1 gota de fenolftaleína e se a solução ficar vermelha adicionar algumas gotas de H_2SO_4 até ao desaparecimento da cor.

Posteriormente, adicionar 1 mL de H_2SO_4 e 0,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. De seguida, colocar na autoclave durante 30 minutos à pressão de 98-137 KPa.

Após a digestão deixar arrefecer e diluir para 100 mL com água ultrapura de grau 3.

Por último, adicionar uma gota da solução de fenolftaleína e neutralizar com NaOH 40% (m/v), até ao aparecimento da coloração rosa suave.

Em algumas amostras pode ocorrer a formação de um precipitado (fosfato de cálcio), mas não é necessário filtração pois, este precipitado redissolve nas condições ácidas no ensaio colorimétrico.

II. Placa de aquecimento

Agitar a amostra, medir 50 mL para um erlenmeyer e adicionar 1 gota de fenolftaleína. Se a amostra apresentar uma cor vermelha adicionar gota a gota a solução de H_2SO_4 até ao desaparecimento da cor.

De seguida adicionar 1 mL da solução de H_2SO_4 , 0,4 g de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ sólido e agitar.

Posteriormente, antes de colocar na placa de aquecimento, adicionar os reguladores de ebulição e deixar ferver suavemente até um volume final de 10 mL.

Após a redução do volume deixar arrefecer e diluir a amostra para 30 mL com água ultrapura de grau 3. Em seguida adicionar uma gota de fenolftaleína e neutralizar a solução com NaOH 40% (m/v) até uma coloração rosa suave.

Em algumas amostras pode ocorrer a formação de um precipitado (fosfato de cálcio), mas não é necessário filtração pois, este precipitado redissolve nas condições ácidas no ensaio colorimétrico.

2.2.2.2 Método colorimétrico

Este método envolve a elaboração de uma curva de calibração e posteriormente a análise da amostra.

I. Curva de calibração

Preparar os padrões medindo os volumes indicados na Tabela 2.8 e após 10 minutos realizar a leitura das absorvâncias a $\lambda = 420 \text{ nm}$.

Tabela 2.8 - Preparação dos padrões de fósforo total

Nº balão/ V_{final}	mg P/L	$V_{\text{solução de 50 mg P/L a}}$ adicionar (mL)	$V_{\text{vanadato-molibdato a}}$ adicionar (mL)	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (mL)
1 (50 mL)	0	0	10	40
2 (50 mL)	1	1	10	39
3 (50 mL)	2	2	10	38
4 (50 mL)	4	4	10	36
5 (50 mL)	10	10	10	30
6 (50 mL)	15	15	10	25

II. Procedimento das amostras

No caso de amostras que apresentem uma coloração acentuada adicionar 1 g de carvão ativado, colocar um agitador magnético e deixar agitar durante 15 a 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, filtrar a solução.

Se existirem amostras sem cor mas com sólidos deve-se filtrar a solução.

Medir 30 mL de amostra para um balão volumétrico de 50 mL. Adicionar 10 mL de reagente vanadato-molibdato e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Após 10 minutos proceder à leitura da absorvância das amostras a $\lambda = 420 \text{ nm}$.

2.3 Análise de resultados

2.3.1 Digestão

A determinação do fósforo total em águas residuais teve com base o método descrito no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 2012 (SMEWW). Neste procedimento é referenciado que a digestão com persulfato pode ser realizada numa placa de aquecimento ou em autoclave a uma pressão de 98-137 KPa durante 30 minutos.

De seguida serão apresentadas as concentrações de fósforo total obtidas para várias amostras, utilizando os dois tipos de digestões.

➤ Digestão em autoclave

Na Tabela 2.9 encontram-se os valores obtidos através da digestão na autoclave e os valores das concentrações reais de fósforo total nas amostras. A concentração real de fósforo total foi obtida num laboratório subcontrato acreditado para este método.

Tabela 2.9- Concentração de fósforo total obtidas após digestão na autoclave

Amostra	Concentração obtida (mg P/L)	Concentração real (mg P/L)	ER %
1	0,90	0,81	11,1
2	1,62	4,82	66,4
3	3,40	7,80	56,4
4	0,90	1,10	18,2
5	2,70	3,81	29,1
6	0,64	0,79	19,0
7	0,70	0,50	40,0
8	1,07	2,05	47,8
9	1,38	4,02	65,7
10	3,02	6,51	53,6

Realizou-se também a digestão de um padrão de controlo de 4 mg P/L obtendo-se uma concentração de 1,51 mg P/L.

➤ Digestão na placa de aquecimento

Na Tabela 2.10 está expressas as concentrações de fósforo total obtidas e as concentrações de fósforo total real de cada amostra. Sendo que a concentração real corresponde à concentração obtida num laboratório subcontratado com o ensaio de fósforo total acreditado.

Tabela 2.10- Concentrações de fósforo total: digestão em placa de aquecimento

Amostra	Concentração obtida (mg P/L)	Concentração real (mg P/L)	ER %
1	4,86	4,82	0,8
2	1,15	1,10	4,5
3	3,48	3,81	8,7
4	<1	<1	-
5	1,98	1,60	23,8
6 ⁽¹⁾	33,90	34,10	0,6
7 ⁽¹⁾	36,90	37,00	0,3
8	9,71	9,53	1,9
9	<1	<1	-
10	1,62	1,25	29,6

⁽¹⁾ Diluição: 1/10

Conclusão das digestões

Na digestão em autoclave das dez amostras digeridas, quatro amostras apresentam concentrações muito baixas relativamente à concentração de fósforo total real. As restantes seis amostras apresentam concentrações de fósforo total relativamente afastadas da concentração real. Estas discrepâncias são evidenciadas através do ER que se apresenta compreendido entre os 11,1% até aos 66,4 %.

Relativamente à digestão do padrão de 4 mg P/L e este apresentou uma concentração de 1,51 mg P/L apresentando um ER de 62,3%.

Na digestão em placa de aquecimento as concentrações de fósforo total obtidas encontram-se próximas das concentrações dos ensaios subcontratados, com ER inferior a 10% na quase totalidade das amostras.

Também se realizou a digestão do padrão de controlo de 4 mg P/L obtendo-se a concentração de 3,84 mg P/L que apresenta um ER de 4%.

Perante estes resultados a digestão em placa de aquecimento demonstrou-se mais eficaz, exata e precisa, decidindo-se a mudança para esta metodologia.

2.3.2 Validação do método

O processo de validação está dividido na avaliação indireta e direta, que são realizadas e analisadas a seguir.

2.3.2.1 Avaliação indireta

Na avaliação indireta será estudada e analisada a gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, limiares analíticos, especificidade/seletividade e a precisão.

➤ Gama de trabalho

A gama de trabalho referida no SMEWW, 2012 para este método está compreendida entre 1 mg P/L a 20 mg P/L, sendo necessário a sua avaliação. Para tal, aplicou-se o teste de homogeneidade de variâncias, que engloba os passos descrito no subcapítulo 2.1.4.1.

Após a aplicação do teste de homogeneidade de variâncias para a gama de trabalho de 1 a 20 mg P/L conclui-se que a gama de trabalho não estava bem ajustada. Perante esta situação decidiu-se diminuir a gama de trabalho para 1 a 15 mg P/L. A análise para esta gama de trabalho encontra-se descrita a seguir.

As leituras dos padrões de 1 e 15 mg P/L foram realizadas num espectrofotómetro de UV-VIS a $\lambda = 420$ nm, durante 10 dias diferentes em condições de repetibilidade.

As absorvâncias obtidas do padrão de 1 mg P/L e do padrão de 15 mg P/L e a suas variâncias encontram-se na Tabela 2.11.

Tabela 2.11- Valores de absorvância dos padrão 1 mg P/L e 15 mg P/L

Nº leituras	1 mg P/L	15 mg P/L
1	0,050	0,785
2	0,055	0,789
3	0,046	0,789
4	0,051	0,787
5	0,053	0,796
6	0,051	0,780
7	0,052	0,789
8	0,052	0,790
9	0,055	0,788
10	0,053	0,793
S^2	$6,84 \times 10^{-6}$	$1,85 \times 10^{-5}$

O valor do PG depende dos valores das variâncias dos padrões, conforme demonstram as Eqs. 2.33 e 2.34.

$$\text{Se } (S_{10}^2) > (S_1^2), \text{ PG} = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad (2.33)$$

$$\text{Se } (S_1^2) > (S_{10}^2), \text{ PG} = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad (2.34)$$

Neste caso, $(S_{10}^2) > (S_1^2)$, logo utiliza-se a Eq. 2.33, obtendo-se o valor de PG =2,70.

Por último o valor do PG obtido é comparado com o valor F da distribuição de Fisher, para n-1 graus de liberdades e para uma probabilidade de 99% (Tabela 2.12).

Tabela 2.12- Teste de homogeneidade de variâncias

Graus de liberdade (n-1)	9
F da distribuição de Snedecor-Fisher	5,35
PG	2,70

Conclusão: PG < F: gama de trabalho bem ajustada.

➤ Linearidade

Para avaliar a linearidade das curvas de calibração e aceitação das mesmas, utilizou-se a seguinte metodologia:

- Representação gráfica da curva de calibração e a determinação do seu coeficiente de correlação.

A curva de calibração foi construída utilizando 6 soluções padrão com as seguintes concentrações: 0, 1, 2, 4, 10 e 15 mg P/L. A leitura destes padrões foi realizada num espectrofotómetro de UV-VIS a $\lambda = 420$ nm.

Elaboraram-se 10 curvas de calibração, obtendo-se os coeficientes de correlação, que se encontram indicados na Tabela 2.13.

Tabela 2.13- Curvas de calibração e coeficientes de correlação

Equação da curva de calibração	Coeficiente de correlação
$Y = 0,0526 x - 0,0027$	0,999
$Y = 0,0524 x + 5 \times 10^{-5}$	0,999
$Y = 0,0527 x - 0,0028$	0,999
$Y = 0,0525 x - 0,0012$	1,000
$Y = 0,0531 x - 0,0013$	1,000
$Y = 0,0520 x - 0,0017$	0,999
$Y = 0,0525 x - 0,0011$	0,999
$Y = 0,0526 x - 0,001$	0,999
$Y = 0,0526 x + 0,001$	1,000
$Y = 0,0523 x + 0,0015$	0,999

Segundo o Guia Relacre 13 - Validação de métodos internos de ensaios em análise química, os coeficientes de correlação devem ser superiores a 0,995. Este valor é utilizado como referência em laboratórios que utilizam como metodologia a curva de calibração.

Através dos valores da Tabela 2.13 pode-se constatar que os coeficientes de correlação são superiores a 0,995, situando-se muito próximo do valor do coeficiente de correlação, ideal, ou seja, de 1.

- b) Teste de linearidade que consiste na comparação estatística do valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Fisher.

Relativamente ao teste de linearidade, este consiste na determinação da função de calibração linear através da ISO 8466-1:1990, da função não linear através da ISO 6466-2:1993 e os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{Y/X}$ e S_{Y2} .

Através da determinação $S_{Y/X}$ e S_{Y2} calcula-se o DS^2 através da Eq. 2.35 e posteriormente determina-se o valor do PG. Por último compara-se o valor de PG com o F da distribuição de Fisher.

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{Y/X}^2 - (N - 3) \times S_{Y2}^2 \quad (2.35)$$

Este teste foi aplicado numa das várias curvas de calibração obtidas, utilizando o método dos mínimos quadrados.

Na Tabela 2.14 encontram-se as concentrações dos vários padrões de fósforo com as respetivas absorvâncias, obtidas num espectrofotómetro de UV-VIS a $\lambda = 420$ nm.

Tabela 2.14- Concentrações dos padrões e respetivas absorvâncias

Concentração (mg P/L)	Absorvância
0	0,000
1	0,055
2	0,110
4	0,213
10	0,533
15	0,793

A determinação do $S_{Y/X}$ foi obtida através da ferramenta de regressão do programa “Microsoft Excel” em que obteve-se o valor de $S_{Y/X} = 2,16 \times 10^{-3}$ mg P/ L. Através desta mesma ferramenta retirou-se a equação da curva, $y = 5,28 \times 10^{-2} x + 2,2 \times 10^{-3}$ com um coeficiente de correlação de 1,00.

A ferramenta de regressão do “Microsoft Excel” fornece também os dados relativos aos resíduos. O valor de resíduo corresponde à diferença entre o valor de y observado e o valor de y previsto. Na Tabela 2.15 encontram-se os resultados dos resíduos para a calibração linear.

Tabela 2.15- Resíduos

Observação	Padrão (mg P/L)	Y observado	Y previsto	Resíduos
1	0	0,000	0,002	-0,002
2	1	0,055	0,055	0,000
3	2	0,110	0,108	0,002
4	4	0,213	0,214	-0,001
5	10	0,533	0,531	0,002
6	15	0,793	0,795	-0,002

Através destes resultados é possível elaborar um gráfico relativo aos resíduos (Fig. 2.2) para os padrões.

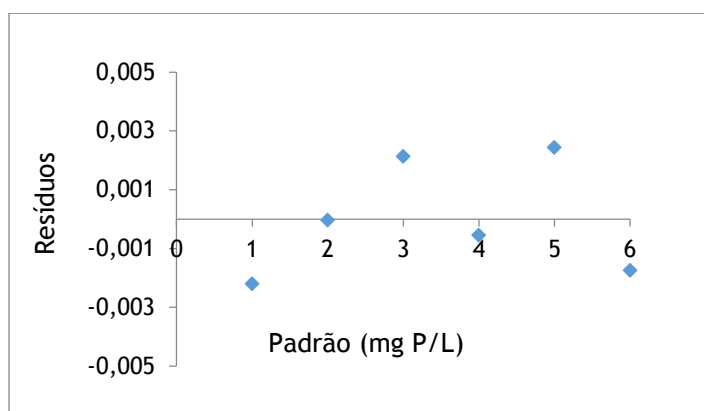


Figura 2.2- Distribuição dos resíduos.

Observando a Fig. 2.2 pode-se concluir que os resíduos apresentam uma distribuição aleatória, sem pontos atípicos e encontrando-se bastante perto da reta $y=0$. Desta forma, pode-se concluir que existe um bom ajuste para uma curva de calibração linear.

Para a determinação de S_{Y2} , inicialmente determina-se a equação da curva de 2º grau, obtendo-se uma equação $y = 7,9 \times 10^{-4} x^2 + 5,38 \times 10^{-2} x - 7 \times 10^{-5}$. De seguida, para o cálculo do S_{Y2} foi necessário calcular alguns parâmetros que se encontram na Tabela 2.16.

Tabela 2.16- Parâmetros necessários para a determinação do S_{Y2}

x_i	y_i	\hat{y}_i	$y_i - \hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
0	0,000	7,93E-04	-7,93E-04	6,29E-07
1	0,055	5,45E-02	4,61E-04	2,13E-07
2	0,110	1,08E-01	1,85E-03	3,41E-06
4	0,213	2,15E-01	-1,99E-03	3,95E-06
10	0,533	5,32E-01	6,60E-04	4,36E-07
15	0,793	7,93E-01	-1,87E-04	3,49E-08

Após a determinação dos parâmetros anteriores obtiveram-se os valores da Tabela 2.17, utilizando as várias equações que se encontram no subcapítulo 2.1.4.1.

Tabela 2.17- Teste de linearidade

Parâmetro	Valor
S_{Y2}	$1,70 \times 10^{-3}$ mg P/L
DS^2	$9,97 \times 10^{-6}$ mg P/L
PG	3,448
Probabilidade	99 %
Graus de liberdade	3
F da distribuição de Fisher	34,12

Conclusão: PG < F: função de calibração é linear.

➤ Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método em distinguir pequenas diferenças na concentração do analito. É determinada através do declive da curva de calibração.

Para a análise deste parâmetro prepararam-se 10 curvas de calibração realizadas em dias diferentes com preparações independentes. Os padrões foram lidos a $\lambda = 420$ nm.

Na Tabela 2.18 encontram-se os resultados dos vários declives da curva de calibração obtidos em diferentes dias com o ER associado.

Tabela 2.18- Declives das curvas de calibração e erro relativo associado

Nº de leituras	Declive	ER
1	0,0526	-
2	0,0524	0,4
3	0,0527	0,4
4	0,0525	0,1
5	0,0531	1,0
6	0,0520	1,3
7	0,0525	0,1
8	0,0526	0,1
9	0,0526	0,1
10	0,0523	0,5
ER máximo (%)	1,3	
CV (%)	0,5	

Através da tabela anterior é possível concluir-se que a sensibilidade da curva é bastante estável, uma vez que o ER máximo e o CV são <10%.

Segundo o OGC002:2011 para a acreditação de laboratórios químicos, o laboratório pode decidir não efetuar a calibração diária, mas sim periodicamente. Para tal, é necessário no mínimo um histórico de 5 calibrações que apresentem um sistema analítico estável (declive). Sendo assim, observando a Tabela 2.18 evidencia-se um histórico de 10 calibrações que demonstram a estabilidade do sistema analítico, podendo adotar-se a calibração periódica em análise de rotina.

Por forma a avaliar a sensibilidade do método em rotina, pode-se estabelecer como critério de aceitação o valor de ER <10 %. Para valores superiores, torna-se necessário repetir a curva de calibração. O recurso à calibração periódica deve ser acompanhado da verificação da mesma, com a análise do padrão mínimo e máximo da curva de calibração. É então necessário estabelecer também para estes padrões critérios de aceitação.

➤ Limiares analíticos

Os limiares analíticos englobam o L.Q. e o L.D. do método. O L.Q. corresponde à concentração mínima que é possível de quantificar. No caso do L.D. este é definido como a menor quantidade de analito que é possível detetar sem ser necessariamente possível quantificar.

Estes limites foram determinados através de leituras realizadas ao padrão de menor concentração da curva de calibração que apresenta uma concentração de 1 mg P/L em dias diferentes (Tabela 2.19).

Tabela 2.19- Concentrações obtidas do padrão de 1 mg P/L

Nº de leituras	Concentração do padrão (mg/L)	ER (%)	CV (%)
1	0,975	2,5	2,88
2	1,004	0,4	
3	0,994	0,6	
4	1,011	1,1	
5	1,046	4,6	
6	0,989	1,1	
7	1,004	0,4	
8	0,971	2,9	
9	1,038	3,8	
10	0,954	4,6	
Desvio-padrão		0,029	

Segundo o OGC002, 2011- Guia para a creditação de laboratórios, o valor do L.Q. corresponde às leituras realizadas ao primeiro padrão da gama de trabalho que deve apresentar um CV e ER <10 %.

Analisando a tabela anterior constata-se que as dez concentrações apresentam um CV e um ER <10 %, respeitando o critério referido pelo OGC002.

As Eqs. 2.36 e 2.37 permitem determinar o L.Q. e o L.D. utilizando o desvio-padrão do padrão de menor concentração.

$$\text{L.Q.} = 10\sigma_0 \quad (2.36)$$

$$\text{L.D.} = 3,3\sigma_0 \quad (2.37)$$

Os valores dos limiares analíticos encontram-se na Tabela 2.20.

Tabela 2.20- Limiares analíticos

L.Q. (mg P/L)	L.Q. majorado (mg P/L)	L.D. (mg P/L)	L.D. da majoração (mg P/L)	L.D. do Decreto-lei nº 236/1998 (mg P/L)
0,287	1	0,095	0,30	10

O valor do L.D. obtido experimentalmente está de acordo com o L.D. do Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto, uma vez que o valor experimental é mais baixo do que o valor do L.D. do Decreto-lei, utilizando a mesma técnica analítica.

➤ Especificidade / seletividade

Este parâmetro permite avaliar se o método apresenta a capacidade de identificar somente o analito em estudo numa mistura complexa.

Para avaliar a seletividade do método adicionou-se a várias amostras uma quantidade conhecida de fósforo e procedeu-se à sua análise. O padrão de fósforo adicionado às várias amostras tinha uma concentração de 4 mg P/L.

Na Tabela 2.21 encontram-se as concentrações obtidas da amostra, do padrão, da amostra fortificada e a taxa de recuperação de cada amostra analisada.

Tabela 2.21- Recuperação de amostras

Amostra	Concentração da amostra (mg P/L)	Concentração do padrão (mg P/L)	Concentração da amostra fortificada (mg P/L)	% Recuperação
1	0,96	4,00	4,18	81
2	0,98	4,00	4,57	90
3	0,43	4,00	4,01	90
4	0,90	4,00	4,46	89
5	4,67	4,00	7,98	83

Analisando a tabela anterior a taxa de recuperação mais elevada foi de 90 %. Em métodos em que se utiliza a espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS a taxa de recuperação de amostras situa-se entre os 80 % a 120 %. Sendo assim, as taxas de recuperação apresentadas encontram-se dentro do intervalo indicado para métodos que utilizam esta técnica.

Os resultados obtidos foram representados na Fig. 2.3, sendo os limites os valores do critério de aceitação habitualmente aceite.

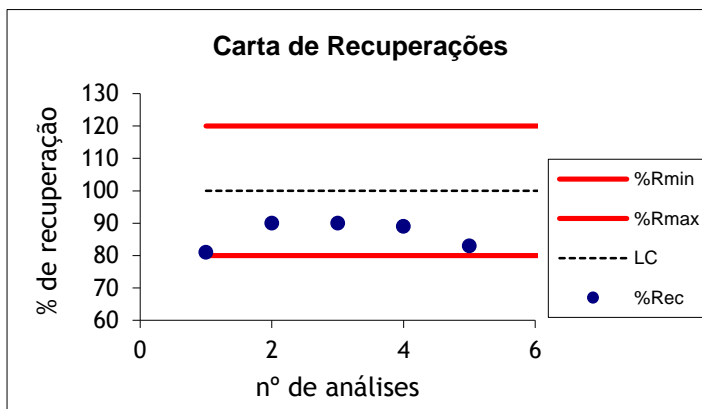


Figura 2.3- Representação gráfica das recuperações na validação do método.

Na Tabela 2.22 encontram-se os valores referentes às linhas que se encontram na representação gráfica anterior.

Tabela 2.22- Dados da representação gráfica das recuperações

Percentagem máxima de recuperação	120 %
Linha central	100 %
Percentagem mínima de recuperação	80 %

Observando a Fig. 2.3 observa-se que as cinco recuperações encontram-se posicionadas entre a percentagem mínima de recuperação e a linha central.

➤ Precisão e exatidão

A exatidão corresponde ao erro sistemático e é a diferença entre o valor médio de um conjunto de valores e o valor real. Por outro lado, a precisão corresponde ao erro aleatório e resulta do desvio-padrão da dispersão dos resultados em torno da média.

Para o cálculo da precisão e da exatidão, utilizou-se os resultados dos padrões de controlo de 4 mg P/L não digerido e digerido.

a) Padrão de controlo de 4 mg P/L

O padrão de 4 mg P/L corresponde ao padrão do meio da curva de calibração. Este padrão é preparado da mesma forma do que o padrão de 4 mg P/L da curva de calibração, mas a partir de uma solução-mãe com lote diferente.

A solução padrão de 4 mg P/L foi lida durante 10 dias diferentes, obtendo-se as concentrações que se encontram na Tabela 2.23.

Tabela 2.23- Padrão 4 mg P/ L

Nº de leituras	Padrão	Concentração (mg P/L)
1	4 mg P/L	3,985
2		4,017
3		4,014
4		4,040
5		4,030
6		4,011
7		4,044
8		4,006
9		4,053
10		4,030
Média		4,023
Desvio-padrão		0,021

Com os valores indicados na tabela anterior construiu-se uma carta de controlo de indivíduos (Fig. 2.4) e uma carta de controlo de amplitudes móveis (Fig. 2.5) para este padrão.

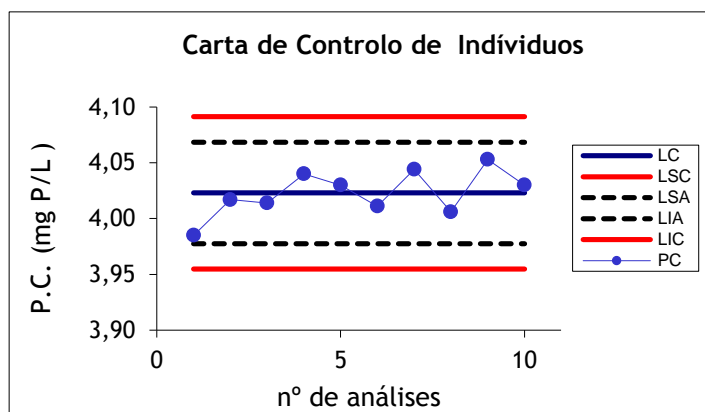


Figura 2.4- Carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L na validação do método.

Na Tabela 2.24 estão referenciados os valores dos vários limites da carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L.

Tabela 2.24- Dados da carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L.

Limite superior de controlo (LSC)	4,091 mg P/L
Limite superior de aviso (LSA)	4,069 mg P/L

Linha central (LC)	4,023 mg P/L
Limite inferior de aviso (LIA)	3,977 mg P/L
Limite inferior de controlo (LIC)	3,955 mg P/L

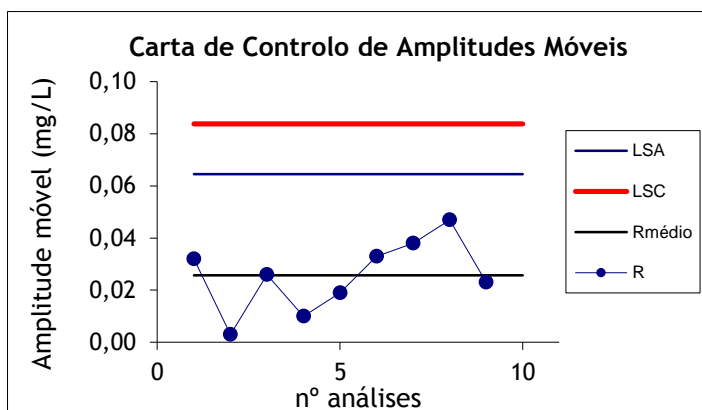


Figura 2.5- Carta de controlo de amplitude móveis para o padrão 4 mg P/L na validação do método.

A Tabela 2.25 é referente aos três limites e à linha central da carta de amplitudes móveis do padrão de 4 mg P/L.

Tabela 2.25- Dados da carta de controlo de amplitudes móveis do padrão de 4 mg P/L.

Limite superior de controlo (LSC)	0,084 mg P/L
Limite superior de aviso (LSA)	0,064 mg P/L
Linha central (LC)	0,026 mg P/L
Limite inferior de controlo e de aviso	0,000 mg P/L

Conclusões:

- Carta de controlo de indivíduos: o primeiro ponto encontra-se no limite de aviso inferior mas não é necessário tomar qualquer medida uma vez que o ponto seguinte afasta-se deste limite. Os restantes pontos apresentam uma distribuição aleatória entre as linhas de aviso superior e inferior.
- Carta de controlo de amplitudes móveis: os dez pontos encontram-se entre o limite inferior de controlo e de aviso e a linha superior de aviso.
- É possível concluir-se que todos os pontos se encontram sob controlo estatístico, podendo então ser utilizada esta carta na rotina do laboratório.

b) Padrão de controlo digerido

Neste caso, utilizou-se o padrão da curva de calibração de 4 mg P/L, preparado a partir de uma solução diferente (lote diferente) da solução utilizada na curva de calibração, para verificar se a sua concentração no final do processo é igual à concentração esperada de 4 mg

P /L. Na Tabela 2.26 encontram-se as concentrações obtidas do padrão de controlo digerido em dez dias diferentes.

Tabela 2.26- Concentrações do padrão de controlo digerido de 4 mg P/L.

Nº de leituras	Padrão	Concentração (mg P/L)
1	4 mg P/L	4,22
2		3,84
3		4,44
4		4,52
5		3,63
6		4,69
7		4,03
8		3,90
9		3,84
10		3,86
Média		4,10
Desvio-padrão		0,35

Com os valores anteriores obteve-se as seguintes cartas de controlo de indivíduos e de amplitudes móveis para o padrão digerido (Fig. 2.6 e 2.7).

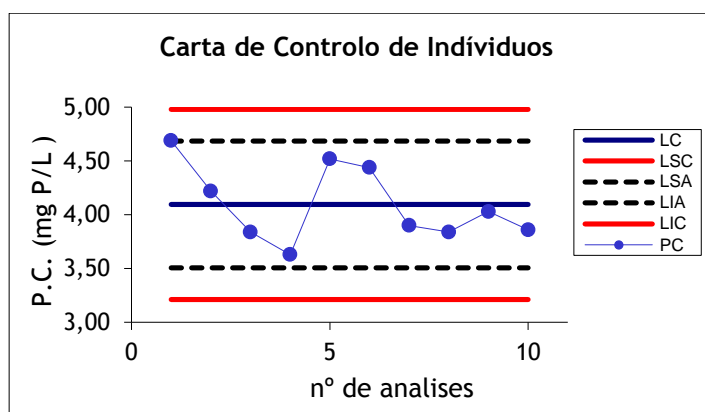


Figura 2.6- Carta de controlo de indivíduos do padrão de controlo digerido de 4 mg P/L na validação do método.

A Tabela 2.27 corresponde aos valores dos vários limites que compõem a carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L digerido.

Tabela 2.27- Dados da carta de controlo de indivíduos do padrão digerido de 4 mg P/L.

Limite superior de controlo (LSC)	5,24 mg P/L
Limite superior de aviso (LSA)	4,86 mg P/L
Linha central (LC)	4,10 mg P/L

Limite inferior de aviso (LIA)	3,33 mg P/L
Limite inferior de controlo (LIC)	2,95 mg P/L

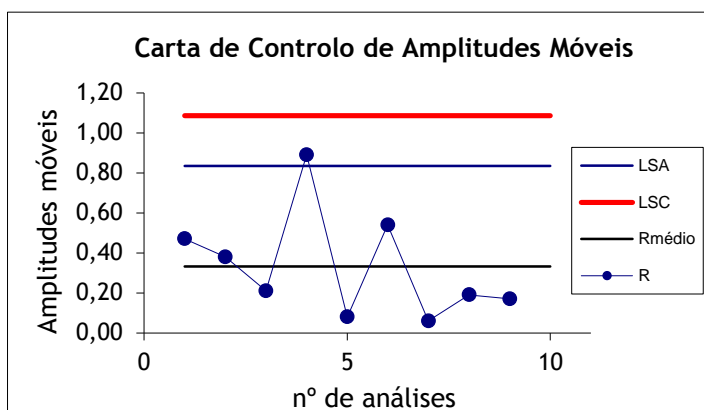


Figura 2.7- Carta de controlo de amplitudes móveis do padrão de controlo digerido de 4 mg P/L na validação do método.

Na Tabela 2.28 estão descritos os valores dos vários limites da carta de amplitudes móveis para o padrão de 4 mg P/L digerido.

Tabela 2.28- Dados da carta de controlo de amplitudes móveis do padrão digerido de 4 mg P/L.

Limite superior de controlo (LSC)	1,41 mg P/L
Limite superior de aviso (LSA)	1,08 mg P/L
Linha central (LC)	0,43 mg P/L
Limite inferior de controlo e de aviso	0,00 mg P/L

Conclusões:

- Carta de controlo de indivíduos: o primeiro ponto excede o limite superior de aviso, contudo não é necessário tomar nenhuma decisão uma vez que se trata de um ponto isolado. Os restantes pontos situam-se entre o limite superior de aviso e o limite inferior de aviso.
- Carta de controlo de amplitudes móveis: o quarto ponto passa a linha de controlo de aviso mas não existe nenhuma restrição relativamente à ultrapassagem deste limite de controlo de aviso. Os restantes pontos encontram-se entre os limites de controlo de aviso superior e inferior.
- Todos os pontos se encontram sob controlo estatístico, podendo então ser utilizada esta carta na rotina do laboratório.

Na Tabela 2.29 apresentam-se os resultados obtidos para a exatidão e a precisão do método.

Tabela 2.29- Precisão e exatidão experimental e do Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto.

Padrão de 4 mg P/L	Parâmetro	Valor (mg P/L)	Valor do Decreto-lei (mg P/L)
Não digerido	Exatidão	0,02	0,10
	Precisão	0,01	0,10
Digerido	Exatidão	0,10	0,10
	Precisão	0,09	0,10

A determinação destes dois parâmetros é efetuada através das seguintes Eqs. 2.38 e 2.39.

$$\text{Exatidão} = |\overline{PC}_{\text{experimental}} - PC_{\text{real}}| \quad (2.38)$$

$$\text{Precisão} = \frac{\text{Desvio-padrão}}{\text{Média}} \quad (2.39)$$

Comparando os valores pode-se concluir a exatidão e a precisão cumprem na totalidade as exigências do Decreto-lei que regue o valor limite de emissão de descarga de águas residuais no que diz respeito à exatidão e precisão.

2.3.2.2 Estimativa da incerteza

“A incerteza é um parâmetro associado a um resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se pode razoavelmente atribuir à grandeza medida” [19].

Existem vários tipos de abordagem para a determinação da incerteza do método, sendo utilizada neste trabalho a abordagem baseada em dados de validação e do controlo interno da qualidade.

Esta abordagem engloba várias determinações que se apresentam a seguir. Inicialmente, determina-se a incerteza associada à curva de calibração do primeiro grau.

1. Incerteza associada à curva de calibração de 1º grau

A curva de calibração deste método é do 1º grau, ou seja, a equação da curva é tipo $y = bx + a$. Os valores dos padrões usados para a obtenção da curva de calibração encontram-se na Tabela 2.30. Através desses valores obtém-se a equação da curva de calibração de $y = 5,28 \times 10^{-2} x + 2,2 \times 10^{-3}$.

Tabela 2.30- Valores de absorvâncias para os padrões da curva de calibração.

Concentração (mg P/L)	Absorvância
0	0,000
1	0,055
2	0,110
4	0,213
10	0,533

15

0,793

Para a determinação desta incerteza utilizou-se o padrão de 4 mg P/L, em que se obtiveram as concentrações que se encontram na Tabela 2.31.

Tabela 2.31- Valores do padrão de 4 mg P/L.

Padrão	Absorvância	Concentração obtida
4	0,208	3,985
4	0,211	4,011
4	0,215	4,030

Para a determinação da incerteza associada à curva de calibração utiliza-se a Eq. 2.40:

$$u_{\text{reta}} = \frac{S_y}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum (X_i - \bar{X})^2}} \quad (2.40)$$

Na Tabela 2.32 encontram-se os dados necessários para a determinação do u_{reta} .

Tabela 2.32- Valores para a determinação do u_{reta} .

Parâmetro	Valor
$S_y = S_{y/x}$	$2,16 \times 10^{-3}$ mg P/L
b	$5,28 \times 10^{-2}$
N	6
n	3
\bar{y}_a	$\frac{0,208+0,211+0,215}{3} = 0,211$
\bar{y}	$\frac{0,000+0,055+0,110+0,213+0,533+0,793}{6} = 0,284$
X_i	0; 1; 2; 4; 10; 15 mg P/L
\bar{X}	$\frac{0+1+2+4+10+15}{6} = 5,33$ mg P/L

Obtém-se uma incerteza associada à curva de calibração de:

$$u_{\text{reta}} = 0,029 \text{ mg P/L.}$$

2. Incerteza associada à precisão, $u_{\text{precisão}}$

A incerteza associada à precisão do método é determinada através da amplitude média absoluta de duplicados de diversas amostras em condições de precisão intermédia.

Na Tabela 2.33 encontram-se as 15 amostras diferentes e os seus duplicados.

Tabela 2.33- Duplicados das amostras.

Nº da amostra	Amostra (mg P/L)	Duplicado (mg P/L)
1	4,65	4,86
2	3,25	3,12
3	3,01	3,05
4	1,98	2,08
5	2,16	1,98
6	2,00	2,17
7	2,00	2,17
8	3,05	3,10
9	33,90	33,90
10	2,16	2,44
11	36,50	33,90
12	2,44	2,08
13	1,90	2,08
14	10,20	9,71
15	3,25	3,48

Através dos valores da tabela anterior determinou-se a amplitude média relativa através da carta de controlo de amplitudes relativa que é de 0,065 mg P/L.

Utilizando a Eq. 2.41 obtém-se o desvio-padrão relativo da precisão ($S_{\text{precisão}}$).

$$S_{\text{precisão}} = \frac{\text{Amplitude média relativa}}{1,128} \quad (2.41)$$

Obtendo-se $S_{\text{precisão}} = 0,058$ mg P/L.

Para métodos com gama de concentração restrita, $S_{\text{precisão}} = u_{\text{precisão}}$, ou seja, $u_{\text{precisão}} = 0,058$ mg P/L.

3. Incerteza associada à exatidão, (u_e)

Para a determinação deste parâmetro utilizaram-se amostras com analito nativo e fortificada no laboratório.

A determinação da incerteza associada à exatidão engloba os seguintes passos:

- a) Determinação da incerteza da solução-mãe de 50 mg P/L, ($u_{C_{\text{solução-mãe}}}$)

A solução mãe de 50 mg P/L foi preparada de acordo com os valores que se encontram na Tabela 2.34.

Tabela 2.34- Solução-mãe de 50 mg P/L.

Massa pesada de KH_2PO_4	0,1098 g
Volume total	500 mL
Pureza do KH_2PO_4	99,5 %

A incerteza da solução mãe é dada pela seguinte Eq. 2.42.

$$u(C_{\text{solução-mãe}}) = C_{\text{solução-mãe}} \times \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + \left(\frac{u_v}{v}\right)^2} \quad (2.42)$$

em que:

u_m - incerteza máxima da balança;

u_p — incerteza relativa à pureza do KH_2PO_4 ;

u_v — incerteza associada ao volume.

A seguir apresenta-se a determinação de cada incerteza necessária para a obtenção da incerteza da solução- mãe:

- I. Incerteza máxima da balança, u_m

$$u_m = \sqrt{(u_{\text{bal}})^2} = \sqrt{(0,001)^2} = 0,001 \text{ g (0,001 g é a incerteza da balança analítica).}$$

- II. Incerteza relativa à pureza do KH_2PO_4 , u_p

$$u_p = \frac{\frac{(100-\text{pureza})}{100}}{\sqrt{3}} = \frac{\frac{(100-99,5)}{100}}{\sqrt{3}} = 2,89 \times 10^{-3}$$

- III. Incerteza associada ao volume, u_v

$$u_v = \frac{\text{tolerância}}{\sqrt{3}} = \frac{0,25}{\sqrt{3}} = 0,144 \text{ mL (0,25 mL é a incerteza do balão de 500 mL).}$$

Sendo assim é possível determinar $u(C_{\text{solução-mãe}})$, através da Eq. 2.42.

$$u_{C_{\text{solução-mãe}}} = 50 \times \sqrt{\left(\frac{0,001}{0,1098}\right)^2 + \left(\frac{2,89 \times 10^{-3}}{0,995}\right)^2 + \left(\frac{0,144}{500}\right)^2} = 0,478 \text{ mg P/L.}$$

b) Determinação da incerteza padrão associada à fortificação, ($u_{(C_{\text{fortificada}})}$)

A fortificação de amostra foi realizada com a adição do padrão de 4 mg P/L, num balão de $50 \pm 0,06$ mL, através de uma pipeta de $5 \pm 0,05$ mL. Sendo assim, é possível determinar $u_{(C_{\text{fortificada}})}$ através da Eq. 2.43.

$$u_{(C_{\text{fortificada}})} = C_{\text{fortificada}} \times \sqrt{\left(\frac{u_{C_{\text{solução-mãe}}}}{C_{\text{solução-mãe}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{pipetado}}}}{V_{\text{pipetado}}}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_{\text{solução fortificada}}}}{V_{\text{total}}}\right)^2} \quad (2.43)$$

em que:

$u_{V_{\text{pipetado}}}$ - incerteza associada à pipetagem do padrão;

$u_{V_{\text{solução fortificada}}}$ - incerteza associada ao volume de fortificação;

V_{total} - volume final da solução fortificada;

V_{pipetado} - volume pipetado da solução-mãe.

Inicialmente é necessário determinar os seguintes parâmetros através da Eq. 2.44:

$$u_v = \frac{\text{tolerância}}{\sqrt{3}} \quad (2.44)$$

I. Incerteza associada à pipetagem do padrão, $u_{V_{\text{pipetado}}}$

$$u_{V_{\text{pipetado}}} = \frac{0,05}{\sqrt{3}} = 0,029 \text{ mL}$$

II. Incerteza associada ao volume de fortificação, $u_{V_{\text{solução fortificada}}}$

$$u_{V_{\text{solução fortificada}}} = \frac{0,06}{\sqrt{3}} = 0,035 \text{ mL}$$

O valor de $u_{(C_{\text{fortificada}})}$ é obtida pela Eq. 2.43 sendo de:

$$u_{(C_{\text{fortificada}})} = 4 \times \sqrt{\left(\frac{0,478}{50}\right)^2 + \left(\frac{0,029}{4}\right)^2 + \left(\frac{0,035}{50}\right)^2} = 0,048 \text{ mg P/L.}$$

c) Determinação da incerteza padrão ($u(\overline{R}_m)$), associada à recuperação média (\overline{R}_m)

Na Tabela 2.35 encontram-se os dados referentes à recuperação de amostras, a qual foi adicionada uma solução padrão de 4 mg P/L.

Tabela 2.35- Recuperação de amostras.

Amostra	Concentração da amostra (mg P/L)	Concentração do padrão (mg P/L)	Concentração da amostra fortificada (mg P/L)	% Recuperação
1	0,96	4,00	4,18	81
2	0,98	4,00	4,57	90
3	0,43	4,00	4,01	90
4	0,90	4,00	4,46	89
5	4,67	4,00	7,98	83

O cálculo da incerteza inicia-se com a determinação do valor da recuperação média do método (\overline{R}_m), para a sua determinação utilizou-se:

$$\overline{C}_{\text{nativa}} = \frac{0,98+0,43+0,96+0,90+4,67}{5} = 1,588 \text{ mg P/L}$$

$$\overline{C}_{\text{obs}} = \frac{4,57+4,01+4,18+4,46+7,98}{5} = 5,04 \text{ mg P/L}$$

$$C_{\text{fortificação}} = 4 \text{ mg P/L}$$

O valor de \overline{R}_m é obtido é de:

$$\overline{R}_m = \frac{\overline{C}_{\text{obs}} - \overline{C}_{\text{nativa}}}{C_{\text{fortificação}}} = \frac{5,04-1,59}{4} = 0,863 \text{ mg P/L}$$

onde:

$\overline{C}_{\text{nativa}}$ - concentração média de analito na amostra não fortificada;

$\overline{C}_{\text{obs}}$ - concentração média da amostra fortificada;

$C_{\text{fortificação}}$ - concentração do padrão de fortificação.

Por último, determina-se a incerteza padrão ($u(\overline{R}_m)$), associada a \overline{R}_m , segundo a Eq. 2.45, uma vez que trata-se de um método em que a gama de concentrações é restrita.

$$u(\overline{R}_m) = \overline{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{s_{\text{obs}}^2/n + s_{\text{nativa}}^2}{(\overline{C}_{\text{obs}} - \overline{C}_{\text{nativa}})^2} \right) + \left(\frac{u(C_{\text{fortificada}})}{C_{\text{fortificada}}} \right)^2} \quad (2.45)$$

onde:

S_{nativa} - desvio padrão de uma série de análises de amostras não fortificadas;

S_{obs} - desvio padrão de uma série de amostras fortificadas;

$u(C_{\text{fortificada}})$ - incerteza padrão associada à fortificação das amostras.

Na Tabela 2.36 encontram-se os dados necessários à determinação de $u(\bar{R}_m)$:

Tabela 2.36- Valores de parâmetros para a determinação de $u(\bar{R}_m)$.

S_{nativa}	1,74 mg P/L
S_{obs}	1,66 mg P/L
$u(C_{\text{fortificada}})$	0,048 mg P/L
\bar{R}_m	0,862 mg P/L
n	5 amostras
\bar{C}_{nativa}	1,59 mg P/L
\bar{C}_{obs}	5,04 mg P/L

Sendo assim, a determinação de $u(\bar{R}_m)$ é dada por:

$$u(\bar{R}_m) = 0,862 \times \sqrt{\left(\frac{1,66^2/5 + 1,74^2}{(5,04 - 1,59)^2}\right) + \left(\frac{0,048}{4}\right)^2} = 0,473 \text{ mg P/L} = U_e$$

Após a determinação da incerteza associada à exatidão é necessário averiguar se os resultados são afetados por desvios sistemáticos revelantes que necessitem de correção, para tal utiliza-se o teste t-student (Eq. 2.46).

$$t = \frac{|1 - \bar{R}_m|}{u(\bar{R}_m)} = \frac{|1 - 0,862|}{0,473} = 0,292 \quad (2.46)$$

$t_{\text{crítico}} = 2,776$, para $n = 4$ com uma probabilidade de 95%.

$t < t_{\text{crítico}}$, logo a recuperação do método não é significativamente diferente de 1 (100%), não sendo necessária correção dos resultados dos ensaios em termos da exatidão.

4. Expressão de resultados

Depois de determinadas as várias fontes de incertezas do método pode-se expressar a incerteza de uma concentração obtida. Para tal, utilizou-se a concentração da amostra 1 que se encontra na Tabela 2.10 de 4,86 mg P/L.

De seguida apresenta-se a determinação da incerteza combinada e expandida relativamente à amostra.

a) Incerteza combinada, U_c

Esta incerteza é dada pela soma das várias incertezas calculadas associada a uma concentração, uma vez que se trata de uma gama restrita de concentrações de fósforo. Como já foi referido anteriormente a incerteza associada à exatidão não é utilizada. Sendo assim, a incerteza combinada é dada pela Eq. 2.47.

$$u_c = \sqrt{u_{\text{reta}}^2 + (u_{\text{precisão}}^2 \times y)} \quad (2.47)$$

em que:

$$u_{\text{reta}} = 0,029 \text{ mg P/L};$$

$$u_{\text{precisão}} = 0,058 \text{ mg P/L};$$

$$y = 4,86 \text{ mg P/L}.$$

Através dos valores anteriores obtém-se:

$$u_c = \sqrt{0,029^2 + (0,058^2 \times 4,86)} = 0,131 \text{ mg P/L}$$

b) Incerteza expandida, (U_y)

Como a gama de trabalho é restrita e o número de amostras utilizadas na determinação da incerteza associada à exatidão foi menor do que 6. A incerteza expandida é obtida através da tabela da distribuição t-student com duas entradas, através dos graus de liberdade e da probabilidade requerida.

Os graus de liberdade são calculados a partir do número de ensaios para a determinação da exatidão, uma vez que é o parâmetro que apresenta menor número de ensaios relativamente à incerteza associada à precisão. O número de ensaios na incerteza associada à exatidão foi de 5, sendo assim $n-1 = 4$. A probabilidade utilizada é de 95 %.

Através dos dados anteriores obtém-se o valor de $t = 2,776$. Sendo assim, a incerteza expandida é obtida por:

$$u_y = u_c \times t = 0,131 \times 2,776 = 0,36 \text{ mg P/L}$$

Agora é possível expressar a incerteza da concentração da amostra 1, sendo, $4,82 \pm 0,36 \text{ mg P/L}$.

2.3.2.3 Avaliação direta

A participação num ensaio interlaborarial e o recurso a materiais de referência são os métodos mais utilizados para analisar a exatidão, visando avaliar o desempenho do laboratório em determinado ensaio.

No tempo definido para a realização do trabalho, não houve possibilidade de participar num ensaio interlaboratorial, tendo-se optado por comparar um conjunto de resultados obtidos experimentalmente em 8 amostras, com os resultados efetuados nas mesmas amostras, mas realizados num laboratório subcontratado, com o ensaio de fósforo acreditado. Para tal utilizou-se o teste de comparação de métodos (teste t de amostras emparelhadas).

Foi ainda utilizado o cálculo de um fator de desempenho do laboratório (z-score), como se o recurso a outro laboratório fosse similar a um ensaio interlaboratorial (bilateral).

a) Comparação de métodos (teste t de amostras emparelhadas)

Para este método utiliza-se como método de referência os valores obtidos pelo laboratório subcontratado e acreditado para a determinação do fósforo total em águas residuais.

Este método baseia-se na diferença da concentração obtida com a concentração da subcontratação e posterior determinação do t_{exp} (valor experimental) que se compara com o t_{tab} (valor tabelado). Deste teste pode-se concluir se os resultados dos dois métodos apresentam ou não desvios significativos consoante a relação do t_{tab} com o t_{exp} .

Na Tabela 2.37 estão expressas as concentrações do método a validar e as concentrações do método de referência com as respetivas diferenças das concentrações.

Tabela 2.37- Resultados do método a validar e do método de referência.

Amostra	Método a validar (mg P/L)	Método de referência (mg P/L)	Diferenças (mg P/L)
1	4,86	4,82	0,04
2	1,15	1,10	0,05
3	3,48	3,81	-0,33
4	1,98	1,60	0,38
5 ⁽¹⁾	33,90	34,10	-0,20
6 ⁽¹⁾	36,90	37,00	-0,10
7	9,71	9,53	0,18
8	1,62	1,25	0,37

⁽¹⁾Diluição: 1/10.

A determinação do t_{exp} é realizada segundo a Eq. 2.48.

$$t_{\text{exp}} = \frac{D_m}{S_m} \times \sqrt{N} \quad (2.48)$$

em que:

N- número de amostras ensaiadas pelos dois métodos;

D_m - média aritmética das diferenças;

S_m - desvio-padrão associado à média das diferenças.

Sendo assim, na Tabela 2.38 encontram-se os dados necessários para a determinação do teste t das diferenças.

Tabela 2.38- Parâmetros necessários para a determinação do teste t das diferenças.

Parâmetro	Valor
D_m	0,05
N	8
S_m	0,24
t_{tab}	1,90
t_{exp}	0,58

Conclusão:

- O valor do t_{exp} é menor do t_{tab} para um nível de significância de 95%, ou seja, os resultados provenientes dos dois métodos não apresentam desvios significativos.

b) Ensaio bilateral

No teste bilateral recorreu-se à determinação do z-score para avaliar o ensaio. O valor de z-score é obtido pela Eq. 2.49.

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (2.49)$$

em que:

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório;

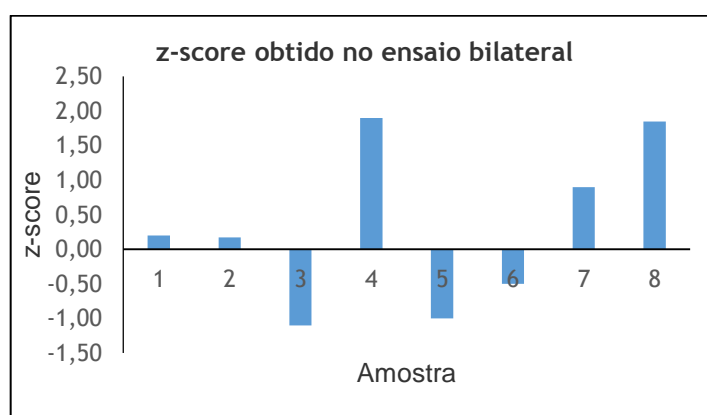
X_v - valor aceite como verdadeiro, isto é, o valor do laboratório subcontratado;

S- unidade de desvio-padrão da média das concentrações ou a incerteza dos resultados de X_v obtidos pelos dois laboratórios.

Na Tabela 2.39 encontram-se as concentrações obtidas e as concentrações da subcontratação com a respetiva incerteza. Na mesma tabela encontra-se o valor de z-score para cada amostra.

Tabela 2.39- Valores obtidos pelo laboratório e valores da subcontratação com o respetivo z-score.

Amostra	Concentração obtida (mg P/L)	Concentração da subcontratação (mg P/L)	Incerteza	Z-score
1	4,86	4,82	0,2	0,20
2	1,15	1,10	0,3	0,17
3	3,48	3,81	0,3	-1,10
4	1,98	1,60	0,2	1,90
5 ⁽¹⁾	33,90	34,10	0,2	-1,00
6 ⁽¹⁾	36,90	37,00	0,2	-0,50
7	9,71	9,53	0,2	0,90
8	1,62	1,25	0,2	1,85

⁽¹⁾ Diluição: 1/10.**Figura 2.8-** Representação gráfica dos z-scores obtidos no ensaio bilateral.**Conclusões:**

- Verifica-se que para as 8 amostras obteve-se o valor de Z-score ≤ 2 , logo a avaliação deste teste bilateral é satisfatória. Esta avaliação foi realizada tendo em conta o critério estabelecido pela Relacre para os ensaios interlaboratoriais em águas residuais que promove.
- Através da análise da Fig. 2.8 constata-se que não existe uma tendência na variação dos valores dos z-scores.

2.3.3 Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é efetuado quando o método está em rotina, este controlo pode ser assegurado através de:

- I. Verificação da linearidade e da sensibilidade da curva de calibração;
- II. Padrão de controlo de 4 mg P/L (lote diferente);
- III. Padrão de 4 mg P/L digerido;
- IV. Duplicados de amostras;
- V. Branco digerido;

- VI. Recuperação de amostras;
- VII. Verificação do limite de quantificação.

Depois da validação do método, este entrou em rotina tendo sido realizada a análise de duas amostras diferentes, além das análises dos parâmetros mencionados acima, os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 2.40 e 2.41.

Tabela 2.40- Parâmetros de controlo de qualidade na análise da amostra 1.

Parâmetros		Concentrações obtidas (mg P/L)	
Verificação da curva de calibração:	1 mg P/L	0,90	
	15 mg P/L	14,19	
Padrão controlo de 4 mg P/L		4,01	
Amostra	Duplicado	1,17	1,17
Padrão de 4 mg P/L digerido		3,82	
Branco digerido		0,02	
Fortificação da amostra	% Recuperação	4,45	82 %

Tabela 2.41- Parâmetros de controlo de qualidade da análise da amostra 2.

Parâmetros		Concentrações obtidas (mg P/L)	
Verificação da curva de calibração:	1 mg P/L	0,89	
	15 mg P/L	14,04	
Padrão controlo de 4 mg P/L		4,07	
Amostra	Duplicado	9,00	8,96
Padrão de 4 mg P/L digerido		3,89	
Branco digerido		0,03	
Fortificação da amostra	% Recuperação	13,51	113 %

De seguida serão analisados em pormenor cada um dos parâmetros de controlo de qualidade interno:

I. Verificação da sensibilidade e da linearidade da curva de calibração

Da análise da sensibilidade da curva de calibração durante a validação do método constatou-se que podia-se adotar uma calibração periódica devido ao histórico de 10 calibrações que apresentavam um sistema analítico estável (declive). Perante esta situação, define-se como critérios de controlo de qualidade interno da calibração periódica a análise dos 2 pontos extremos da curva de calibração (abordagem indicada pela IPAC- Guia de acreditação de laboratórios químicos).

Utilizou-se a última curva de calibração, com a seguinte equação: $y = 0,0528 x + 0,0022$ e com um coeficiente de correlação de 1 para a obtenção das várias concentrações.

O primeiro padrão da curva de calibração é de 1 mg P/L e o último padrão é de 15 mg P/L, o critério de aceitação de cada padrão é de 10%. Na Tabela 2.42 encontram-se os valores obtidos com o intervalo de aceitação e com a respetiva conclusão.

Tabela 2.42- Valores obtidos para a análise da curva de calibração.

	Padrão (mg P/L)	Intervalo de aceitação	Valor obtido (mg P/L)	Conclusão
Amostra 1	1	$1 \pm 0,1$	1,04	Aceite
	15	$15 \pm 1,5$	15,02	Aceite
Amostra 2	1	$1 \pm 0,1$	1,08	Aceite
	15	$15 \pm 1,5$	14,04	Aceite

A curva de calibração $y = 0,0528 x + 0,0022$ está válida, ou seja, pode-se utilizar com segurança esta equação para a análise das amostras.

II. Padrão de controlo de 4 mg P/L (lote diferente)

No subcapítulo 2.3.2.1 foram determinados os vários limites de controlo das cartas de indivíduos e de amplitudes para o padrão de 4 mg P/L. No mesmo subcapítulo constatou-se que os pontos encontravam-se sob controlo estatístico.

Durante a análise de duas amostras com o método em rotina realizou-se a leitura do padrão de 4 mg P/L onde obtiveram-se as concentrações de 4,01 mg P/L e 4,07 mg P/L. Estas concentrações são aceites se respeitarem os limites das cartas de controlo de indivíduos e de amplitudes móveis para o padrão de controlo de 4 mg P/L.

A seguir encontram-se as duas cartas de controlo (Fig. 2.9 e 2.10) onde estão representadas as duas concentrações referidas anteriormente. Os valores dos limites de controlo das duas cartas encontram-se nas Tabelas 2.24 e 2.25 no subcapítulo 2.3.2.1.

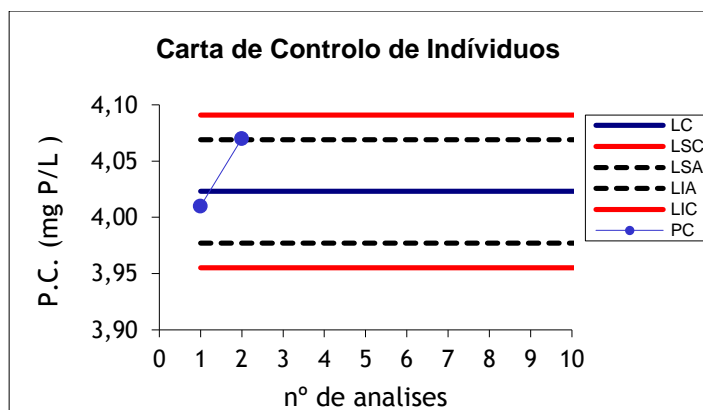


Figura 2.9- Carta de controlo de indivíduos do padrão de 4 mg P/L em rotina.

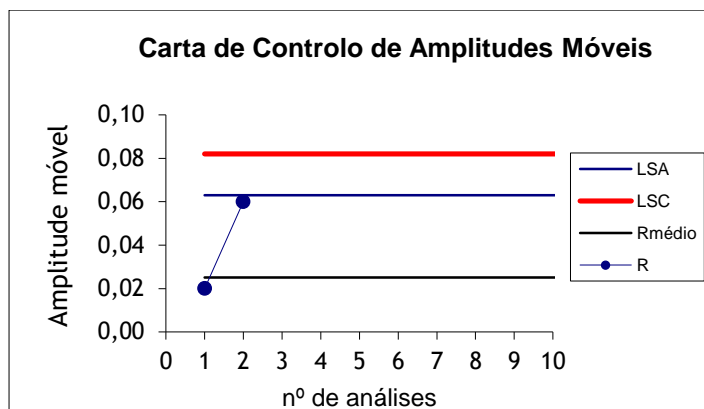


Figura 2.10- Carta de controlo de amplitudes móveis do padrão de 4 mg P/L em rotina.

Conclusões:

- Carta de controlo de indivíduos: o segundo ponto que corresponde à concentração de 4,07 mg P/L encontra-se no limite de aviso superior, devendo-se ter em atenção a localização do ponto seguinte.
- Carta de amplitudes móveis: os dois pontos encontram-se abaixo do limite de aviso superior.
- Os dois valores obtidos para o padrão de 4 mg P/L encontram-se bem ajustados às duas cartas, demonstrando que a curva de calibração apresenta uma boa exatidão e precisão.

III. Padrão de 4 mg P/L digerido

Este padrão em rotina é analisado através dos limites de controlo das Tabelas 2.27 e 2.28 do subcapítulo 2.3.2.1. Nesse subcapítulo conclui-se que o padrão estava sob controlo estatístico garantido a conformidade dos limites de controlo determinados.

Com o método em rotina digeriram-se dois padrões de 4 mg P/L, obtendo-se as concentrações de 3,82 e 3,89 mg P/L.

A seguir encontram-se as cartas de controlo que regem o padrão de 4 mg P/L digerido em rotina (Fig. 2.11 e 2.12).

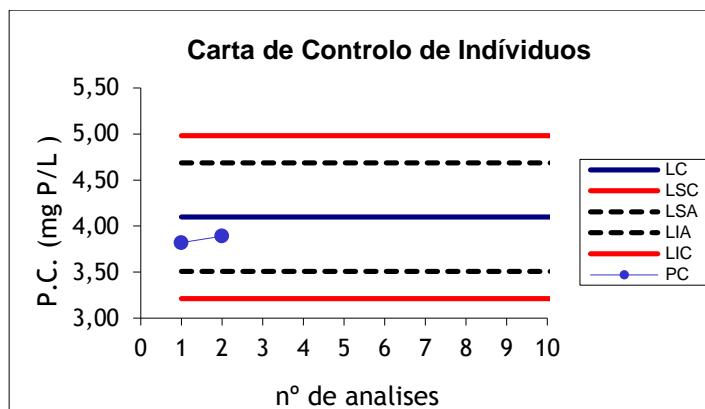


Figura 2.11- Carta de Controlo de indivíduos do padrão 4 mg P/L digerido em rotina.

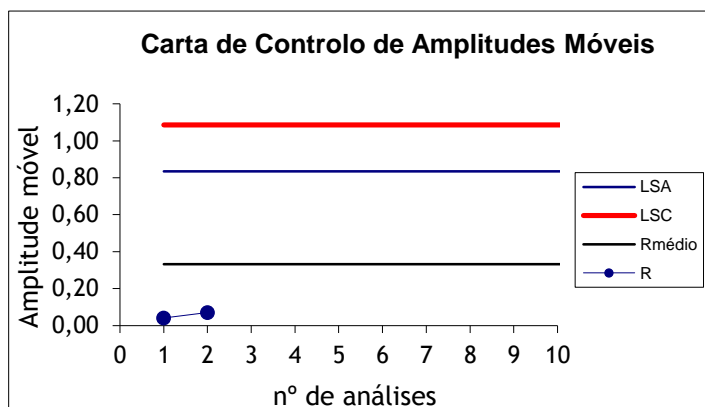


Figura 2.12- Carta de controlo de amplitudes móveis do padrão 4 mg P/L digerido em rotina.

Conclusões:

- Carta de controlo de indivíduos: os dois pontos encontram-se bem ajustados à carta de controlo, apresentando uma boa exatidão, ou seja, as concentrações obtidas não estão muito afastadas do valor teórico de 4 mg P/L.
- Carta de controlo de amplitudes móveis: os dois pontos também encontram-se bem situados e perto de zero o que indica que a diferença entre o valor anterior e o posterior é mínima, existindo uma boa precisão entre os resultados.
- Sendo assim, estes dois pontos podem ser aceites e apresentam-se sobre controlo estatístico, garantindo o controlo da digestão.

IV. Duplicados de amostras

No processo de validação do método, realizaram-se duplicados de 10 amostras, que se encontram na Tabela 2.43.

Tabela 2.43- Concentração das amostras e dos seus duplicados.

Nº da amostra	Amostra (mg P/L)	Duplicado (mg P/L)
1	4,65	4,86
2	3,25	3,12
3	3,01	3,05
4	1,98	2,08
5	2,16	1,98
6	2,00	2,17
7	2,00	2,17
8	3,05	3,10
9	33,9	33,9
10	2,16	2,44

Através dos resultados da tabela anterior, determinaram-se os limites de controlo da carta de amplitudes relativas dos duplicados (Tabela 2.44). Posteriormente fez-se a representação desses pontos com o intuito de averiguar se respeitavam esses limites e portanto se encontravam sob controlo estatístico (Fig. 2.13).

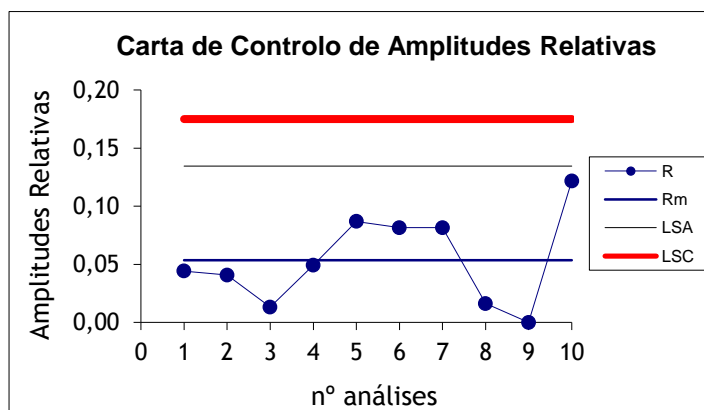


Figura 2.13- Carta de controlo de amplitudes relativas de duplicados obtida na validação.

Tabela 2.44- Dados da carta de controlo de amplitudes relativas dos duplicados.

Limite superior de controlo (LSC)	0,178 mg P/L
Limite superior de aviso (LSA)	0,137 mg P/L
Linha central (LC)	0,054 mg P/L
Limite inferior de controlo e de aviso	0,000 mg P/L

Conclusão da análise da carta:

- Os dez pontos não apresentam nenhuma tendência.
- O nono ponto encontra-se no limite inferior de controlo e de aviso, contudo este valor foi aceite uma vez que o próximo ponto se encontra dentro dos limites da carta.
- Os duplicados das amostras encontram-se sob controlo estatístico.

Analisaram-se duas amostras diferentes com o método em rotina, com concentrações 1,17 e 9,00 mg P/L. Os seus duplicados apresentaram concentrações de 1,17 e 8,96 mg P/L, correspondentemente.

A seguir na Fig. 2.14 estão representados os duplicados realizados na análise das duas amostras.

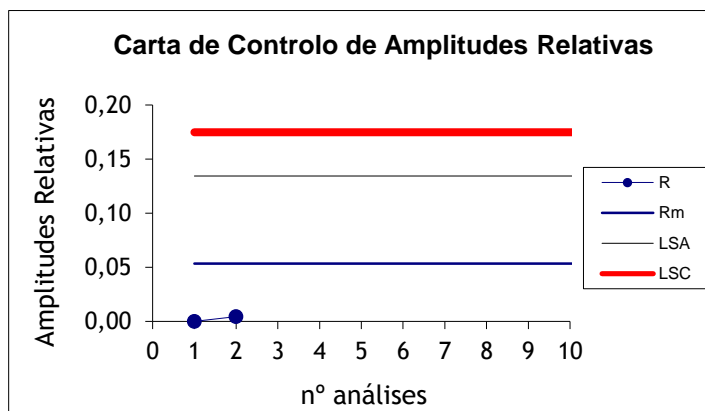


Figura 2.14- Carta de controlo de amplitudes relativas para os duplicados em rotina.

Conclusões:

- Os dois pontos encontram-se entre o limite inferior de controlo e de aviso e a linha central.
- O primeiro ponto encontra-se no limite inferior de controlo e de aviso, esta situação acontece uma vez que a diferença entre a amostra e o duplicado é nula.
- As diferenças dos duplicados relativamente às amostras são aceitáveis e precisas.
- Os duplicados encontram-se sob controlo estatístico.

V. Brancos digeridos

Para detetar possíveis contaminações durante todo o processo realizaram-se brancos digeridos. Estes brancos são analisados como amostras normais com a diferença que são constituídos por 50 mL de água ultrapura de grau 3 em vez da amostra. Na Tabela 2.45 encontram-se as concentrações obtidas de vários brancos do processo durante a validação do método.

Tabela 2.45-Concentrações dos vários brancos do processo.

Branco	Concentração (mg P/L)	Critério de aceitação	Conclusão
1	0,11	<0,30 mg P/L	De acordo
2	0,00		De acordo
3	0,05		De acordo
4	0,13		De acordo
5	0,02		De acordo
6	0,00		De acordo
7	0,02		De acordo
8	0,00		De acordo
9	0,02		De acordo
10	0,03		De acordo
Média	0,04		
Desvio padrão	0,05		

Conclusões:

- Através da Tabela 2.45 verifica-se que os dez brancos estão de acordo com o critério de aceitação de <L.D. = 0,30 mg P/L.
- Verifica-se também que a precisão não foi afetada por contaminações.

Quando o método entrou em rotina realizaram-se dois brancos em que as suas análises encontram-se na Tabela 2.46.

Tabela 2.46- Análise de brancos com o método em rotina.

Branco (mg P/L)	Critério de aceitação	Conclusão
0,02	<0,30 mg P/L	Aceite
0,03		Aceite

Conclusão:

- Os dois valores respeitam o critério de aceitação verificando-se que não existiram contaminações durante a análise das duas amostras.

VI. Recuperação de amostras

Realizou-se a recuperação de duas amostras diferentes com uma concentração de analito nativo de 1,17 e 9,00 mg P/L. Após a fortificação com um padrão de 4 mg P/L obtiveram-se as concentrações de 4,45 e 13,51 mg P/L, correspondentemente.

A Fig. 2.15 representa graficamente os resultados das recuperações, em que os limites correspondem às percentagens de recuperação aceite para um método espectrofotométrico (80% a 120%).

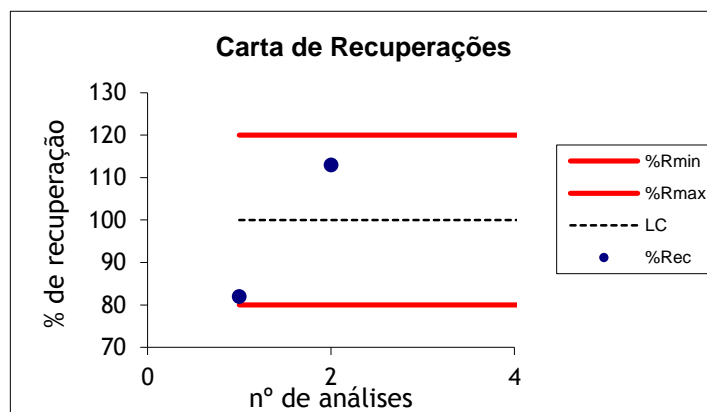


Figura 2.15- Representação gráfica das recuperações do método em rotina.

Conclusões:

- Verifica-se que os dois pontos encontram-se situados entre a percentagem máxima e mínima de recuperação.
- A primeira recuperação foi um pouco baixa cerca de 82% podendo estarem presentes alguns interferentes.
- A segunda recuperação foi mais elevada cerca de 113% o que indica que existiam poucos interferentes na amostra.

VII. Verificação do limite de quantificação

Segundo a Relacre - Validação de métodos internos de ensaio em análise química, após a determinação do L.Q. este deve ser verificado relativamente à exatidão e à precisão. Para tal, o CV e o ER tem de ser menores do que 10%.

Para a verificação do L.Q. realizou-se a leitura do padrão de 1 mg P/L, com lote diferente do padrão da curva de calibração, em cada análise das duas amostras. Na Tabela 2.47 encontram-se as concentrações obtidas, o coeficiente de correlação e a conclusão da análise.

Tabela 2.47- Verificação do L.Q. com o método em rotina.

	Concentração obtida do padrão (mg P/L)	CV (%)	ER %	Critério de aceitação	Conclusão
Amostra 1	0,905	7,1	9,5	CV e ER <10%	De acordo
Amostra 2	0,962	3,0	3,8		De acordo

Da tabela anterior verifica-se que as duas concentrações estão de acordo com o critério de aceitação de CV e ER <10 %. Confirmando-se uma exatidão e precisão satisfatória para o L.Q. de 1 mg P/L.

2.4 Conclusões

O objetivo central deste trabalho consistia na implementação, validação e controlo de qualidade de um método interno para a determinação do fósforo total em águas residuais, através da técnica de espectrofotometria de absorção molecular no UV-VIS. Este objetivo deveu-se à necessidade que a empresa apresentava em ter um método de determinação do fósforo total em águas residuais.

Todas as metodologias referidas anteriormente foram alcançadas através do método de ensaio indicado no SMEWW, 2012 (4500-P), de documentos da Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (Relacre) e pelo Instituto Português de Acreditação (IPAC).

Durante a validação do método interno analisaram-se vários parâmetros podendo-se tirar as seguintes conclusões:

- Gama de trabalho: através do teste de homogeneidade de variâncias, com uma probabilidade de 99%, conclui-se que gama de trabalho é de 1 mg P/L a 15 mg P/L.

- Linearidade: através dos coeficientes de correlação, gráfico de resíduos e pelo teste de linearidade constatou-se que as curvas de calibração são lineares.
- Sensibilidade: por meio da determinação dos declives verificou-se a estabilidade da curva de calibração optando-se por uma calibração periódica.
- Limites analíticos: obteve-se L.Q. de 0,287 mg P/L e um L.D. de 0,095 mg P/L. Contudo, o L.Q. foi majorado ao primeiro padrão da curva de calibração de 1 mg /L, sendo necessário efetuar periodicamente a verificação experimental deste valor.
- Especificidade/seletividade: o método apresenta boa especificidade e seletividade através dos valores obtidos dos testes de recuperação.
- Precisão e exatidão: obteve-se uma precisão e uma exatidão para o padrão de 4 mg P/L não digerido de 0,02 mg P/L e 0,01mg P/L, respetivamente. No caso do padrão de 4 mg P/L digerido o valor da exatidão foi de 0,10 mg P/L e da precisão foi de 0,09 mg P/L. Estes valores estão de acordo com os valores apresentados no Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto, no Anexo XXII.
- Incerteza: os valores obtidos para as diferentes incertezas encontram-se de acordo com as restantes características de desempenho do método.

Após a validação do método conclui-se que o método está apto para entrar em rotina no laboratório, sendo necessário implementar um programa de controlo de qualidade interno e externo. Conclui-se que controlo de qualidade interno é assegurado através:

- Verificação da linearidade e sensibilidade
- Branco digerido
- Padrões de controlo digerido e não digerido
- Duplicados de amostras
- Teste de recuperação (amostras fortificadas)
- Verificação do limite de quantificação

Por sua vez o controlo de qualidade externo é garantido pela participação em ensaios interlaboratoriais e a análise de MRCs.

Em termos pessoais este trabalho enriqueceu-me na temática do controlo de qualidade de processos químicos e ofereceu-me uma visão real sobre as dificuldades e barreiras que existem na implementação e validação de métodos internos.

3 Parâmetros físico-químicos acreditados

3.1 Introdução

Os recursos hídricos não se encontram distribuídos de uma forma homogênea pelo planeta Terra e a maior percentagem da água encontra-se nos oceanos [34]. Cerca de 1 % de toda a água terrestre encontra-se disponível ao ser humano e aos outros organismos, na forma de lagos e rios [35].

Segundo a ONU, 1,1 bilhões de pessoas não têm acesso à água potável e 5 milhões de pessoas morrem por ano devido à má qualidade da água. Este número é dez vezes superior ao número de mortos em guerras, em média, por ano [35].

Através desta realidade tornou-se necessário o controlo de qualidade das águas de consumo humano de forma a garantir a qualidade mínima de acordo com os fins a que se destina [7].

A água está presente no organismo humano numa percentagem de 75-80% em massa, esta também participa em numerosos metabolismos como na digestão, depuração renal, evolução celular e assegura o equilíbrio iónico. Este elemento consegue dissolver substâncias orgânicas, inorgânicas e gases, por isso a água que consumimos apresenta na sua constituição sais minerais e elementos em baixas concentrações, que consoante a sua quantidade favorecem ou desfavorecem o bom funcionamento do organismo [34].

A água destinada ao consumo humano é definida pela legislação portuguesa como, toda a água que no seu estado natural ou após tratamento é destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais. Também é considerada água de consumo humano toda a água que é utilizada na indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias que podem estar em contato com os alimentos exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada [21].

Atualmente em Portugal encontra-se em vigor o Decreto-lei 306/2007, de 27 de Agosto que rege os valores paramétricos dos vários parâmetros para garantir a qualidade da água de consumo humano, estes parâmetros encontram-se no Anexo I nas partes I, II e III, do mesmo Decreto-lei, onde são referenciados os parâmetros microbiológicos, químicos e indicadores, respetivamente. Na Tabela 3.1 encontram-se os vários parâmetros que serão estudados neste trabalho numa água de consumo humano, com os seus respetivos valores paramétricos [7].

Tabela 3.1- Valores paramétricos da água de consumo humano dos parâmetros de estudo [36].

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade
Cor	20	mg/L PtCo
Condutividade	2500	$\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20 °C
pH	$\geq 6,5$ e ≤ 9	Unidades de pH
Cheiro, a 25 °C	3	Fator de diluição
Oxidabilidade	5	mg/L O ₂
Sabor, a 25 °C	3	Fator de diluição
Turvação	4	UNT
Nitratos	25	mg/L NO ₃ ⁻
Nitritos	0,5	mg/L NO ₂ ⁻
Azoto amoniacal	0,05	mg/L NH ₄ ⁺

De acordo com o mesmo Decreto-lei, uma água para consumo humano com boa qualidade deve ser salubre e limpa. Não deve conter nenhum microrganismo, parasita ou substância em concentração que coloque em perigo a saúde humana [36].

Existem diferentes tipos de águas residuais: domésticas, industriais e urbanas. As águas residuais domésticas resultam de instalações residenciais mas, essencialmente provém do metabolismo humano e das atividades domésticas.

Toda a água residual que resulta de atividades que não podem ser classificadas como águas residuais domésticas ou como águas pluviais denominam-se águas residuais industriais. Por sua vez, as águas residuais urbanas advém das águas domésticas ou da mistura desta com águas residuais industriais ou pluviais [11].

Na Tabela 3.2 encontram-se os valores limite de emissão de descarga para os parâmetros que serão analisados neste trabalho numa água residual.

Tabela 3.2- Valores limite de emissão de descarga de águas residuais [11].

Determinação	Valor limite de emissão (decreto-lei nº176/1998)	Unidades
Carência química de oxigénio (CQO)	150	mg O ₂ / L
Carência biológica de oxigénio (CBO ₅)	40	mg O ₂ / L
Sólidos suspensos totais (SST)	60	mg SST/L

3.2 Análise de resultados

Os procedimentos acreditados utilizados para a determinação dos vários parâmetros encontram-se no Anexo 1.

A determinação dos vários parâmetros físico-químicos acreditados foi realizada numa amostra de água para consumo humano e numa amostra de água residual.

Na água para consumo humano efetuaram-se as seguintes determinações: pH, condutividade, turvação, nitratos, oxidabilidade, nitritos, cor, cheiro e sabor e azoto amoniacal.

A carência química de oxigénio (CQO), carência biológica de oxigénio (CBO₅) e sólidos suspensos totais (SST), foram determinadas numa água residual.

3.2.1 Água de consumo humano

3.2.1.1 pH

Esta determinação está subdividida em várias etapas que se encontram descritas a seguir:

I. Calibração analítica do eletrodo de pH

Inicialmente realizou-se a calibração analítica com três soluções padrão de pH = 4,00; 7,00 e 9,22. Na Tabela 3.3 encontram-se indicados os dois critérios que avaliam se a calibração do equipamento foi realizada com sucesso e portanto o equipamento pode ser utilizado na realização das análises.

Tabela 3.3- Critérios da calibração e intervalos de aceitação.

Critérios da calibração	Valor obtido na calibração	Intervalo de aceitação	Conclusão
“slope “	93 % a 19,3 °C	90-100 %	Calibração bem-sucedida
“zero point”	6,76 a 19,3 °C	6,00- 8,00	

II. Leitura da amostra

Relativamente à amostra, uma alíquota da amostra foi colocada num copo, no qual foi introduzido o eletrodo e a sonda de temperatura. Esperou-se que o valor estabiliza-se, obtendo-se um resultado do pH de 6,08 à temperatura de 10,9 °C.

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é assegurado pelo valor do “slope” e do “zero point” da calibração e pela determinação do pH do padrão de controlo de 7,03, obtendo-se o valor de 7,03 a 17 °C.

O valor obtido do padrão de controlo de pH = 7,03 é aceitável se respeitar os limites da carta de controlo de indivíduos do padrão, estando esses limites expressos na Tabela 3.4.

Tabela 3.4- Tabela resumo da carta de indivíduos do padrão controlo de pH = 7,00.

Tipo de parâmetro	Valor de pH	pH obtido do padrão	Conclusão
Limite de controlo superior	7,045		
Limite de aviso superior	7,033		
Linha central	7,011	7,03 a 17 °C	De acordo
Limite de aviso inferior	6,988		
Limite de controlo inferior	6,977		

Através dos valores da Tabela 3.4 pode-se concluir que o valor obtido de 7,03 a 17 °C para o padrão de controlo encontra-se no limite de aviso superior, validando a série de amostras analisadas.

3.2.1.2 Condutividade

A determinação da condutividade envolve a seguinte sequência de passos:

I. Calibração analítica da célula de condutividade

Para a calibração do equipamento utilizaram-se duas soluções padrão de 84 e 1475 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (a 25 °C), obtendo-se uma constante da célula de 1,00 que está compreendida no intervalo de aceitação de 0,70 - 1,30, garantindo que célula de condutividade se encontra nas condições adequadas para prosseguir com o ensaio.

II. Leitura da amostra

Analisou-se a amostra colocando o elétrodo e a sonda de temperatura num copo com a amostra obtendo-se uma condutividade de 112 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura de 20 °C.

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é realizado através da leitura e análise da constante da célula (abordagem feita na calibração) e a leitura do padrão de controlo de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (20 °C).

Na leitura do padrão de controlo de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$ à temperatura de 20 °C, obteve-se o valor de 1279 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (20 °C).

Na Tabela 3.5 estão representados os limites da carta de controlo de indivíduos do padrão de controlo de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$, bem como o resultado obtido para uma fácil análise do mesmo.

Tabela 3.5- Tabela resumo da carta de indivíduos do padrão de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Tipo de parâmetro	Valor $\mu\text{S}/\text{cm}$	Valor obtido do padrão de controlo de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$	Conclusão
Limite de controlo superior	1285,1	1279	De acordo
Limite de aviso superior	1283,2		
Linha central	1279,4		
Limite de aviso inferior	1275,6		
Limite de controlo inferior	1273,6		

Através dos valores da tabela anterior conclui-se que o valor do padrão de controlo obtido de 1279 $\mu\text{S}/\text{cm}$ se encontra próximo da linha central, garantido assim o controlo de qualidade do ensaio.

3.2.1.3 Turvação

Este procedimento envolve os seguintes passos:

I. Leitura das soluções padrão

Primeiramente, realizou-se a leitura do branco e dos padrões de 0,02 UNT e 1000 UNT, obtendo-se 0,02 UNT para o branco e 0,02 UNT e 1002 UNT para os padrões referidos anteriormente. Na Tabela 3.6 encontra-se os valores referidos anteriormente com o intervalo de aceitação e com a conclusão.

Tabela 3.6- Branco e padrões de 0,02 UNT e 1000 UNT.

	Valor obtido	Intervalo de aceitação	Conclusão
Branco	0,02 UNT	$0,02 \pm 0,02$ UNT	Valor aceite
Padrão de 0,02 UNT	0,02 UNT	$0,02 \pm 0,02$ UNT	Valor aceite
Padrão de 1000 UNT	1002 UNT	1000 ± 10 UNT	Valor aceite

Da tabela anterior conclui-se que o valor do branco e dos padrões estão dentro do intervalo de aceitação.

II. Leitura da amostra

Posteriormente fez-se a leitura da amostra, obtendo-se uma turvação $<0,5$ UNT.

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é garantido através da análise do branco e dos padrões 0,02 UNT e 1000 UNT (abordagem analisada no início deste procedimento). Também é utilizada uma solução de hidrazina de 2 UNT que é lida no final do processo. A turvação obtida desta solução foi de 2,02 UNT que se encontra no intervalo de aceitação de $2 \pm 0,2$ UNT.

Em suma, o controlo de qualidade interno realizado valida o resultado da amostra.

3.2.1.4 Nitratos

Esta determinação teve como base as seguintes etapas:

I. Curva de calibração

Para a determinação deste parâmetro procedeu-se à leitura dos padrões de 5 mg/L NO_3^- , 22,15 mg/L NO_3^- e 35 mg/L NO_3^- para a confirmação da curva de calibração. Na Tabela 3.7 encontram-se os valores obtidos com o intervalo de aceitação de cada padrão e com a respetiva conclusão.

Tabela 3.7- Padrões para a verificação da curva de calibração dos nitratos.

Padrão (mg P/L)	Valor obtido (mg/L NO_3^-)	Intervalo de aceitação (mg/L NO_3^-)	Conclusão
5 mg/L NO_3^-	5,2	$5 \pm 0,5$	De acordo
22,15 mg/L NO_3^-	21,9	$22,15 \pm 2$	De acordo
35 mg/L NO_3^-	35,1	35 ± 2	De acordo

Em suma, a curva de calibração está de acordo com os critérios estabelecidos, garantindo a qualidade dos resultados.

II. Leitura da amostra

Na leitura da amostra não foi necessária filtração prévia porque a sua turvação foi <0,5 UNT. Obteve-se a concentração de 0,031 mg/L NO_3^- para o $\lambda = 220$ nm e 0,04 mg/L NO_3^- para o $\lambda = 275$ nm.

Na amostra não se aplica a expressão $2 \times \text{Abs}_{275 \text{ nm}} \leq 0,1 \times \text{Abs}_{220 \text{ nm}}$ uma vez que o valor dos nitratos obtido foi menor do que 5 mg/L NO_3^- .

III. Controlo de qualidade interno

Como controlo de qualidade interno utilizam-se os padrões de 5,00 mg/L NO_3^- , 22,15 mg/L NO_3^- e 35,00 mg/L NO_3^- para a verificação da curva de calibração.

Realiza-se também a leitura do padrão de controlo de 22,15 mg/L NO_3^- em que o lote é diferente do padrão da curva de calibração. Para este padrão obteve-se o valor de 21,90 mg/L NO_3^- que está dentro do seu intervalo de aceitação de $22,15 \pm 2$.

Todos os padrões estão dentro dos intervalos de aceitação, garantido o controlo de qualidade interno.

3.2.1.5 Oxidabilidade

A oxidabilidade engloba os seguintes passos:

I. Padronização do ácido oxálico

Antes da determinação da oxidabilidade da amostra realizou-se a padronização do ácido oxálico. O volume gasto foi de 9,5 mL de permanganato de potássio que está dentro do valor esperado de 10 mL.

II. Leitura da amostra

Relativamente à amostra adicionou-se uma única vez o volume de permanganato de potássio gasto na padronização e o volume gasto na sua titulação foi de 0,3 mL. Sendo assim através da Eq. 3.1 é possível determinar a oxidabilidade da amostra, tendo sido obtida uma oxidabilidade de 0,17 mg/L O₂, este valor é expresso como <1,0 mg/L O₂, que corresponde ao limite de quantificação do método.

$$\text{Oxidabilidade (mg/L O}_2\text{)} = \frac{(1-1) \times 9,5 + 0,2}{9,5} \times 8 = 0,17 \text{ mg/L O}_2 \quad (3.1)$$

III. Controlo de qualidade interno

Como controlo de qualidade interno, titulou-se uma solução de Resorcinol 1 mg/L em que se colocou 100 mL desta solução em vez da amostra. Com esta solução gastou-se 2,3 mL. A sua oxidabilidade é dada pela expressão seguinte:

$$\text{Oxidabilidade (mg/L O}_2\text{)} = \frac{(1-1)9,5 + 2,3}{9,5} \times 8 = 1,9 \text{ mg/L O}_2$$

Esta oxidabilidade encontra-se dentro do intervalo de aceitação estabelecido no laboratório, de 1,63 a 2,04 mg/L O₂.

Realizou-se um branco em que se colocou 100 mL de água ultrapura de grau 3 em vez da amostra, neste caso gatarem-se 0,2 mL de permanganato de potássio. O volume gasto está dentro do limite de aceitação, não podendo o volume ser superior a 0,3 mL.

O valor da oxidabilidade do Resorcinol e do branco permite-nos aceitar o resultado obtido para a amostra.

3.2.1.6 Nitritos

I. Curva de calibração

Inicialmente prepararam-se os vários padrões e leram-se a $\lambda = 543$ nm. Na Tabela 3.8 encontram-se os vários dos padrões e as absorvâncias obtidas.

Tabela 3.8- Padrões da curva de calibração dos nitritos.

Padrão mg/L NO_2^-	Absorvâncias
0	0,000
0,04	0,074
0,1	0,191
0,25	0,479
0,4	0,763
0,6	1,155

Através dos dados da Tabela 3.8 obteve-se a equação da curva de calibração igual a $y = 1,9234 X - 0,0019$ com um coeficiente de correlação de 1. A equação é obtida diretamente do espectrofotómetro de UV-VIS.

II. Leitura da amostra

A amostra apresentou um pH de 6,08 à temperatura de 10,9 °C, não sendo necessário a correção do pH. Também não se realizou a filtração da amostra pois esta não apresentava sólidos suspensos.

Posteriormente realizou-se a leitura da amostra obtendo-se uma concentração de nitritos $< 0,04$ mg/L NO_2^- . De salientar que o resultado reportado como $< 0,04$ corresponde ao limite de quantificação do método.

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é assegurado pelo padrão de controlo de 0,25 mg/L NO_2^- (lote diferente do padrão da curva de calibração), em que se obteve o valor de 0,24 mg/L NO_2^- . Este valor situa-se dentro do intervalo de aceitação de $0,25 \pm 0,025$ mg/L NO_2^- .

3.2.1.7 Cor

Esta determinação consiste nos seguintes passos:

I. Curva de calibração

Para a determinação da cor realizou-se as leituras de vários padrões. Na Tabela 3.9 encontram-se os valores obtidos dos vários padrões para a verificação da curva de calibração com os intervalos de aceitação de cada padrão.

Tabela 3.9- Padrões para a verificação da curva de calibração da cor.

Padrão (mg/L Pt-Co)	Valor obtido (mg/L Pt-Co)	Limites de aceitação	Conclusão
Branco	0	/	/
5 (stock A)	5	5 ± 0 mg/L Pt-Co	Valor aceite
20 (stock A)	19	20 ± 1 mg/L Pt-Co	Valor aceite
40 (stock A)	39	40 ± 2 mg/L Pt-Co	Valor aceite

Pode-se concluir assim que os valores obtidos dos vários padrões se encontram dentro dos intervalos de aceitação, validando a curva de calibração, e prosseguindo com a realização da leitura da amostra.

II. Leitura da amostra

O valor da cor obtido para a amostra foi de <5 mg/L Pt-Co.

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é assegurado através dos padrões de verificação da curva de calibração e do padrão de controlo de 20 mg/L Pt-Co.

Obteve-se uma concentração de 20 mg/L Pt-Co para o padrão de 20 mg/L Pt-Co. O intervalo de aceitação é de 20 ± 1 mg/L Pt-Co. Este padrão encontra-se dentro do intervalo de aceitação e os padrões da curva de calibração também, estando assim garantida a qualidade dos resultados do ensaio.

3.2.1.8 Cheiro e sabor

Na determinação deste parâmetro a temperatura da sala onde se realiza o ensaio tem que ser controlada. Desta forma, colocou-se o laboratório de DPH a uma temperatura de 25°C , sendo esta também a temperatura do banho.

I. Leitura da amostra

Utilizaram-se como padrões do cheiro, a baunilha e o sabor amargo. Realizou-se um branco em que o número limiar é <1 . No caso da amostra adicionaram-se 2 mL de tiosulfato de sódio a 3,5% para corrigir o cloro da água. Como não se detetaram diferenças ao nível do sabor e do cheiro comparativamente com a água de referência, atribui-se o número limiar <1 para o cheiro e para o sabor.

II. Controlo de qualidade interno

O controlo foi assegurado pela utilização do branco, pelo padrão de cheiro a baunilha e sabor amargo.

3.2.1.9 Azoto amoniacal

Este parâmetro engloba as seguintes etapas:

I. Curva de calibração

Para este parâmetro é necessário a realização de uma curva de calibração com recurso a vários padrões. Na Tabela 3.10 encontram-se os padrões e as respetivas absorvâncias obtidas.

Tabela 3.10- Padrões da curva de calibração do azoto amoniacal.

Padrão (mg/L NH_4^+)	Absorvância
0	0,000
0,04	0,037
0,1	0,066
0,25	0,192
0,4	0,304
0,6	0,445

Obteve-se uma equação da curva de calibração igual a $y = 0,7454 X + 0,0013$ com um coeficiente de correlação de 0,9988 que é superior a 0,995. Esta curva é obtida diretamente no espectrofotómetro de UV-VIS.

II. Leitura da amostra

Após a obtenção da equação da curva de calibração leu-se a amostra obtendo-se uma concentração de 0,04 mg/L NH_4^+ .

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é assegurado através do padrão de controlo de 0,25 mg/L NH_4^+ , tendo sido obtido o valor de 0,24 mg/L NH_4^+ . O valor obtido está compreendido no intervalo de aceitação de $0,25 \pm 0,025$ mg/L NH_4^+ . Assegurando o controlo de qualidade interno.

3.2.2 Água residual

Nesta amostra, como já foi referido anteriormente, foram determinados os seguintes parâmetros: CQO, CBO₅ e SST. Estas determinações foram realizadas através de procedimentos que se encontram acreditados.

3.2.2.1 Carência química de oxigénio, (CQO)

Esta determinação tem como base as seguintes etapas:

I. Padronização do sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado

Inicialmente realizou-se a padronização do sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado, em que se gastou 21,42 mL sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado. Através da expressão abaixo obtém-se uma concentração para o sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado de 0,112 mol/L.

$$C = \frac{2,4}{V} = 0,112 \text{ mol/L}$$

II. Leitura da amostra

No caso da amostra em estudo, foi necessário realizar uma diluição de 1/5. O volume de titulante gasto situou-se nos 9,62 mL.

A determinação do CQO da amostra encontra-se a seguir:

$$\text{CQO (mg/L O}_2\text{)} = \frac{8000 \times C \times (v_1 - v_2)}{V_0} = \frac{8000 \times 0,112 \times (10,12 - 9,62)}{10} = 44,8 \text{ mg/L O}_2$$

em que:

C- Concentração, em molaridade do sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado;

V₀- Volume de amostra (mL);

V₁- Volume de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado gasto na titulação do branco (mL);

V₂- volume de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado gasto na titulação da amostra (mL).

O valor obtido é de 44,8 mg/L O₂ mas como a amostra foi diluída de 1/5 é necessário aplicar o fator de diluição de 5, obtendo-se um CQO de 224 mg/L O₂.

III. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade realizado é o seguinte:

- O volume de branco gasto foi de 10,12 mL de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado.
- Um padrão de controlo que usa uma solução de hidrogenoftalato de potássio 2,0824 M, em que se gastou 4,70 mL de titulante. O valor de CQO é determinado seguindo o mesmo raciocínio no caso da amostra.

$$\text{CQO (mg/L O}_2\text{)} = \frac{8000 \times 0,112 \times (10,12 - 4,70)}{10} = 485,6 \text{ mg/L O}_2$$

Este valor encontra-se dentro do intervalo de aceitação (500 ± 25 mg/L de O_2) para este padrão de controlo.

3.2.2.2 Carência bioquímica de oxigénio, (CBO_5)

O CBO_5 é determinado através dos seguintes passos:

I. Leitura da amostra

A amostra apresentou um pH de 7,2 não sendo necessário ajuste. O valor do CQO da amostra foi de 224 mg/L O_2 , ou seja, o valor de CBO_5 esperado é cerca de 80% de 224 mg/L O_2 que é igual a 178 mg/L O_2 .

Consultando a Tabela 3 do Anexo 1 verifica-se que o volume de amostra a utilizar é de 244 mL e que o volume de alitiourea (ATU) é de 0,5 mL. Após cinco dias o valor de CBO_5 que obteve-se da amostra foi de 96 mg/L O_2 .

II. Controlo de qualidade interno

Como controlo de qualidade interno realizou-se a determinação do CBO_5 do padrão de controlo de glucose-ácido glutâmico obtendo-se um CBO_5 de 168 mg/L O_2 . O intervalo de aceitação é de $198 \pm 30,5$ mg/L O_2 . O valor de CBO_5 obtido encontra-se dentro do intervalo de aceitação.

3.2.2.3 Sólidos suspensos totais, (SST)

Esta determinação teve os seguintes passos:

Inicialmente identificaram-se os vidros de relógio, colocam-se os filtros de fibra de vidro e levaram-se à estufa a 103°C durante 1h. Posteriormente, retirou-se o conjunto da estufa e colocou-se no exsiccador. Deixou-se arrefecer e registou-se a massa do conjunto.

I. Leitura da amostra e do padrão de controlo

Relativamente à amostra mediram-se 25 mL e filtrou-se, levando o conjunto à estufa a 103°C durante 1 h. Retirou-se e deixou-se arrefecer no excitador e por fim registou-se a massa. De seguida levou-se novamente o conjunto à estufa durante 30 min para verificar a estabilidade da massa. As diferenças das massas devem ser menor do que 0,5 mg. O mesmo procedimento é realizado com o padrão de controlo, filtrando-se 250 mL do padrão.

Na Tabela 3.11 encontram-se as massas obtidas dos vários conjuntos, nas diferentes fases do processo.

Tabela 3.11- Massas dos conjuntos de amostra e do padrão de controlo.

	Conjuntos	Massas (g)	Diferença de massas (g)
Amostra	Massa do vidro de relógio + filtro após 1h na estufa a 103°C	17,0898	0,0002
	Massa do vidro de relógio + filtro + amostra após 1h na estufa a 103 °C	17,0960	
	Massa do vidro de relógio + filtro + amostra após 1h + 30 min na estufa	17,0958	
Padrão controlo	Massa do vidro de relógio + filtro após 1h na estufa a 103°C	16,4300	0,0001
	Massa do vidro de relógio + filtro + padrão de controlo após 1h na estufa a 103°C	16,5069	
	Massa do vidro de relógio + filtro + padrão de controlo após 1h + 30 min na estufa a 103°C	16,5068	

Através da tabela anterior verifica-se que a diferença de massas da amostra e do padrão de controlo respeita o critério de aceitação indicado no método, ou seja, de serem menores do que 0,5 mg confirmando a estabilização dos conjuntos.

Outro requisito deste ensaio é que a massa de resíduo obtido da amostra no final do processo esteja compreendida entre 2,5 e 200 mg. A massa do resíduo da amostra obtida é dada pela diferença das massas do conjunto sem amostra com o conjunto com amostra obtendo-se 6 mg de resíduo.

O cálculo dos sólidos suspensos totais da amostra é determinado através da equação seguinte:

$$\text{mg SST/ L} = \frac{(A-B) \times 1000}{V} \times 1000 = 240 \text{ mg SST/L}$$

onde:

A- peso do filtro + vidro de relógio (g) + peso do resíduo seco da amostra (g);

B- peso do filtro (g) + vidro de relógio (g);

V- volume da amostra (mL).

A massa de sólidos suspensos totais do padrão de controlo é determinada a seguir:

$$\text{mg SST/ L} = \frac{(A-B) \times 1000}{V} \times 1000 = 307,2 \text{ mg/L O}_2$$

Este valor está dentro do intervalo de aceitação de 300 ± 15 mg/L de SST para esta solução, assegurando o controlo de qualidade.

3.3 Conclusões

I. Água de consumo humano

Através do decreto-lei nº 306/2007, 27 de Agosto é possível concluir se os valores dos vários parâmetros físico-químicos determinados na água de consumo humano estão de acordo com os valores paramétricos indicados na legislação para cada um dos parâmetros analisados.

Na Tabela 3.12 encontram-se os valores obtidos na determinação dos vários parâmetros e encontram-se também o respetivo valor paramétrico.

Tabela 3.12- Valores obtidos na análise à água de consumo humano.

Parâmetro	Valor obtido	Valor paramétrico (decreto-lei nº306/2007)	Conclusão
pH	6,80 (10,9 °C)	$\geq 6,5$ e ≤ 9	De acordo
Condutividade	112 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (20 °C)	2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (20 °C)	De acordo
Turvação	<0,5 UNT	4 UNT	De acordo
Azoto amoniacal	<0,04 mg/L NH_4^+	0,05 mg /L NH_4^+	De acordo
Oxidabilidade	<1,0 mg/L O_2	5 mg/L O_2	De acordo
Cor	<5 mg/L Pt-Co	20 mg/L Pt-Co	De acordo
Nitratos	<5 mg/L NO_3^-	25 mg/ L NO_3^-	De acordo
Cheiro e sabor	Número limiar <1	3 Fator de diluição	De acordo
Nitritos	<0,04 mg/L NO_2^-	0,5 mg/ L NO_2^-	De acordo

Através da tabela anterior conclui-se que esta água cumpre os valores paramétricos dos vários parâmetros analisados.

II. Água residual

Para analisar os valores obtidos utiliza-se o Decreto-lei nº 236/1998, de 1 de Agosto que descreve os valores limite de emissão de descarga de águas residuais. Na Tabela 3.13 encontram-se os valores obtidos e o limite de emissão na descarga estabelecido pelo Decreto-lei nº 236/1998.

Tabela 3.13- Valores dos parâmetros obtidos da água residual.

Determinação	Valor obtido	Valor limite de emissão (decreto-lei nº 236/1998)	Conclusão
Carência química de oxigénio (CQO)	224 mg O_2 / L	150 mg O_2 / L	Não conforme
Carência biológica de oxigénio (CBO_5)	96 mg O_2 / L	40 mg O_2 / L	Não conforme
Sólidos suspensos totais (SST)	240 mg SST/L	60 mg SST/L	Não conforme

Através da tabela anterior observa-se que a água residual não pode ser descarregada nos recursos hídricos pois, os valores obtidos encontram-se acima dos valores estabelecidos no Decreto-lei.

4 Perspetivas futuras

Como perspetivas futuras, de forma a completar este trabalho podem-se salientar:

- Acreditar o método do fósforo total em águas residuais pelo IPAC;
- Construir uma gama de trabalho para a determinação de fósforo total em águas residuais com elevada concentração de fósforo total (águas lixiviadas);
- Utilizar um padrão de fósforo orgânico que permita controlar a digestão dos fosfatos na forma orgânica, dada a importância da garantia de qualidade dos resultados analíticos;
- Participar num ensaio interlaboratorial.

Fora do contexto do fósforo total em águas residuais, poder-se-ia adaptar este método para outras matrizes como por exemplo em fertilizantes e detergentes, uma vez que estes, são dois dos poluentes que dão origem a elevadas concentrações de fósforo em águas.

Outro aspeto inicialmente previsto e que ficou por concretizar, devido à escassez de tempo, foi a determinação do fósforo em produtos cárneos. Como perspetiva futura, prevê-se a implementação do método e respetiva validação.

Referências bibliográficas

- [1] F. Mendonça, *Avaliação dos Métodos Colorimétrico e Espectrométrico (ICP-OES) na Determinação de Fósforo Total em Amostras Ambientais*, Santo André: Universidade Federal do ABC, 2013.
- [2] V. J. G. Emídio, *A Problemática do Fósforo nas Águas para Consumo Humano e Águas Residuais e Soluções para o Seu Tratamento*, Algarve: Universidade do Algarve, 2012.
- [3] R. L. M. Fão, *Avaliação da Qualidade da Água de Pisciculturas: Sustentabilidade Ambiental e Tipo de Exploração*, Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2013.
- [4] E. S. Heidrich, T. P. Curtis e J. Dolfig, "Determination of the Internal Chemical Energy of Wastewater," *Environmental Science and Technology*, vol. 45, pp. 827-832, 2011.
- [5] APHA, AWWA e WEF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed., E. W. Rice, R. B. Baird, A. D. Eaton e L. S. Clesceri, Eds., Washington D. C.: American Public Health Association, 2012.
- [6] H. Gharibi, A. H. Mahvi, R. Nabizadeh, H. Arabalibeik, M. Yunesian e M. H. Sowlat, "A Novel Approach in Water Quality Assessment Based on Fuzzy Logic," *Journal of Environmental Management*, vol. 112, pp. 87-95, 2012.
- [7] S. C. P. Ferreira, *Relatório de Atividade Profissional Implementação e Validação de um Método para Determinação de Bromatos em Águas de Consumo humano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção UV e Adição de Reagente Pós-Coluna*, Covilhã: Universidade da Beira Interior, 2013.
- [8] S. Faridmarandi e G. M. Naja, "Phosphorus and Water Budgets in an Agricultural Basin," *Environmental Science and Technology*, vol. 48, pp. 8481-8490, 2014.
- [9] R. P. S. L. Luizi, *Operação de Sistmas de Tratamento de Águas Residuais por Lamas Activadas com Arejamento Prolongado*, Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2012.
- [10] B. A. C. Coelho, *Estudo do tratamento de Águas Residuais Urbanas*, Porto: Universidade do Porto, 2008.
- [11] Decreto-Lei nº 236/98, "Ministério do Ambiente," em *Diário da República*, 1998, pp. 3676-3722.

- [12] M. G. Trevisan e R. J. Poppi, “Química Analítica de Processos,” *Química Nova*, vol. 29, pp. 1065-1071, 2006.
- [13] J. A. Nascimento, A. G. G. Dionísio, E. C. L. Nascimento, K. S. B. Freitas e M. C. U. Araújo, “Análise Screening de Vinhos Empregando um Analisador Fluxo-Batelada, Espectroscopia UV-VIS e Quimiometria,” *Química Nova*, vol. 33, pp. 351-357, 2010.
- [14] J. M. G. Martinho, “Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível,” Lisboa, 1994, pp. 44-48.
- [15] C. M. Bossu, A. R. A. Nogueira e E. C. Ferreira, “Proposta de Experimento Didático: Espectrofotometria de Absorção Molecular,” em *Congresso de Iniciação Científica*, São Carlos, 2006.
- [16] CGAL/SDA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Guia de Validação e Controlo de Qualidade Analítica, 1ª ed., Brasília, 2011.
- [17] Guia Relacre nº13, Validação de Métodos Internos de Ensaios em Análise Química, Fevereiro de 2000 ed., Lisboa, 2000.
- [18] A. S. E. Rocha, *Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo ICP-MS: Implementação e Validação de um Método para a Determinação de Metais em Águas para Consumo Humano*, Covilhã: Universidade da Beira Interior, 2009.
- [19] F. A. d. L. Ribeiro, M. M. C. Ferreira, S. C. Morano, L. R. Silva e R. P. Schneider, “Planilha de Validação: Uma Nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na Validação de Métodos Analíticos Univariados,” *Química Nova*, vol. 31, pp. 164-171, 2008.
- [20] N. M. Brito, O. P. A. Junior e M. L. Ribeiro, “Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão,” *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, vol. 13, pp. 129-146, 2003.
- [21] R. A. P. C. C. Espiga, *Relatório de Atividade Profissional Implementação e Validação de um Método para Determinação de Cianetos Totais em Águas de Consumo Humano por Análise de Fluxo Segmentado*, Covilhã: Universidade da Beira Interior, 2013.
- [22] T. M. P. Figueiredo, *Validação de Métodos Analíticos: Determinação do Teor de Açúcar numa Amostra de Produto Alimentar*, Coimbra: Universidade de Coimbra, 2012.
- [23] O. P. d. A. Junior, E. P. A. Caldas, N. M. Brito, T. C. R. Santos e M. L. B. F. Vale, “Validação de Métodos Analíticos: uma breve revisão,” *Caderno de Pesquisa*, vol. 12, pp.

116-131, Janeiro / Dezembro 2001.

- [24] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins e I. C. S. F. Jardim, “Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos,” *Química Nova*, vol. 27, pp. 771-780, 2004.
- [25] Guia Relacre nº 3, Validação de Resultados em Laboratórios Químicos, Janeiro de 96 ed., Lisboa, 1996.
- [26] Eurachem/CITAC, Guia Eurachem/CITAC - Quantificação da Incerteza nas Medições Analíticas, 2ª ed., 2001.
- [27] OCG007, Instituto Português de Acreditação: Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaio Químicos, IPAC, 2007.
- [28] CITAC/Eurochem, CITAC/Eurochem Guide - Guide to Quality in Analytical Chemistry, CITAC and Eurochem , 2002.
- [29] OGC002, Instituto Português de Acreditação: Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos, IPAC, 2011.
- [30] C. I. P. Duarte, *Implementação do Sistema de Gestão da Qualidade NP EN ISO 9001:2008 numa Indústria de Produção de Presunto*, Lisboa: Universidade Nova de Lisboa, 2012.
- [31] N. S. A. Santos, *Controlo de Qualidade em Laboratório de Ensaio*, Viseu: Instituto Politécnico de Viseu, 2011.
- [32] Guia Relacre nº 9, Alguns Exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química, Lisboa, 1998.
- [33] M. Rodrigues, *Aplicabilidade das Cartas de Controlo ao Processo Produtivo dos Farolins*, Setúbal: Escola Superior de Tecnologia, 2012.
- [34] J. M. S. C. D. Coimbra, *Controlo de Qualidade Aplicado à Análise de Água de Consumo por ICP-MS*, Aveiro: Universidade de Aveiro, 2007.
- [35] A. Azizullah, M. N. K. Khattak, P. Richter e D. P. Häder, “Water Pollution in Pakistan and its Impact on Public Health - A review,” *Environment International*, vol. 37, pp. 479-497, 2011.
- [36] Decreto-Lei nº 306/2007, “Ministério do Ambiente do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional,” em *Diário da República*, 2007, pp. 5747-5765.

[37] A. M. J. Perdigão, *Controlo da Qualidade e Análise de Águas de Consumo Humano*, Aveiro: Universidade de Aveiro, 2011.

[38] ISO 5667-3, *Preservation and Handling of Water Samples*, 4 th ed., Switzerland, 2012.

Anexo 1: Procedimentos

A. Determinação do pH

I. Material / equipamento

Neste trabalho prático além do material corrente de laboratório é necessário algum material mais específico:

- Medidor de pH, marca Consort modelo C 861
- Sonda da temperatura
- Placa de agitação, marca VWR Advance

II. Calibração do equipamento

Antes da realização da medição do pH da amostra é necessário proceder à calibração do medidor de pH, utilizando-se três soluções padrão de pH = 4,00; 7,00 e 9,22.

- Padrão de pH = 4,00; marca Scharlab
- Padrão de pH= 7,00; marca VWR BDH Prolabo
- Padrão de pH= 9,22; marca Scharlab

Ligar o aparelho e de seguida carregar em “Mode” e seleccionar “pH” carregando em “cal”.

De seguida colocar a solução de pH que o aparelho pede juntamente com a sonda de temperatura. Carregar em “Cal” e esperar que o valor do pH apareça no visor. Posteriormente, retirar o eléctrodo de pH e a sonda da temperatura da solução, passando três vezes por água ultrapura de grau 3. Este procedimento é repetido da mesma forma para as outras duas soluções de calibração passando a sonda e o eléctrodo por água ultrapura de grau 3 entre as várias calibrações.

III. Determinação do pH da amostra

Colocar o eléctrodo de pH e a sonda da temperatura no copo da amostra. Verificar se o eléctrodo e a sonda encontram-se perfeitamente mergulhados na amostra. Aguardar até que o valor do pH estabilizasse (o ponto localizado no ecrã do aparelho deixa de piscar). Registar o valor de pH e da temperatura.

No final o eléctrodo e a sonda são limpos com água ultrapura de grau 3 e posteriormente guarda-se o eléctrodo numa solução de armazenamento.

IV. Expressão de resultados

O resultado é arredondado às décimas.

V. Controlo de qualidade interno

Regista-se o valor de “slope” e do “zero point”. Em que o valor de “slope” é aceite se estiver no intervalo de 90 a 100 % e no caso do “zero point” o intervalo de aceitação é 6,00 e 8,00.

Realizar a leitura da solução padrão de controlo a pH= 7,03 à temperatura de 20 °C que tem um lote diferente do padrão de calibração. O valor do padrão deve estar dentro dos valores limites estabelecidos na carta de controlo de indivíduos do padrão de pH= 7,03.

A cada 20 amostras realizar um duplicado que deve estar de acordo com a carta de precisão do pH.

B. Determinação da condutividade

I. Material /equipamento

Para este trabalho prático utiliza-se algum equipamento mais específico para a quantificação, além do material corrente do laboratório:

Aparelho, marca Consort modelo C861
Sonda da temperatura
Eléctrodo de condutividade

II. Calibração do equipamento

A calibração do equipamento utiliza as seguintes soluções e o seguinte procedimento:

Solução padrão com condutividade de 84 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C, Hanna instruments
Solução padrão com condutividade de 1473 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C, Scharlau

Ligar o equipamento e carregar em “Mode” de seguida escolher “ $\mu\text{S}/\text{cm}$ ” e posteriormente pressionar “cal”.

O aparelho pedirá a solução padrão de 84 $\mu\text{S}/\text{cm}$, colocar o eléctrodo e a sonda de temperatura. Carregar em “cal” para proceder à leitura. Retirar o eléctrodo e sonda de temperatura e passar por água ultrapura de grau 3. Entretanto, o aparelho pedirá o segundo padrão de 1473 $\mu\text{S}/\text{cm}$, procede-se da mesma forma como no padrão anterior.

III. Leitura da amostra

Colocar o eléctrodo e a sonda de temperatura na amostra e aguardar até que o valor de condutividade estabilize (o ponto deixa de piscar).

IV. Expressão de resultados

O resultado é apresentado em $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20°C.

Se o resultado for menor do que 190 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o resultado é arredondado à unidade.

Se maior ou igual do que 190 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e menor do que 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ os resultados são apresentados como estão no ecrã.

V. Controlo de qualidade interno

Proceder à leitura de um padrão de controlo de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20 °C e verificar a constante da célula. A constante da célula deve situar-se entre 0,70 e 1,30. Relativamente ao padrão de controlo de 1278 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 20 °C o valor obtido deve estar dentro dos valores limites estabelecidos na carta de controlo de indivíduos do padrão.

Por cada série realiza-se uma determinação em duplicado.

C. Determinação da turvação

I. Material/ equipamento

Neste trabalho prático além do material corrente de laboratório é necessário algum equipamento e material mais específico:

Turbidímetro, marca Merck modelo Turbiquant 1500 IR
Cuvette de leitura do turbidímetro, marca Merck

II. Reagentes e preparação de soluções

Para verificação do funcionamento do turbidímetro, prepara-se a solução padrão de hidrazina de 2 NTU:

Hexametenotetramina, $C_6H_{12}N_4$, $M = 140,19 \text{ g/mol}$, marca Merck
Sulfato de hidrazina, $N_2H_6SO_4$, $M = 130,11 \text{ g/mol}$, marca Merck

Dissolver 5,0 g de hexametenotetramina em 40 mL de água ultrapura de grau 3. Dissolver 0,5 g de sulfato de hidrazina em 40 mL de água ultrapura de grau 3. No manuseamento do sulfato de hidrazina é necessário ter cuidado pois esta substância é venenosa e cancerígena. Para tal é necessário usar luvas e trabalhar na hotte.

Transferir as duas soluções para um balão volumétrico de 100 mL e perfazer o volume com água ultrapura de grau 3. Deixar em repouso no escuro durante 24 h a $25^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$. Por último, pipetar 10 mL da solução anterior para um balão de 100 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

III. Procedimento

Ligar o aparelho 30 minutos antes do ensaio e verificar, se a cuvette está limpa. Observar, se no visor aparece alguma indicação referente à necessidade da realização da calibração, se tal acontecer realizar a leitura dos padrões de 0,10 e 1000 NTU.

De seguida proceder à leitura da amostra, enchendo a cuvette com cerca de 30 mL de amostra, tendo cuidado com a formação das bolhas de ar. Colocar a tampa preta na cuvette e verificar, se o exterior da célula está limpo e seco.

Inserir a cuvette no equipamento, tendo o cuidado de alinhar a marca do anel da tampa, com o marcador que se encontra no equipamento. Esperar 30 segundos para ocorrer a estabilização do resultado. No final da análise lavar a célula com detergente e passar por água ultrapura de grau 3. Colocar a cuvette vazia com a tampa dentro do aparelho para evitar a entrada de pó.

IV. Expressão de resultados

Expresso até as décimas com a unidade de UNT. No caso de valores inferiores a 0,5 UNT expressar <0,5 UNT.

V. Controlo de qualidade interno

No início da determinação realizar a leitura dos padrões de 0,02 UNT, 1000 UNT e de um branco com água ultrapura de grau 3. O intervalo de aceitação dos padrões de 0,02 UNT, 1000

UNT e do branco são: $0,02 \pm 0,02$ UNT, 1000 ± 10 UNT e $0,02 \pm 0,02$ UNT, correspondentemente.

Em cada série realiza-se um duplicado. A diferença entre os duplicados deve ser $<5\%$.

No final da determinação, realizar a leitura do padrão de hidrazina de 2 UNT. O valor deve ser $2 \pm 0,2$ UNT.

D. Determinação de nitratos

I. Material/equipamento

Para esta determinação usa-se como equipamento específico: um espectrofotómetro UV-VIS, da marca Hach modelo Lange DR 5000, uma cuvette de quartzo com 1 cm da marca Hellma Analytics.

II. Reagentes e preparação de soluções

Os reagentes necessários para a preparação das várias soluções utilizadas neste método e o seu modo de preparação encontram-se abaixo:

Nitrato de potássio (Stock A), KNO_3 , 99,6% (m/m), $M = 101,10 \text{ g/mol}$, VWR BDH Prolabo, Lote: 11J140015

Clorofórmio, CHCl_3 , $M = 119,38 \text{ g/mol}$, $d = 1,48 \text{ Kg/L}$, 99,3% (v/v), VWR BDH Prolabo

Nitrato de potássio (Stock B), KNO_3 , $M = 101,10 \text{ g/mol}$, VWR BDH Prolabo, Lote: 11P140015

Ácido clorídrico, HCl , $M = 36.46 \text{ g/mol}$, 37% (m/v), Fisher Chemical

Solução padrão 1N de ácido clorídrico: Medir 82,8 mL de ácido clorídrico concentrado para um balão de 1000 mL e perfazer o volume com água ultrapura de grau 3.

Solução padrão de nitratos stock A: pesar 0,7218 g de nitrato de potássio colocar num balão de 1000 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Preservar com 2 mL de clorofórmio por litro. A validade é de 6 meses.

Solução padrão de nitratos stock B: pesar 0,7218 g de nitrato de potássio (com lote diferente do utilizado na preparação da solução de nitrato stock A) colocar num balão de 1000 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Preservar com 2 mL de clorofórmio por litro. A solução tem uma validade de 6 meses.

Solução padrão de nitratos de concentração 22,15 mg/L NO_3^- : pipetar 2,5 mL da solução padrão de nitratos do stock A para um balão de 50 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução padrão de nitratos 5,0 mg/L NO_3^- : esta solução é preparada a partir da solução padrão de nitratos de stock A. Pipetar 565 μL da solução anterior para um balão de 50 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução padrão de nitratos 35,0 mg/L NO_3^- : Pipetar 4,0 mL da solução padrão de nitratos do stock A para um balão de 50 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução padrão de 22,15 mg/L NO_3^- (padrão de controlo): pipetar 2,5 mL da solução de nitratos de stock B para um balão de 50 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

III. Curva de calibração

Ligar o espectrofotómetro seleccionar a opção “programas favoritos” e depois “nitratos po_79”. Este programa contém uma curva de calibração já definida, sendo só necessário a verificação da mesma. Para a verificação usar os padrões de 5,0 mg/L NO_3^- , 22,15 mg/L NO_3^- e 35,0 mg/L NO_3^- .

IV. Procedimento da amostra

Para a determinação dos nitratos nas amostras, é necessário efetuar a determinação da sua turvação. Se o valor da turvação for $> 0,5$ NTU as amostras devem ser filtradas previamente através de um filtro de $0,45\ \mu\text{m}$.

Realizar a leitura do branco, enchendo a célula com água ultrapura de grau 3, colocar posteriormente a célula no suporte e fechar a tampa do espectrofotómetro, carregar em zero. O zero e a amostra são lidas a 220 e 275 nm.

Relativamente à amostra colocar 50 mL num balão volumétrico de 50 mL e adicionar 1 mL de solução padrão ácido clorídrico 1,0 N, e agitar. Registrar o resultado.

V. Expressão de resultados

Os resultados são arredondados às unidades e expressos em mg/L NO_3^- . Se o valor for inferior a 5 mg/L representa-se como $<5\ \text{mg/L NO}_3^-$.

VI. Controlo de qualidade interno

Realizar a leitura dos padrões de 5,0 mg/L NO_3^- , 22,15 mg/L NO_3^- e 35,0 mg/L NO_3^- para a verificação da curva de calibração já estabelecida. Os valores são aceites se forem $5,0 \pm 0,5\ \text{mg/L NO}_3^-$, $22,15 \pm 2\ \text{mg/L NO}_3^-$ e $35,0 \pm 2\ \text{mg/L NO}_3^-$.

Realizar a leitura de uma solução padrão de 22,15 mg/L NO_3^- com lote diferente ao da curva de calibração. O valor é aceite se for $22,15 \pm 2\ \text{mg/L NO}_3^-$.

Para que o resultado seja válido através deste método deve-se verificar a seguinte condição:

$$2 \times \text{Abs } 275\ \text{nm} \leq 0,1 \times \text{Abs } 220\ \text{nm} \quad (1)$$

Caso não se verifique, o ensaio deve ser efetuado por outro método.

Em cada série de amostras é efetuado um duplicado ou a cada 20 amostras. A diferença entre os duplicados não deve ser $>5\%$.

E. Determinação da oxidabilidade

I. Material/ equipamento

Neste trabalho prático o material necessário é:

Placa de aquecimento, VWR Advanced
Bureta volumétrica em décimos de mL

II. Reagentes e preparação de soluções

Os vários reagentes a utilizar e as suas preparações encontram-se a seguir:

Ácido sulfúrico concentrado, 95% (v/v), $d = 1,84 \text{ Kg/L}$, VWR BDH Prolabo

Permanganato de potássio, 99% (m/m), $M = 158,04 \text{ g/mol}$, Scharlau

Ácido oxálico, 99,5% (v/v), $M = 126,07 \text{ g/mol}$, Scharlau

Resorcinol, 99,8% (m/m), $M = 110,11 \text{ g/mol}$, VWR BDH Prolabo

Solução de permanganato de potássio 0,01 N: Dissolver 0,158 g de permanganato de potássio em água ultrapura de grau 3 num balão de 500 mL.

Solução de ácido oxálico 0,01 N: Preparação feita na hotte. Num balão volumétrico de 250 mL dissolver 0,1575 g de ácido oxálico numa solução de 12,5 mL de ácido sulfúrico concentrado mais 225 mL de água ultrapura de grau 3. Posteriormente arrefecer e perfazer o volume final com água ultrapura de grau 3.

Solução de Resorcinol 1mg/L: Pesar 0,25 g de resorcinol para um balão de 1000 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Agitar bem até completa dissolução. Pipetar 25 mL desta solução para um balão de 250 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Em seguida, pipetar 4 mL da solução anterior para um balão de 100 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução de ácido sulfúrico 1:3: Adicionar na hotte, um volume de ácido sulfúrico concentrado a três volumes de água ultrapura de grau 3.

III. Lavagem do material

Inicialmente é necessário preparar o material de vidro através de uma lavagem. Medir 100 mL de água ultrapura de grau 3 e colocar no erlenmeyer. Adicionar 10 mL de ácido sulfúrico 1:3 e agitar. De seguida adicionar 5 mL de permanganato de potássio e agitar novamente.

Colocar previamente alguns pedaços de porcelana e colocar o erlenmeyer na placa de aquecimento. Esperar que ocorra a ebulição depois contar 10 min. Agitar o erlenmeyer durante a ebulição de modo a destruir toda a matéria orgânica existente nas paredes do erlenmeyer.

Retirar da placa de aquecimento e adicionar 5 mL de ácido oxálico até desaparecer a cor rosa. De seguida titular com permanganato até ao aparecimento da coloração rosa persistente. O erlenmeyer é esvaziado somente no momento da utilização.

IV. Padronização do ácido oxálico

Determinar o volume de permanganato de potássio necessário para titular 10 mL de ácido oxálico. Para tal, pipetar para um erlenmeyer após a sua limpeza, sem esvaziar o conteúdo, 10 mL de ácido oxálico e titular com a solução de permanganato. Registar o valor do volume gasto. O volume de permanganato de potássio gasto não deve ser superior a 10 mL.

V. Procedimento da amostra

Medir 100 mL de amostra para o erlenmeyer previamente limpo e adicionar 10 mL de ácido sulfúrico 1:3 e o volume de permanganato de potássio usado na padronização. Colocar os erlenmeyer na placa com os pedaços de porcelana e aquecer até à sua ebulição que se mantém durante 10 minutos.

Durante a ebulição a solução no erlenmeyer deve se manter cor rosa, caso contrário é necessário adicionar mais volumes de permanganato de potássio. Registar o número de volumes de permanganato usado.

Após os 10 minutos retirar da placa de aquecimento e adicionar 10 mL de ácido oxálico agitando a solução. O conteúdo do erlenmeyer ficará incolor.

Titular com permanganato de potássio até ao aparecimento da cor rosa persistente. Registar o volume gasto de permanganato de potássio.

VI. Determinação da oxidabilidade

$$\text{Oxidabilidade (mg/L O}_2\text{)} = \frac{(n-1)V + V_1}{V} \times 8 \quad (2)$$

em que:

V= volume da solução de permanganato de potássio utilizado na titulação de 10 mL de solução de ácido oxálico, expresso em mL.

V₁= volume da solução de permanganato de potássio gasto na titulação de 100 mL da amostra, expresso em mL.

N= número total de volumes de solução de permanganato de potássio adicionados.

VII. Expressão de resultados

O resultado é expresso até as décimas. Se o resultado for inferior a 1 expressa-se como <1 mg/L O₂.

VIII. Controlo de qualidade interno

Realizar um branco utilizando água ultrapura de grau 3 em vez dos 100 mL da amostra. O volume de permanganato de potássio gasto no branco não deve ser superior a 0,3 mL.

Em cada série ou a cada 20 amostra é efetuado o controlo em paralelo com a solução de resorcinol 1 mg/L, substituindo a amostra pelo resorcinol. O valor da oxidabilidade deve estar compreendido entre 1,63 a 2,04 mg/L O₂.

Em cada série realizar um duplicado ou a cada 20 amostras. A diferença de duplicados não pode ser superior a 10%.

F. Determinação de nitritos

I. Material/ equipamento

Neste trabalho prático, além do material corrente do laboratório utiliza-se o espectrofotómetro UV-Vis, da marca Hach modelo Lange Dr 5000 e a cuvette de quartzo com 1 polegada da marca Hach.

II. Reagentes e preparação de soluções

Para a realização deste trabalho é necessários os reagentes que se encontram abaixo e as soluções que são necessárias preparar encontram-se a seguir:

Ácido fosfórico, H_3PO_4 , $M = 98,00 \text{ g/mol}$, $d = 1,70 \text{ Kg/L}$, 85% (V/V), marca VWR BDH Prolabo
 Sulfanilamida, $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, $M = 172,21 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo
 N-(1 naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride, $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$, $M = 259,18 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo
 Solução padrão de nitritos, $\text{NO}_2^- \cdot \text{N}$ em H_2O , concentração = 40 mg/L, marca Merck
 Nitrito de sódio, NaNO_2 , $M = 69,00 \text{ g/mol}$, 99% (m/m), marca Scharlau
 Clorofórmio, CH_3Cl_3 , $M = 119,38 \text{ g/mol}$, $d = 1,48 \text{ Kg/L}$, 99,3 % (v/v), marca VWR BDH Prolabo

Solução de desenvolvimento da cor: colocar 350 mL de água ultrapura de grau 3 num balão volumétrico de 500 mL. Adicionar na hotte lentamente 50 mL de ácido fosfórico a 85% e 5 g de sulfanilamida. Após a dissolução completa da sulfanilamida adicionar 1 g de N-(1 naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride. Misturar e perfazer o volume do balão com água ultrapura de grau 3. Transferir a solução para um frasco de âmbar e conservar no frigorífico, esta solução é estável durante um mês.

Solução-mãe padrão de 100 mg/L nitritos (N-NO_2^-): num balão de 1000 mL dissolver 492,8 mg de nitrito de sódio e perfazer o volume com água ultrapura de grau 3. Adicionar 1 mL de clorofórmio como agente de preservação. Colocar num frasco de âmbar, esta solução é estável durante um mês.

Solução padrão de 1 mg/L de nitrito (NO_2^-): pipetar 760 μL da solução-mãe de 100 mg/L para um balão de 250 mL. Perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução padrão de 0,25 mg/L de nitritos (padrão de controlo): pipetar 475 μL da solução padrão de nitritos 40 mg/L para um balão de 250 mL e perfazer o volume com água ultrapura de grau 3.

III. Curva de calibração

A curva de calibração é preparada a partir da solução padrão de 1 mg/L de NO_2^- . Os seis padrões são preparados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1- Dados para a preparação da curva de calibração dos nitritos.

Nº balão e volume final	1 (50 mL)	2 (50 mL)	3 (50 mL)	4 (50 mL)	5 (50 mL)	6 (50 mL)
Conc. Final (mg/L NO_2^-)	0,00	0,04	0,10	0,25	0,40	0,60
Vsolução 1 mg/L NO_2^- a adicionar (mL)	0,00	2,00	5,00	12,50	20,00	30,00
Vsolução água a adicionar (mL)	50,00	48,00	45,00	37,50	30,00	20,00

De seguida, adicionar 2 mL de reagente de desenvolvimento da cor e agitar bem. Após 10 min e no máximo 2 horas após a adição do reagente ler a absorvância a 543 nm. Registrar os valores das absorvâncias e construir a curva de calibração.

IV. Procedimento da amostra

Após obter a curva de calibração realizar a leitura da amostra. É necessário primeiramente verificar se a amostra contém sólidos suspensos, se tal se verificar deve-se filtrar com um filtro de 0,45 µm. Também é necessário realizar previamente a leitura do pH da amostra. O pH deve estar compreendido entre 5 e 9 caso contrário tem de se ajustar com HCl 1 N ou NH₄OH 1N.

Posteriormente, em balões de 50 mL colocar 50 mL de amostra a analisar e adicionar a cada 2 mL do reagente de desenvolvimento da cor e agitar. Após 10 minutos e no máximo até 2 horas após a adição do reagente, ler a absorvância.

V. Expressão de resultados

Os resultados são expressos às centésimas em mg/L NO₂⁻ obtidos diretamente a partir da curva de calibração. No caso de serem obtidos resultados inferiores a 0,04 mg/L NO₂⁻ apresentar como <0,04 mg/L NO₂⁻. No caso de ter sido aplicado diluição aplicar o fator de diluição utilizado. Verificar que a diferença entre os dois resultados finais com diluição é inferior a 5 %. É apresentado o resultado da menor diluição utilizada.

VI. Controlo de qualidade interno

Realizar a leitura da solução padrão de 0,25 mg/L NO₂⁻ independente dos padrões de calibração (lote diferente). O resultado obtido deve ser 0,25 ± 0,025 mg/L NO₂⁻.

O valor do r^2 obtido na curva de calibração deve ser $\geq 0,995$. Caso esta condição não se verifique, é admissível eliminar um ponto da curva (considerado aberrante), desde que não seja nenhum ponto correspondente aos padrões nos extremos da curva, de modo a obter $r^2 \geq 0,995$. Se a condição de $r^2 \geq 0,995$ continuar a não se verificar, é possível utilizar a curva de calibração da série de amostras efetuadas anteriormente, desde que o resultado obtido com o padrão de controlo se encontre dentro dos critérios de aceitação e que o resultado obtido com uma solução padrão de 0,10 mg/L NO₂⁻ (preparada a partir do padrão de controlo 0,25 mg/L NO₂⁻) seja de 0,10 ± 0,01 mg/L NO₂⁻. Caso o resultado com o padrão de controlo ou com a solução de 0,10 mg/L NO₂⁻ não encontre-se dentro dos critérios, o ensaio deve ser repetido.

G. Determinação da cor

I. Material/ equipamentos

Para este procedimento além do material corrente do laboratório utiliza-se:

Espectrofotómetro UV-Vis, Hach Lange modelo DR 5000
Cuvette de quartzo com 1 polegada, marca Hach

Seringa, marca BD Plastipak
Filtros de 0,45 µm, marca VWR BDH Prolabo

II. Reagente e preparação de soluções

Os vários reagentes utilizados e as preparações das várias soluções encontram-se a seguir:

Solução padrão stock A de cor (500 mg/L) Pt-Co, marca Hach, Lote: 2264
Solução padrão stock B de cor (500 mg/L) Pt-Co, marca Hach, Lote: 2041

Solução padrão de cor de 5 mg/L Pt-Co: Esta solução é preparada a partir do padrão de cor Stock A. Pipetar 1 mL para um balão de 100 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Esta solução é estável durante 1 mês no escuro.

Solução padrão de cor de 20 mg/L Pt-Co: Esta solução é preparada a partir da solução padrão stock A. Pipetar 4 mL desta solução para um balão de 100 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Esta solução é estável durante 1 mês, guardar no escuro.

Solução padrão de cor de 40 mg/L Pt-Co: Esta solução é preparada a partir da solução padrão de cor stock A. Pipetar 4 mL desta solução para um balão de 50 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Esta solução é estável durante 1 mês ao escuro.

Padrão de cor de 20 mg/L Pt-Co: Esta solução é preparada a partir da solução padrão de cor de stock B. Pipetar 4 mL para um balão de 100 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Esta solução é estável durante 1 mês ao escuro.

III. Curva de calibração

Ligar o espectrofotómetro e seleccionar “programas favoritos” e depois “120 cor 455 nm”. Este programa tem uma curva de calibração predefinida, contudo é necessário sua verificação através das leituras dos padrões de 0 mg/L Pt-Co, 5 mg/L Pt-Co, 20 mg/L Pt-Co e 40 mg/L Pt-Co.

IV. Procedimento da amostra

Encher a cuvette com a amostra, limpar e verificar, se está limpa e seca. Posteriormente colocar no espectrofotómetro com a linha da cuvette voltada para o usuário e carregar em ler. Registar o resultado obtido.

V. Expressão de resultados

Se o resultado for inferior a 5 mg/L Pt-Co representar por <5 mg/L Pt-Co. Se o resultado for superior a 50 mg/L Pt-Co expressar > 50 mg/L Pt-Co.

VI. Controlo de qualidade interno

Verificar a curva de calibração através dos padrões de 0 mg/L Pt-Co, 5 mg/L Pt-Co, 20 mg/L Pt-Co e 40 mg/L Pt-Co. Os valores aceitáveis dos padrões são 5 ± 0 mg/L Pt-Co, 20 ± 1 mg/L Pt-Co e 40 ± 2 mg/L Pt-Co.

Realizar a leitura do padrão de controlo de concentração de 20 mg/L Pt-Co com um lote diferente (Stock B). O valor é aceite se a leitura for 20 ± 1 mg/L Pt-Co.

H. Determinação do cheiro e sabor

A determinação deste parâmetro realiza-se na sala de drogaria, perfumaria e higiene (DPH) que é independente do laboratório. A temperatura desta sala deve situar-se entre os 23°C-27°C e não pode conter nenhum cheiro.

I. Material/ equipamento

Utilizar como material específico frascos de cheiro e sabor de 250 mL e copos de vidro exclusivos para esta determinação. Como equipamento utilizar um banho termostaticado da marca Ovan, regulado a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

II. Reagentes e preparação de soluções

Para a realização deste trabalho é necessário preparar várias soluções. Os reagentes usados e o modo de preparação de cada solução encontra-se a seguir:

Tiossulfato de sódio, $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $M = 248,17 \text{ g/mol}$, 100% (m/m), marca VWR BDH Prolabo

Cafeína, $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$, $M = 194,19 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo

Vanilina, $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$, $M = 152,15 \text{ g/mol}$, 99% (m/m), $d = 1,06$, marca Alfa Aesar

Etanol, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, $M = 46,07 \text{ g/mol}$, $d = 0.790 \text{ Kg/L}$, 99,8% (v/v), marca PanReac AppliChem

Solução de tiossulfato de sódio a 3,5%: num balão de 500 mL dissolver 1,75 g de tiossulfato de sódio em água ultrapura de grau 3 e perfazer o volume. Esta solução é estável durante 7 dias, conservada em frasco escuro no frigorífico.

Solução de sabor amargo (solução de cafeína) 0,27 g/L: num balão de 1000 mL dissolver 0,27 g de cafeína em água ultrapura de grau 3 e perfazer o volume. Guardar no frigorífico num frasco de âmbar durante 3 meses.

Solução de cheiro baunilha (solução de vanilina) 0,5 mg/L: pesar 0,025 g de vanilina e diluir para 50 mL com etanol a 96%. Pipetar 1 mL desta solução para um balão de 1000 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3. Agitar e guardar no frigorífico num frasco de âmbar.

Nota: Estas foram as soluções de sabor e cheiro utilizadas mas, existem outras soluções de cheiro e sabor para a realização desta análise.

III. Procedimento da amostra

Antes de analisar a amostra é necessário corrigir o cloro adicionando-se 2 mL da solução de tiossulfato de sódio a 3,5% por cada 1 mg/L de cloro residual livre presente num litro de amostra.

Para este ensaio utilizar como água de referência a água ultrapura de grau 3 que não contém qualquer cheiro ou sabor.

IV. Escolha não forçada - teste de emparelhamento

A determinação do cheiro e do sabor é realizada através da escolha não forçada - teste de emparelhamento da forma mais simplificada e posterior determinação do número limiar.

Para estas determinações é necessário no mínimo dois provadores e um analista que prepara o ensaio e que não pode ser provador simultaneamente. O teste é iniciado por dois provadores, em caso de discordância, será completado por mais um provador.

O preparador tem como função codificar as amostras, padrões e branco com uma referência não relacionada com os números das amostras de forma a garantir que os provadores não têm acesso a qualquer informação sobre a amostra. O preparador regista no seu caderno de registos qual a correspondência entre as amostras e a referência atribuída. No final do ensaio é efetuada a correspondência entre as amostras e as referências atribuídas.

São colocadas pelo preparador no banho a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, as amostras e a água de referência. Aguarda-se 30 minutos para a estabilização da temperatura das amostras.

De seguida os provadores são chamados pelo preparador para efetuarem o ensaio e estes verificam se existe alguma diferença entre as amostras e a água de referência.

Para a determinação do cheiro, retira-se a amostra e a água de referência do banho e cada provador deve agitar os frascos, tirar as rolhas, cheirar, colocar novamente a rolhas, realizando assim a comparação entre ambos os frascos.

Para avaliação do sabor cada provador deve transferir um determinado volume da amostra e de água de referência para copos de vidro diferentes. De seguida, levar a amostra à boca e manter a amostra durante alguns segundos na boca e por fim deitar fora sem engolir. Este procedimento é feito de igual forma para a água de referência com objetivo de comparar as duas águas.

O provador no final de cada determinação deve registar no seu caderno se a amostra apresenta ou não cheiro e sabor.

Se os dois provadores tiverem resultados concordantes, o teste é válido, caso contrário o ensaio será completado com mais um provador (terceiro provador). Senão forem detetadas diferenças perceptíveis entre a amostra e a água de referência, o ensaio é dado como terminado. Por outro lado, se forem detetadas diferenças perceptíveis entre a amostra e a água de referência deve ser determinado o limiar específico pelo método completo.

V. Método completo

Este método consiste em realizar várias diluições da amostra até que não exista diferença entre a amostra e a água de referência, ou seja, que não se consiga detetar cheiro ou sabor na amostra. O resultado imitado por este método corresponde à última diluição efetuada em que é possível detetar o cheiro e o sabor.

VI. Número limiar

O preparador com os resultados obtidos pelos provadores atribuiu o número limiar. Se amostra não apresenta diferenças perceptíveis com a água de referência e não foi diluída, o resultado é definido como inferior ao número limiar (<1), caso contrário será atribuído o número limiar correspondente à diluição efetuada.

VII. Expressão de resultados

O resultado do cheiro e sabor é expresso como fator de diluição a 25 °C. Se não foram detetadas diferenças perceptíveis entre a amostra sem diluição e a água de referência o resultado será <1 .

No caso de serem detetadas diferenças perceptíveis deve ser quantificado o resultado utilizando o método completo.

VIII. Controlo de qualidade interno

É efetuado um branco e é utilizado um padrão de cheiro e sabor de modo que os provadores não estejam sujeitos sempre ao mesmo estímulo sensorial.

Em cada série de amostras deve-se efetuar um duplicado ou a cada 20 amostras se o número de amostras a analisar for > 20 . Não deve ser detetada qualquer diferença entre os duplicados.

I. Determinação do Azoto amoniacal

I. Material / equipamento

Neste trabalho prático além do material corrente de laboratório usou-se algum equipamento mais específico:

Espectrofotómetro UV-Vis, marca Hach modelo Lange Dr 5000
Cuvettes de quartzo 1 cm, marca Hellma Analytics

II. Reagentes e preparação de soluções

Os vários reagentes utilizados e as preparações das várias soluções encontram-se a seguir:

Solução padrão de amónio 50 mg/L,
Hidróxido de sódio, NaOH, M= 40 g/mol, 98,9%, Fisher chemical
Fenol, C₆H₆O, 99,9%, M= 94,11 g/mol
Citrato trissódico, C₆H₅Na₃O₇·2H₂O, M= 294,10 g/mol, 100,1 %, VWR BDH Prolabo
Nitroprussiato de sódio, C₅FeN₆Na₂O·2H₂O, M= 297.95 g/mol, VWR BDH Prolabo
Hipoclorito de sódio 13 %, Proclean
Cloreto de amónio, NH₄Cl, M= 53,49 g/mol, 99%, Merck

Solução corada: dissolver 10 g de NaOH mais 190 g de citrato trissódico em 500 mL. Aquecer até à ebulição durante 20 minutos. Adicionar 39 mL de hipoclorito a 13 % e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução de nitroprussiato de sódio e fenol: pesar para um balão de 500 mL, 17,5 g de fenol e 0,2 g de nitroprussiato de sódio e perfazer com água ultrapura de grau 3. Transferir a solução para um balão de âmbar e guardar no frigorífico. O fenol é tóxico, utilizar luvas e trabalhar na hotte.

Solução padrão de iões amónio a 100 mg/L: num balão de 1000 mL colocar 297 mL de cloreto de amónio e perfazer com água ultrapura de grau 3.

Solução padrão de amónio a 1 mg/L: diluir a solução padrão de 100 mg/L de 1/100.

Solução padrão de amónio a 0,25 mg/L (padrão de controlo): pipetar 192 µL da solução padrão de amónio a 100 mg/L para um balão de 100 mL e perfazer com água ultrapura de grau 3.

III. Preparação da curva de calibração

Para a quantificação da amostra preparar uma curva de calibração. A sua preparação é a seguinte:

A partir da solução 1 mg/L de iões amónio preparar 6 soluções padrão, segundo a Tabela 2.

Tabela 2- Preparação dos padrões para a curva de calibração do azoto amoniacal.

Nº balão e V final	Concentração final mg/L NH ₄	Volume da solução 1 mg/L NH ₄ a adicionar	Volume de água
1 (50 mL)	0	0	50

2 (50 mL)	0,04	2	48
3 (50 mL)	0,1	5	45
4 (50 mL)	0,25	12,5	37,5
5 (50 mL)	0,4	20	30
6 (50 mL)	0,6	15	10

De seguida, em balões de 100 mL colocar 20 mL de cada padrão (1 a 6) e adicionar rapidamente a cada balão:

- 1 mL de solução nitroprussiato de sódio e fenol

- 1 mL de solução clorada

Agitar e colocar no escuro durante 6 horas. Efetuar a leitura no espectrofotómetro a 630 nm. Registrar as absorvâncias e construir a curva de calibração no espectrofotómetro. O coeficiente de correlação deve ser superior a 0,995.

IV. Procedimento da amostra

Num balão de 100 mL colocar 20 mL de amostra e adicionar 1 mL de solução de nitroprussiato de sódio e fenol e 1 mL de solução clorada, colocar no escuro durante 6 horas. Efetuar a leitura a 630 nm.

V. Expressão de resultados

O resultado é expresso às centésimas em mg/L NH_4^+ calculados a partir da reta de calibração. Se o resultado for inferior a 0,04 mg/L NH_4^+ apresenta-se como <0,04 mg/L NH_4^+ .

No caso de diluição aplicar o fator de diluição utilizado. Verifica-se que a diferença entre os dois resultados finais com diluição é inferior a 5 %. É apresentado o resultado da menor diluição utilizada.

VI. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é assegurado através de uma solução padrão de controlo de 0,25 mg/L NH_4^+ . O resultado obtido deve ser $0,25 \pm 0,025$ mg/L NH_4^+ .

Em cada série de amostras é efetuado um duplicado ou a cada 20 amostras se o número de amostras for > 20. A diferença entre duplicados deve ser <5%.

J. Determinação da carência química de oxigénio

I. Material/ equipamento

Para este trabalho prático utiliza-se material corrente do laboratório. Como material e equipamento específico utiliza-se um digestor da marca Velp Scientifica modelo DR 5000.

II. Reagentes/ preparação de soluções

Os reagentes e as soluções utilizadas durante o procedimento encontram a seguir:

Ácido sulfúrico, H_2SO_4 , $M = 98,07 \text{ g/mol}$, 95% (V/V), marca Fisher Chemical
Sulfato de prata, Ag_2SO_4 , $M = 311,79 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo
Dicromato de potássio, $\text{Cr}_2\text{K}_2\text{O}_7$, $M = 294,18 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo
Sulfato de mercúrio, HgSO_4 , $M = 296,65 \text{ g/mol}$, VWR BDH Prolabo
Sulfato de ferro (II) e Amónio hexahidratado, $\text{H}_8\text{FeN}_2\text{O}_8\text{S}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $M = 392,13 \text{ g/mol}$, pureza = 100%, marca VWR BDH Prolabo
Hidrogenoftalato de potássio, $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, $M = 204,22 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo
Solução indicadora de ferroína, marca VWR BDH Prolabo

Solução de ácido sulfúrico 4M: num balão de 1000 mL, adicionar cerca de 500 mL de água ultrapura de grau 3 e cautelosamente 220 mL de ácido sulfúrico concentrado.

Sulfato de prata-ácido sulfúrico: adicionar 10 g de sulfato de prata a 35 mL de água ultrapura de grau 3. Juntar cautelosamente 965 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixar 1 ou 2 dias em repouso para dissolver. A dissolução é mais eficaz se colocada em agitação. Esta solução tem validade de 6 meses.

Solução padrão de dicromato de potássio (0,040 M): colocar num copo, cerca de 400 mL de água ultrapura de grau 3 e adicionar cuidadosamente 50 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixar arrefecer e juntar 5,884 g de dicromato de potássio (previamente seco a 105°C , durante 2 horas) e 40 g de sulfato de mercúrio. Transferir a solução para um balão de 500 mL e aferir. A solução é estável durante 1 mês.

Solução de sulfato de ferro (II) e Amónio hexahidratado (~0.12M): dissolver 47,0 g de sulfato de ferro (II) e Amónio hexahidratado em água ultrapura de grau 3. Adicionar 20 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deixar arrefecer e diluir com água para um balão de 1000 mL. Esta solução tem uma validade de 6 meses à temperatura ambiente.

Solução padrão controlo de hidrogenoftalato de potássio (2.0824 M): dissolver 0,1063 g de hidrogenoftalato de potássio (seco a 105°C) em água ultrapura de grau 3 para um balão de 250 mL. A solução tem um valor teórico de CQO de 500 mg/L O_2 . Esta solução tem uma validade de 1 semana, guardar no frigorífico.

III. Preservação de amostras

Para a determinação do CQO as amostras devem ser analisadas o mais rápido possível, caso contrário devem ser conservadas pela adição de 10 mL de ácido sulfúrico 4M por cada litro de amostra e colocadas na câmara de refrigeração até ao momento da análise. As amostras podem ser conservadas 1 mês nestas condições.

IV. Padronização da solução de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado

Para a padronização da solução de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado (~0.12M), transferir 10,0 mL de solução de dicromato de potássio para um erlenmeyer de 250 mL e perfazer até 100 mL com a solução de ácido sulfúrico (4 M). Posteriormente, adicionar 2 a 3 gotas de solução indicadora de ferroína. Titular com a solução de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado até à viragem de cor azul esverdeado a castanho avermelhado.

Concentração molar (mol/L) de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado é obtida através da expressão:

$$C = \frac{10,0 \times 0,040 \times 6}{V} = \frac{2,4}{V} \quad (2)$$

Onde V é o volume (mL) de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado gasto na titulação.

V. Procedimento da amostra

Digestão

Ligar o digestor e seleccionar o programa 3 do digestor (148 °C a 120 minutos). De seguida, colocar 10 mL de amostra num tubo de digestão e adicionar 5 mL da solução de dicromato de potássio.

Introduzir alguns pedaços de porcelana porosa, para regular a ebulição e agitar bem. Adicionar, lentamente, 15 mL da solução de sulfato de prata-ácido sulfúrico e acoplar imediatamente a respetiva coluna de condensação.

Após adição do sulfato de prata-ácido sulfúrico, verificar, se as amostras estão límpidas, se não for o caso, adicionar uma espátula de sulfato de mercúrio até verificação dessa condição. Esse passo permite diminuir a interferência da presença de cloretos.

Colocar os tubos de digestão no digestor quando este se encontrar à temperatura desejada (148 °C). Após as 2 horas, retirar os tubos do digestor e arrefecer à temperatura ambiente.

Lavar a coluna de condensação com pequenas porções de água ultrapura de grau 3 aproximadamente 45 mL. Retirar a coluna de condensação e diluir o conteúdo do tubo de digestão para cerca de 75 mL. Verter o conteúdo do tubo para um erlenmeyer de 250 mL e adicionar 3 gotas do indicador de ferroína.

Titular com a solução de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado. Registrar o volume gasto até atingir o ponto de viragem (castanho avermelhado).

VI. Expressão do resultado

Caso o resultado seja > 700 mg/L O₂ efetuar uma diluição apropriada da amostra com água ultrapura de grau 3 e repetir o ensaio. No caso de o resultado ser inferior a 40 mg/L O₂ expressar o resultado como <40 mg/L O₂.

VII. Determinação do CQO:

$$\text{CQO (mg/L O}_2\text{)} = \frac{8000 \times C \times (v_1 - v_2)}{V_0} \quad (3)$$

Onde:

C- Concentração, em molaridade do sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado

V₀- Volume de amostra (mL)

V₁- Volume de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado gasto na titulação do branco (mL)

V₂- volume de sulfato de ferro (II) e amónio hexahidratado gasto na titulação da amostra (mL)

VIII. Controlo de qualidade interno

Como controlo de qualidade interno, realizar um branco, substituindo a amostra por 10 mL de água ultrapura de grau 3 e utilizar um padrão de controlo de hidrogenoftalato de potássio 2,0824 M. O resultado do padrão de controlo obtido deve ser de 500 ± 25 mg/L de O₂.

K. Determinação da carência bioquímica de oxigénio

I. Material/ equipamento

Nesta determinação utiliza-se material corrente do laboratório, contudo usa-se algum material mais específico:

Estufa de incubação a 20 °C ± 2°C, marca Aqualytic
Aparelho para determinação do CBO₅, marca Aqualytic modelo AL606
Frascos de 500 mL próprios para a determinação do CBO₅

II. Reagentes/ preparação de soluções

Os reagentes e as soluções preparadas para esta determinação são as seguintes:

Hidróxido de potássio, KOH , $M = 54,11 \text{ g/mol}$, $d = 2,04 \text{ Kg/L}$, 86,7% (m/m), marca VWR BDH Prolabo

Alitiourea, 98% (m/m), marca Acros organics

Glucose, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, $M = 180,16 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo

Ácido glutâmico, $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$, $M = 147,13 \text{ g/mol}$, 99,0-100,5% (m/m), marca Fisher Scientific

Dihidrogenofosfato de potássio, H_2KPO_4 , $M = 136,09 \text{ g/mol}$, marca VWR BDH Prolabo

Hidrogenofosfato dipotássico, K_2HPO_4 , $M = 174,18 \text{ g/mol}$, 99% (m/m), marca Emsure

Hidrogenofosfato disódio, Na_2HPO_4 , $M = 141,96 \text{ g/mol}$, 99% (m/m), marca Merck

Cloreto de amónio, NH_4Cl , $M = 53,49 \text{ g/mol}$, 99,8% (m/m), marca Merck

Sulfato de magnésio heptahidratado, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $M = 246,47 \text{ g/mol}$, 100,5% (m/m), marca VWR BDH Prolabo

Cloreto de cálcio dihidratado

Cloreto de ferro (III) hexahidratado, $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $M = 270,30 \text{ g/mol}$, 99,1% (m/m), marca VWR BDH Prolabo

Água de sementeira- efluente doméstico com um valor máximo de CQO de 300 mg/L.

Solução tampão fosfato: dissolver em 150 mL de água ultrapura de grau 3, 2,125 g de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), 5,438 g de hidrogenofosfato dipotássico (K_2HPO_4), 4,424 g de hidrogenofosfato disódio (Na_2HPO_4) e 0,425 g de cloreto de amónio (NH_4Cl). Diluir a 250 mL e homogeneizar. O pH desta solução tampão deve ser cerca de 7,2 sem ajuste posterior.

Solução de sulfato de magnésio (22,5 g/L): dissolver 2,25 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em água ultrapura de grau 3, diluir para 100 mL e homogeneizar.

Solução de cloreto de cálcio (27,5 g/L): dissolver 3,64 g de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em água ultrapura de grau 3. Diluir a 100 mL e homogeneizar.

Solução de cloreto de ferro (III) (0,25 g/L): dissolver 0,025 g de cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) em água ultrapura de grau 3. Diluir a 100 mL e homogeneizar.

Nota: Estas soluções salinas são estáveis durante 6 meses e devem ser guardadas em frascos de vidro escuros entre 0 °C e 4 °C. Rejeitar as soluções em que se observar uma precipitação ou um crescimento biológico.

Água de diluição semeada: Num balão de 1000 mL, colocar cerca de 500 mL de água ultrapura de grau 3, adicionar 1 mL de cada solução salina (cloreto de ferro, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio e de tampão fosfato). Adicionar 6 mL de uma solução de microrganismos de modo a que a quantidade adicionada não gere um CBO_5 superior a 1,5 mg/L O_2 . Perfazer com água ultrapura de grau 3 a 1000 mL e homogeneizar. Colocar a água de diluição à

temperatura de incubação de 20 °C e arejar durante 1 hora, com o cuidado de não a contaminar com outras substâncias. Preparar a solução imediatamente antes da sua utilização e descartar o restante no final da preparação do ensaio.

Solução hidróxido de potássio 45%: dissolver 45 g de KOH em cerca de 50 mL de água ultrapura de grau 3 e aferir até à marca num balão volumétrico de 100 mL. Esta solução tem a validade de 6 meses.

Solução do padrão controlo de glucose-ácido glutâmico 200 mg/L: colocar a glucose desidratada e o ácido glutâmico a 105 °C \pm 1°C durante 1 hora. Pesar 75 mg de cada reagente, dissolver em água de diluição semeada, diluir a 500 mL e homogeneizar. Preparar a solução imediatamente antes da utilização.

Solução de Aliltioureia (ATU): dissolver 200 mg de aliltioureia em água ultrapura de grau 3 e diluir para 200 mL. Guardar a solução a 4°C que é estável durante pelo menos 2 semanas. Esta substância é tóxica e deve ser manuseada com cuidado.

III. Preservação de amostras

Após receção no laboratório as amostras devem ser conservadas na câmara frigorífica até ao momento da análise. A amostra pode ser armazenada no máximo 1 dia nestas condições, caso contrário deve ser congelada. O prazo de congelação até ao início da análise não pode ser superior a 1 mês.

IV. Procedimento da amostra

A determinação do CBO₅ da amostra inicia-se com a estimativa do intervalo esperado de CBO₅ (normalmente considera-se que o valor de CBO₅ é cerca de 80% de CQO para efluentes domésticos).

De seguida, verificar o pH da amostra e ajustar se necessário entre 6,5 e 7,5 com ácido (HCl 1N) ou base (NaOH 1N). Registrar o resultado final.

Agitar bem a amostra e deixar repousar uns segundos. Selecionar o volume de amostra a colocar no frasco próprio de CBO₅ de acordo com a Tabela 3, tendo também em conta a diluição efetuada. A diluição é feita com a água de sementeira.

Tabela 3- Determinação do volume de amostra a colocar para o CBO₅.

Intervalo de CBO ₅ esperado	Volume de amostra (mL)	Quantidade de ATU (mL)
0-40	428	1
40-80	360	1
80-200	244	0,5
200-400	157	0,5
400-800	94	0,25

800-2000	56	0,25
2000-4000	21,7	0,10

Medir o volume de amostra com precisão para os balões para CBO₅. Inserir a barra magnética e a quantidade de ATU correspondente ao volume medido da amostra de acordo com o indicado na tabela acima. Adicionar 3-4 gotas de hidróxido de potássio na borracha de contacto e colocar no topo do frasco. É necessário ter cuidado em não verter o hidróxido de potássio na amostra.

Adaptar o sensor de CBO₅ no frasco e apertar cuidadosamente, para que o sistema esteja hermeticamente fechado. Colocar o frasco na respetiva posição do equipamento.

Ligar o equipamento e seleccionar a posição iniciar, carregando no botão correspondente (acende-se a luz vermelha da posição seleccionada). Carregar no “Start” e aparece no ecrã “Srt dlt”, carregar em “Enter” para apagar o resultado anterior. No ecrã, é então visível na parte superior o volume de amostra, e na parte inferior o respetivo valor máximo do intervalo. Usar o “+” e “-” até aparecer o volume utilizado de amostra. Carregar no “Enter” e se a posição é corretamente iniciada, aparece “000” e “donE”. Repetir os passos anteriores para as restantes posições.

Para a realização da leitura dos resultados após o final da incubação, carregar na tecla “On”, seleccionar a posição desejada e anotar o valor que aparece em cada posição. Verificar, se o valor está dentro do intervalo estimado.

Para verificar a medição do CBO₅ ao longo da incubação, seleccionar a posição desejada e carregar no “Enter”. Aparece no ecrã, o resultado do dia 1, carregando no botão “+”, aparecem as medições dos dias posteriores.

Para um resultado válido as seguintes condições devem ser verificadas:

O valor de CBO₅ deve ser mais elevado do que o valor do dia anterior. Os valores de CBO₅ não aumentam de forma linear. O aumento é sempre menor do que o do dia anterior, seguindo uma curva semelhante ao crescimento microbiológico (aproximadamente exponencial).

V. Expressão do resultado

A expressão de resultados é apresentada em mg/L O₂ sendo o valor obtido por leitura direta do equipamento. No caso de terem sido efetuadas diluições expressar o resultado tendo em conta a diluição efetuada. No caso de o resultado ser inferior a 20 mg/L O₂ expressar como <20 mg/L O₂.

VI. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno é efetuado através do padrão de controlo, o resultado deve estar compreendido entre $198 \pm 30,5$ mg/L O_2 . Bimensalmente é efetuado um branco com água de diluição semeada em substituição da amostra. O resultado obtido deve ser ≤ 2 mg/L de O_2 .

L. Determinação dos sólidos suspensos totais

I. Material/ equipamento

Nesta determinação utiliza-se material corrente do laboratório, contudo usa-se algum material mais específico:

Balança analítica, marca Shimadzu
Estufa de secagem, marca Binder
Unidade de filtração
Filtros de fibra de vidro, diâmetro 47 mm, marca Whatman

II. Reagente e preparação da solução

O reagente e a solução preparada para esta determinação é a seguinte:

Celulose microcristalina, marca Alfa Aesar

Padrão controlo de 300 mg/L: pesar 0,0750 g de celulose microcristalina (previamente seca a 103 °C durante 2 horas) e diluir a 250 mL com água ultrapura de grau 3.

III. Conservação das amostras

Após receção no laboratório, as amostras devem conservar-se na câmara frigorífica até ao momento da análise. Se possível as amostras devem ser processadas nas 24 h seguintes, caso contrário o tempo máximo de armazenamento até ao início da análise é de 7 dias.

IV. Procedimento da amostra

O procedimento para a determinação dos sólidos suspensos totais consiste em colocar o filtro de fibra de vidro num vidro de relógio e colocar o conjunto na estufa à temperatura de 103 °C, durante 1 hora. Deixar arrefecer num exsiccador durante cerca de 30 minutos e pesar o conjunto (vidro de relógio + filtro) e registar o peso. Manter o filtro no exsiccador até à utilização.

De seguida, colocar o filtro na unidade de filtração, homogeneizar bem a amostra por agitação e transferir para uma proveta o volume de amostra adequado e proceder à filtração. Se a filtração demorar mais de 10 minutos diminuir o volume de amostra a filtrar.

Lavar a proveta, as paredes da unidade de filtração e o filtro, três vezes sucessivamente com 10 mL de água ultrapura de grau 3. Continuar a filtração até não haver vestígios de água no filtro.

Remover o filtro da unidade de filtração, colocar no respetivo vidro de relógio e secar na estufa à temperatura de 103 °C durante 1 hora. Deixar arrefecer no exsiccador durante cerca de 30 minutos, pesar e registar o peso do vidro de relógio + filtro + amostra.

De seguida levar novamente o conjunto à estufa durante 30 minutos e registar o valor. Se a diferença entre as duas pesagens sucessivas for inferior a 4 % do peso anterior ou 0,5 mg, repetir a operação de secagem e arrefecimento até que a diferença se realize.

V. Determinação dos sólidos suspensos totais

$$\text{mg SST/ L} = \frac{(A-B) \times 1000}{V} \times 1000 \quad (4)$$

Onde:

A- Peso do filtro + vidro de relógio (g) + peso do resíduo seco da amostra (g)

B- Peso do filtro (g) + vidro de relógio (g)

V- volume da amostra (mL)

VI. Expressão do resultado

A expressão dos resultados é feita em mg/L. Se os resultados forem inferior a 10 mg/L expressar o resultado como <10 mg/L. Caso o resultado seja superior a 1000 mg/L expressa o resultado com apenas três algarismos significativos (ex.: o resultado de 1250 mg/L será apresentado como $125 \times 10 \text{ mg/L}$). Caso o resultado seja superior a 8000 mg/L expressar o resultado como $> 800 \times 10 \text{ mg/L}$.

O resíduo seco obtido deve estar compreendido entre 2,5 e 200 mg. Caso o valor obtido esteja fora deste intervalo, filtrar um valor maior ou menor da amostra até um máximo de 500 mL e um mínimo de 25 mL.

VII. Controlo de qualidade interno

Controlo de qualidade interno é garantido através de um padrão de controlo de 300 mg/L em substituição da amostra, o resultado obtido deve ser $300 \pm 15 \text{ mg/L}$ de SST.

Anexo 2: Tabelas

Tabela 4- Técnicas de preservação de vários analitos (adaptada da ISO 5667-3, 2012).

Analito a ser estudado	Tipo de recipiente	Condições de armazenamento e preservação	Tempo máximo de armazenamento	Validado ou melhor técnica
Fósforo total	Plástico, vidro ou vidro de borosilicato	Acidificar a pH de 1 ou 2 com H ₂ SO ₄ ou HNO ₃	1 Mês	Melhor técnica
	Para concentrações normais: PEAD, PTFE			
	Para concentrações baixas: PFA, FEP			
	Preferencialmente vidro, caso contrário: PE, PVC			
	Plástico	Congelar abaixo de - 18°C	6 Meses	Validado
Cor	Plástico ou vidro	Armazenar no escuro ou usar garrafas escuras	5 Dias	Melhor prática
		Para as águas subterrâneas ricas em ferro II, analisar no local	5 Minutos	Melhor prática
Nitritos- todas as águas	Plástico ou vidro	Preferencialmente analisado no local	1 Dia	Melhor prática
Cheiro	Vidro	A análise qualitativa pode ser obtida no local	6 Horas	Melhor prática
pH	Plástico	Preferencialmente analisado no local	1 Dia	Validado
Sólidos suspensos	Plástico ou vidro	-	2 Dias	Melhor técnica
Condutividade	Plástico ou vidro	Preferencialmente analisado no local	1 Dia	Melhor prática
Turvação	Vidro ou plástico	Armazenar no escuro ou usar garrafas escuras. Preferencialmente analisado no local.	1 Dia	Melhor prática
CQO	Plástico ou vidro	Acidificar a pH de 1 ou 2 com H ₂ SO ₄	6 Meses	Validado
	PP e Vidro			
	Plástico	Congelar abaixo de - 18°C.	6 Meses	Validado
	Plástico			
CBO₅	Plástico ou vidro	Armazenar no escuro ou usar garrafas escuras	1 Dia	Melhor prática
	Plástico	Congelar abaixo de - 18°C. Armazenar no escuro ou usar garrafas escuras	1 Mês (6 meses se > 50 mg/L)	Validado
Nitratos - todas as águas	Plástico ou vidro	-	1 Dia	Melhor prática
	PE ou vidro	-	1 Dia	Melhor prática
	PE ou vidro	Congelar abaixo de - 18°C.	8 Dias	Melhor prática
	Plástico ou vidro	Acidificar a pH de 1 ou 2 com HCl	7 Dias	Melhor prática
	Plástico	Congelar abaixo de - 18°C	1 Mês	Melhor prática

Legenda: FEP - Perfluoro(ethylene/propylene); PE - Polietileno; PEAD - Polietileno de alta densidade; PET - Politereftalato de etileno; PFA - Copolímero perfluoroalcoxi; PP - Polipropileno; PTFE - Politetrafluoretileno; PVC - Policloreto de vinilo.