



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

DETERMINAÇÃO DE IODO E METAIS PESADOS EM ÁGUAS NATURAIS

Sónia Alexandra Morais Duarte

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

Orientadoras: Prof. Doutora Albertina Marques
Prof. Doutora Ana Paula Costa

Covilhã, Outubro de 2011

Agradecimentos

Desejo agradecer à Professora Doutora Albertina Marques pela orientação científica desta dissertação. A incansável disponibilidade que sempre demonstrou, o seu vasto saber, o espírito crítico, exigência e rigor, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, bem como pelo apoio, dedicação e amizade que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Ana Paula Costa, pela orientação, compreensão e amizade, pela paciência, apoio e incentivo nos momentos em que eu estava mais perdida e por ser esse exemplo profissional e pessoal que tanto admiro.

A minha avó Maria do Carmo, por estar sempre a torcer e a rezar por mim; com saudade, mas com a certeza que ele está num “sítio” melhor, ao meu avô Amândio, exemplo de vida e dedicação, sabedoria, sacrifício e amor. Imagino as palavras que ele me diria agora por ter vencido os obstáculos desta caminhada. E chego até a sentir, aquele abraço apertado que ele me daria neste momento tao importante da minha vida.

Aos amigos que fiz durante o curso, pela verdadeira amizade que construímos em particular aqueles que estiveram sempre ao meu lado (Patrícia Baptista, Ana Canheto, Ana Costa; Telma Anagua) por todos os momentos que passamos durante estes últimos anos o meu especial agradecimento. Sem vocês este trajecto não seria feito com tanta alegria.

Aos meus pais, Manuel e Isaura, e a minha irmã Tânia, por sempre me incentivarem perante os desafios, a fazer mais e melhor, quero partilhar convosco a alegria de os conseguir vencer continuamente!

Uma palavra de reconhecimento muito especial para a minha tia Tina e para o meu padrinho Carlos, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, souberam ajudar-me.

E por fim, quero prestar um especial agradecimento ao Ângelo, meu namorado e amigo por me fazer rir nos momentos de maior desespero, por estar sempre ao meu lado, por se dedicar a mim com tanto amor e carinho.

Resumo

Sabe-se que a deficiência de iodo no ambiente está relacionada com disfunções da glândula tiróide provocando o bócio.

Assim, esta dissertação reside na necessidade de medir, através de um método analítico adequado, o iodo na água destinada ao consumo humano, e relacionar o seu teor, que se supõe ser baixo, com as doenças associadas à IDD.

Para atingir este objectivo procedeu-se à validação do método, “leuco cristal violeta”, através de avaliação directa e indirecta. As amostras de água são provenientes de várias localidades: Matosinhos, Póvoa de Varzim, Covilhã, Castelo Novo, Capinha, Penhas da Saúde, Guarda e Monte Real. O método foi aplicado na análise de 47 amostras de água tratada e 41 amostras de água bruta. Verificou-se que as concentrações de iodo variaram entre $7,43 \pm 1,92$ e $18,81 \pm 4,85 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água tratada, e $6,20 \pm 1,47$ e $17,90 \pm 2,84 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água bruta. Sendo que foi no Porto que se registaram os maiores teores de iodo e na Covilhã os menores. Considerando que o LD e o LQ encontrados são $14,5$ e $46,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, nenhuma das amostras analisadas pode ser quantificada.

A legislação Portuguesa indica a espectrofotometria de absorção atómica como metodologia analítica de referência para análise e quantificação de diversos metais em águas de consumo humano (DL 236/98). Este é o caso de metais como cobre, manganês, selénio e zinco, que serão abordados no âmbito deste trabalho. A escolha destes metais tem por base o facto de diversos estudos revelarem que para além do iodo, também estes elementos influenciam a actividade e secreção da hormona da tiróide.

As concentrações de Cu, Mn e Zn foram determinadas em 37 amostras de água bruta e em 37 amostras de água tratada. A concentração de cobre nas águas tratadas analisadas variou entre $0,35 \pm 0,13$ a $23,68 \pm 1,76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e de $0,25 \pm 0,06$ a $9,50 \pm 0,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água bruta. O teor de manganês variou entre $0,51 \pm 0,00$ a $2,41 \pm 0,24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água tratada e de $0,55 \pm 0,06$ a $2,44 \pm 0,53 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água bruta. A concentração de zinco variou entre $0,00 \pm 0,00$ a $63,16 \pm 10,41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água tratada e $0,00 \pm 0,00$ a $18,62 \pm 1,24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água bruta. Os limites estabelecidos pelo Decreto-Lei nº 306/2007 para o cobre e para o manganês para a água de consumo humano é de $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. O presente Decreto-Lei não faz referência a valores paramétricos para o zinco.

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que o teor de iodo nas águas naturais analisadas, quer no interior do País quer no litoral, é significativamente baixo, o que significa que a água natural não é um meio viável para garantir a ingestão de iodo necessária diariamente que é de $150 \mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$ para adultos.

Considerando que a literatura refere que a quantidade necessária de ingestão diária para um adulto de zinco é de $15 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$, de cobre entre $1,0$ a $1,5 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$ e de manganês $2,5$ a $5,0$

$\text{mg}\cdot\text{dia}^{-1}$, pode concluir-se pelos resultados analisados que a água natural também não fornece essas quantidades.

Palavras-chave: Iodo; Águas Naturais; Validação de Métodos; Cobre; Zinco; Selênio; Manganês.

Abstract

It is known that iodine deficiency in the environment is related to dysfunction of the thyroid gland leading to goitre.

Thus, this dissertation arises from the need to measure, through an appropriate analytical method, the iodine in water intended for human consumption and relate its level, which is assumed to be low, with the diseases associated with IDD.

To achieve this we proceeded to validate the method, leuco violet crystal, through direct and indirect evaluation. Water samples come from various locations: Matosinhos, Póvoa de Varzim, Covilhã, Castelo Novo, Capinha, Penhas da Saúde, Guarda e Monte Real. The method was applied in the analysis of 47 treated water samples and 41 samples of raw water. It was found that iodine concentrations ranged from $7,43 \pm 1,92$ to $18,81 \pm 4,85 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the treated water, and from $6,20 \pm 1,47$ to $17,90 \pm 2,84 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the raw water. Porto registered the highest levels of iodine and Covilhã the lowest. Considering that the LD and LQ found are 14,5 and $46,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively, none of the samples can be quantified.

Portuguese legislation indicates the atomic absorption spectrophotometry as the reference analytical methodology for analysis and quantification of various metals in water for human consumption (DL 236/98). This is the case of metals such as copper, manganese, selenium and zinc, which are discussed in this work. The choice of these metals is based on the fact that many studies have shown that in addition to iodine, these elements also influence the activity and secretion of thyroid hormone.

The concentrations of Cu, Mn and Zn were determined in 37 raw water samples and 37 samples of treated water. The concentration of copper in the treated water analysed ranged from $0,35 \pm 0,13$ to $23,68 \pm 1,76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and from $0,25 \pm 0,06$ to $9,50 \pm 0,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the raw water. The manganese content ranged from $0,51 \pm 0,00$ to $2,41 \pm 0,24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the treated water and from $0,55 \pm 0,06$ to $2,44 \pm 0,53 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the raw water. The zinc concentration ranged from $0,00 \pm 0,00$ to $63,16 \pm 10,41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the treated water and from $0,00 \pm 0,00$ to $18,62 \pm 1,24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the raw water. The limits established for copper and manganese on drinking water, by the Decree-Law no. 306/2007, are $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The current Decree-Law makes no reference to the parametric values for zinc.

From the results obtained, it can be concluded that the iodine content on analyzed natural waters, both on the countryside and on the coast, is significantly low, which means that the natural water is not a viable mean to ensure the intake of the iodine needed daily, which is $150 \mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$ for adults.

Considering that literature indicates that the required amount of daily intake of zinc for an adult is $15 \text{ mg}\cdot\text{day}^{-1}$, copper from $1,0$ to $1,5 \text{ mg}\cdot\text{day}^{-1}$ and manganese from $2,5$ to $5,0 \text{ mg}\cdot\text{day}^{-1}$,

it can be concluded by the results attained that the natural water also does not provide these quantities.

Keywords: Iodine, Natural Waters; Validation of Methods; Copper; Zinc; Selenium; Manganese.

Índice

Capítulo 1- Introdução	1
1.1 Objectivos	2
1.2 Estrutura da Dissertação	3
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 Critérios de Qualidade da Água	5
2.2 O Iodo.....	7
2.1.1 Propriedades	7
2.1.2 Equilíbrios em Solução Aquosa	9
2.1.3 Metabolismo.....	14
2.1.4 Métodos Analíticos	20
2.3 Metais Pesados.....	22
2.3.1 Propriedades	23
2.3.2 Metodo Analitico	26
2.4 Validação de Métodos.....	28
2.4.1 Avaliação Indirecta.....	28
2.4.2 Avaliação Directa: Exactidão	34
Capítulo 3 - Parte Experimental	37
3.1 Amostragem	38
3.2 Materiais e Métodos.....	39
3.2.1 Reagentes	39
3.2.2 Equipamento	40
3.2.3 Métodos.....	41
Capítulo 4 - Análise de Resultados	43
4.1 Iodo.....	44
4.1.1 Validação do Método “Leuco Cristal Violeta”	47
4.1.2 Teor de Iodo	61
4.2 Metais Pesados.....	64

4.2.1 Cobre.....	67
4.2.2 Manganês	70
4.2.3 Zinco	74
4.2.4 Conclusão.....	77
Capítulo 5 - Conclusões e Perspectivas Futuras	78
Referências Bibliograficas.....	82
Anexos	87

Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

CV	Coeficiente de Variação
CV _m	Coeficiente de Variação
CV _r	Coeficiente de Variação de Repetibilidade
DPR	Desvio Padrão Relativo
DS ²	Diferença de Variâncias
E _r	Erro Relativo
ETA	Estação de Tratamento de Águas
F	Distribuição de <i>Snedecor/Fisher</i>
ICCIDD	<i>International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders</i>
IDD	<i>Iodine Deficiency Disorders</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Materiais de Referencia Certificados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG	Teste das Variâncias
r	Limite da Repetibilidade
R _z	Limite da Precisão Intermédia
S _a	Desvio Padrão da Ordenada na Origem
S _b	Desvio Padrão do Declive
S _m	Desvio Padrão do Método

S_{ri}	Desvio Padrão Repetibilidade
S_i	Desvio Padrão da Precisão Intermédia
$S_{y/x}$	Desvio Padrão da Regressão
T_3	Triiodotironina
T_4	Tirosina
TSH	Hormona Estimuladora da Tiróide
UNICEF	<i>United Nations Children 's</i>
Uv-Vis	Ultravioleta-Visível
VMA	Valor Máximo Admissível
VMR	Valor Máximo Recomendado
ΔL	Acréscimo do Valor Lido
ΔC	Acréscimo da Concentração

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Capítulo 1- Introdução

O iodo foi um dos primeiros metais a ser reconhecido como elemento importante nas funções humanas. O iodo é um nutriente essencial, amplamente encontrado na natureza, mas em quantidades pequenas e que variam de uma zona geográfica para a outra (Navarro, A. M; *et al.*, 2008). A sua principal função no corpo humano é a participação na síntese das hormonas da tiróide (Ahmad, *et al.*, 1988; Takaku, Y. *et al.*, 1995; WaterAid, 2000). Desta forma, o iodo tem uma influência importante no organismo como um todo através de sua participação nos processos metabólicos (Takaku, Y. *et al.*, 1995). Geralmente a ingestão inadequada de iodo está associada à ocorrência de um grupo de situações clínicas denominadas de *Iodine Deficiency Disorders* (IDD) (WaterAid, 2000).

Dada a importância que o iodo possui na fisiologia da síntese das hormonas da tiróide e dado os impactos negativos que a sua deficiência pode provocar, a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a deficiência em iodo um problema sério de saúde pública no mundo, principalmente em grávidas e em crianças (WHO, 2007). Assim, tem vindo a propor-se planos para colmatar esta deficiência de iodo na água e nos alimentos, tal como a iodização do sal de cozinha, dado que os alimentos naturais não garantem uma ingestão adequada de iodo (WHO, 2007; Sood, A., *et al.*, 2009).

Inúmeros trabalhos de investigação revelaram que os metais pesados influenciam as hormonas, incluindo a actividade e a secreção da hormona da tiróide. Tem-se observado que a deficiência de zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn) e selénio (Se) afecta adversamente o sistema endócrino. As deficiências são geralmente devidas à diminuição da ingestão ou ao aumento da perda corporal destes elementos (Aihara, K., *et al.*, 1984).

A presença de espécies metálicas em águas naturais exerce um papel determinante na função biológica de muitos organismos. Determinados elementos metálicos podem apresentar toxicidade elevada para muitas formas de vida, enquanto outros são considerados essenciais, podendo contudo ser tóxicos quando presentes em concentrações elevadas (Templeton, D. M. *et al.*, 2000; Gunnar, F. N., 2007).

1.1 Objectivos

Dentro do contexto referido na secção anterior, o trabalho apresentado nesta dissertação tem por objectivo principal a determinação do teor de iodo através da espectroscopia ultravioleta-visível, pelo método “leuco cristal violeta”, em amostras de água destinadas ao consumo humano e relacionar a sua possível escassez com problemas da glândula tiróide.

Para que o objectivo principal fosse alcançado, foram estabelecidos vários objectivos específicos:

Adaptar e validar a metodologia para a determinação do teor de iodo através do método “leuco cristal violeta”.

Verificar a presença de outros metais (Zn, Mn, Se e Cu) através da determinação das suas concentrações nas águas analisadas, por espectrofotometria de absorção atômica com chama, utilizando lâmpadas de cátodo oco específicas para cada metal.

1.2 Estrutura da Dissertação

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. Neste primeiro capítulo são introduzidos os principais temas do trabalho fazendo-se o respectivo enquadramento no panorama actual. Os objectivos da dissertação serão também apresentados.

No capítulo 2 faz-se a revisão bibliográfica sobre os aspectos teóricos considerados necessários para a realização do trabalho proposto. Assim, faz-se uma abordagem aos aspectos encontrados na literatura referentes ao iodo, tais como as propriedades em solução aquosa, ou seja os equilíbrios que se verificam em função do pH na água a analisar. Também neste capítulo se considera a relação existente entre o iodo presente na água e o efeito provocado na população. De seguida, faz-se uma breve descrição dos principais métodos de quantificação do iodo em águas naturais.

O capítulo prossegue com a descrição dos metais em estudo (Zn, Cu, Se e Mn) onde é feita uma abordagem teórica relativamente à origem, toxicidade e enquadramento legal dos metais. Descreve-se também a importância e a relação de cada metal com o bom funcionamento da glândula tiróide, bem como o método utilizado na sua determinação, absorção atômica com chama.

Por último serão abordados os aspectos mais relevantes na validação de métodos.

No capítulo 3 encontram-se descrita a metodologia, material e equipamento utilizado na execução do trabalho experimental. Começa-se por fazer referência aos pontos de recolha das amostras, e uma abordagem à forma de preservar e de as conservar. De seguida são descritos os materiais e procedimentos adoptados para a realização dos ensaios laboratoriais.

Faz-se também referência aos métodos analíticos: quantificação do iodo por espectrofotometria de absorção molecular (Uv-visível) através do método “leuco cristal violeta” e quantificação de metais pesados, através da espectrofotometria de absorção atômica com chama.

O capítulo 4 expõe os resultados obtidos tendo em vista o cumprimento dos objectivos propostos e é efectuada a discussão dos mesmos.

Por último, no capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões deste trabalho e são dadas algumas sugestões para o trabalho futuro.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

2.1 Critérios de Qualidade da Água

A água destinada ao consumo humano deverá apresentar características de qualidade que garantam a sua potabilidade, e para isso, deverá, ser objecto de cuidados permanentes e adequados que são traduzidos por critérios para a qualidade da água, os quais passaram a ser quantitativos, em vez de qualitativos (Zuane, J., 1990). Eles compreendem a especificação dos parâmetros analíticos que deverão ser objecto de controlo. Assim, e como os metais pesados constituem contaminantes químicos nas águas, pois mesmo em pequenas concentrações trazem efeitos adversos à saúde, é necessário desenvolver cada vez mais e melhores técnicas para efectuar o seu controlo (Mendes, B., *et al.*, 2004).

Em Portugal, a legislação para garantir a qualidade da água tem vindo a sofrer ajustes ao longo do tempo. O Decreto-Lei nº 236/98 (Anexo A), foi uma primeira tentativa de regularização da situação nacional, referente à legislação da água para consumo humano, que estabelecia, segundo a origem e uso pretendido para a água, parâmetros de qualidade, valores limite, exigência de amostragem e caracterização analítica. Conforme o Anexo I do mesmo Decreto-Lei, a qualidade das águas doces superficiais destinadas ao consumo humano, classificam-se segundo os valores máximos recomendados e máximos admissíveis, VMR e VMA, respectivamente (DL 236/98). Este documento refere ainda a espectrofotometria de absorção atómica como o método analítico de referência para a análise dos metais presentes, na água para consumo humano. Contudo, e como previsto no Decreto-Lei nº 306/2007 (Anexo B), actualmente em vigor, os laboratórios de ensaios poderão recorrer a outros métodos analíticos desde que provem, junto da autoridade competente, que os resultados obtidos são, no mínimo, tão fiáveis como os que seriam obtidos pelos métodos especificados (DL 306/2007). As principais alterações introduzidas por este documento legal foram a criação do conceito de valor paramétrico, em detrimento dos VMR e VMA, correspondendo estes valores paramétricos ao anteriormente legislado por VMA. Contudo para alguns parâmetros, os valores paramétricos apresentem ligeiras alterações relativamente aos VMA disposto no anterior Decreto-Lei.

O Decreto-Lei nº 306/2007, classifica os parâmetros analíticos em três grupos: microbiológicos, químicos e indicadores; registando também algumas alterações como por exemplo: a inclusão de novos parâmetros no controlo da qualidade da água; a lista dos parâmetros a analisar e a criação de uma autoridade competente. Nele foram ainda estabelecidos novos limites para os parâmetros de controlo. Na Tabela 2.1 encontram-se os valores destes parâmetros relativos aos metais em estudo.

Tabela 2.1: Valores paramétricos dos metais em estudo para a água de consumo humano (adaptado do Decreto-Lei 306/2007).

Parâmetro	Valor Paramétrico	Unidade
Cobre	2,0	mg·L ⁻¹
Zinco	*	*
Selénio	10	µg·L ⁻¹
Manganês	50	µg·L ⁻¹

* Não existem valores paramétricos, na actual legislação, referentes ao Zinco.

2.2 O Iodo

2.2.1 Propriedades

O iodo foi descoberto pelo químico francês, Bernard Courtois, em 1811. O seu nome deriva do grego "iodes" que significa violeta ou roxo, que é a sua coloração na fase gasosa (AMR, 2010).

O iodo (I), apresenta número atómico igual a 53, massa atómica de 126,9, ponto de fusão de 114°C e ponto de ebulição de 183°C (Laurberg, S. A. P., *et al.*, 2009). É um sólido não-metálico à temperatura ambiente, que forma cristais brilhantes, de coloração violeta-escuro (Gray, L., 2005). Embora amplamente distribuído na biosfera, é geralmente classificado entre os elementos mais raros (Edmonds, J.S. e Morita, M., 1998). O iodo pertence ao grupo dos halogéneos (17 ou VII) da Tabela Periódica. Todos os halogéneos são muito reactivos, o que significa que formam compostos com outros elementos com bastante facilidade. Porém o iodo é o menos reactivo do grupo, e apresenta certas características metálicas. O arranjo dos electrões na camada electrónica externa determina a reactividade dos halogéneos (Gray, L., 2005).

O iodo é um elemento simples e as únicas espécies estáveis conhecidas são as que possuem massa de valor igual a 127. Existem 22 isótopos de iodo com massas entre 117 e 139, e 14 dessas emitem radiações significativas (Kirk-Othmer, 2005; Lazarus, J. H., *et al.*, 2009). Dissolve-se facilmente iodo em ciclohexano (C₆H₁₂), em clorofórmio (CHCl₃), em tetracloreto de carbono, (CCl₄), ou em disulfureto de carbono (CS₂), produzindo soluções de coloração violeta, todavia não se dissolve facilmente em água, e a solução apresenta uma coloração castanha (Gray, L., 2005). A explicação está no facto de as forças que mantêm as moléculas de água juntas serem muito mais fortes que as forças que mantêm juntas as moléculas de iodo. Quando o iodo é adicionado à água, as forças que se exercem entre as moléculas não conseguem vencer as forças entre as moléculas de água, logo as moléculas de iodo e água não se misturam completamente. Por sua vez quando é adicionado por exemplo ao ciclohexano, as forças que mantêm as moléculas de iodo juntas são mais fracas do que as forças que se verificam entre as moléculas de ciclohexano, logo estes misturam-se livremente. A solubilidade em água aumenta ao adicionar iodeto devido a formação do ião triiodeto (I₃⁻). Em soluções contendo amido, o iodo forma um complexo azul-escuro com o amido) (Gray, L., 2005).

Na Tabela 2.2 estão registados os valores de solubilidade do iodo em solventes orgânicos e na água.

Tabela 2.2: Solubilidade do iodo em solventes orgânicos e na água (adaptada de Kirk-O., 2005).

Solvente	Solubilidade (g·Kg ⁻¹) ^a
Benzeno	164,0
Dissulfureto de Carbono	197,0
Tetracloroeto de carbono	19,2
Clorofórmio	49,7
Ciclohexano	27,9
Acetato de Etilo	157,0
Álcool Etílico	271,1
Éter Etílico	337,3
Brometo de Etileno	115,1
Cloreto de Etileno	57,6
Glicerol	9,7
<i>n</i> -heptano	17,3
<i>n</i> -hexano	13,2
Álcool Isobutil	97,0
Isoctano	13,2
Tetracloroetileno	69,0 ^b
Tricloroetileno	182,5
Tolueno	79,0 ^b
<i>p</i> -xileno	198,3
Água	0,34

^a 25 °C.^b g/100 mL de solução.

O iodo não se encontra como um elemento puro na natureza. Encontra-se sempre combinado com outros elementos ou compostos (Hou, X., 2009).

O iodo ocorre disperso no ar, no solo, na água e nos organismos vivos. Na atmosfera, a concentração de iodo varia entre 0,2 a 10 ng·m⁻³ e encontra-se sob a forma de partículas de iodo, iodo inorgânico (I₂, HI, OHI) e iodo orgânico (CHI₃, CH₂I₂, CH₃CH₂CH₂I), cujas concentrações variam em função de outros parâmetros, tais como a estação do ano, a

localização geográfica e o clima (Hou, X., 2009). O iodo disperso no ar aumenta com a poluição decorrente da combustão de petróleo e de carvão e seus derivados.

O iodo é encontrado na água do mar na forma de iodeto de sódio (NaI), e nos compostos petrolíferos, na forma de iodeto de potássio (KI). É extraído industrialmente das águas salgadas dos poços de petróleo e é um subproduto resultante do processo de obtenção do salitre do Chile, em cujos depósitos se encontra na forma de iodato de sódio (NaIO₃). Está presente em pequenas quantidades nos tecidos orgânicos animais e vegetais, mas é abundante nas algas marinhas. É encontrado em todos os tecidos e fluídos do corpo, e provavelmente em todas as células, mas a maior concentração, está na glândula tireóide (Gray, L., 2005).

O corpo humano necessita somente de uma pequena quantidade deste elemento para manter os seus processos químicos, denominados colectivamente de metabolismo, que ocorrem no interior das células.

O iodo está intimamente ligado à regulação das funções da tireóide no corpo humano e, em solução alcoólica (tintura de iodo), era usado como anti-séptico até que se descobriu que retardava o restabelecimento dos tecidos. Diversos sais de iodo são utilizados no tratamento de doenças como arteriosclerose, hipertensão arterial, sífilis, bronquite crónica e algumas formas de artrite (Edmonds, J.S. e Morita, M., 1998).

O iodeto de potássio e o iodato de potássio, são adicionados ao sal comum, NaCl, para prevenir o surgimento do bócio endémico, doença causada pelo défice de iodo na dieta alimentar.

2.2.2 Equilíbrios em Solução Aquosa

Como foi referido anteriormente, o iodo está presente naturalmente na água. A água do mar apresenta a maior concentração de iodo, cerca de 60 ppb, mas varia de lugar para lugar. Os rios geralmente contêm cerca de 5 ppb de iodo e em fontes minerais alguns ppm podem também ser encontrados. As plantas apresentam apenas alguns traços de vestígios de iodo, excepto as algas marinhas nas quais o mineral se encontra concentrado (Laurberg, S. A. P., *et al.*, 2009).

O iodo não pode ser encontrado como um elemento, mas encontra-se na forma molecular, I₂, e iónica: iodeto (I⁻) e iodato (IO₃⁻) (Hemat, R.A.S., 2009, Ito, K., *et al.*, 2009). Na água do mar, o iodo existe principalmente como iodeto, iodato, e como iodo orgânico encontrando-se este último em menor quantidade, variando com a localização geográfica e com a profundidade (Ito, K., *et al.*, 2009). Em água doce, o iodo também existe sob a forma de iodato, iodeto e iodo orgânico, sendo a concentração deste último normalmente mais elevada neste tipo de água (Hou, X., 2009). A Tabela 2.3 apresenta as espécies de iodo presentes na natureza bem como as suas principais fontes.

Tabela 2.3: Espécies de Iodo na Natureza (adaptada de Hou, X., 2009).

Nome	Formula Química	Fonte
Iodeto	I ⁻	Água, plantas, animais
Iodato	IO ₃ ⁻	Água
Iodo Elementar	I ₂	Ar
Periodato	IO ₄ ⁻	Água
Hipiodito	IO ⁻	Ar, água
Iodeto de Metilo	CH ₃ I	Ar, água
Di-iodeto de Metilo	CH ₂ I ₂	Ar, água
Iodeto de Etilo	C ₂ H ₅ I	Ar, água
Iodeto de Propilo	C ₃ H ₇ I	Ar, água
Iodeto de Butilo	C ₄ H ₉ I	Ar, água
Triiodotironina	T ₃	Animais, plantas, leite
Tiroxina	T ₄	Animais, plantas, leite
Monoiodotirosina	MIT	Animais, plantas, leite
Diiodotirosina	DIT	Animais, plantas, leite
Triiodotironina Reversa	rT ₃	Animais, plantas, leite
Partículas associadas ao Iodo	-	Ar, água

As principais espécies de iodo presentes em solução aquosa são apresentadas na Tabela 2.4. assim como a constante de equilíbrio, K_{eq} , associada a respectiva reacção. A primeira reacção (a) corresponde à hidrólise do iodo elementar (I_2) a iodeto (I^-) e ácido hipiodoso (HOI) (Wehrli, B., *et al.*, 2000). A valores de pH elevados, o ácido hipiodoso (HOI) dissocia-se para formar o hipiodito (OI^-) com pKa de 10,4. A pH baixo, o H_2OI^+ é formado por protonação do HOI (pKa = 1,4). As concentrações de equilíbrio destas espécies para uma concentração de iodo total de 1 μM ($250 \mu g \cdot L^{-1}$) são mostrados na Figura 2.1. A pH baixo, o iodo, é a espécie dominante, enquanto a pH neutro ou ligeiramente básico, o HOI e o I^- tornam-se as espécies predominantes e a pH > 10 o OI^- é formado a partir HOI. A quantidade relativa de HOI e OI^- aumenta com a diminuição da concentração de iodo. Para I_2 total $\leq 100 \text{ nM}$ ($25 \mu g \cdot L^{-1}$), $[HIO] + [OI^-] > [I_2]$ para qualquer pH > 5 (Wehrli, B., *et al.*, 2000).

Tabela 2.4: Reacções das espécies de iodo aquoso (adaptada de Wehrli, B., *et al.*, 2000).

Reacção	K_{eq}
(a) $I_2 + H_2O \rightleftharpoons HOI + I^- + H^+$	$5,44 \times 10^{-13}$
(b) $3 HOI \rightleftharpoons IO_3^- + 2I^- + 3H^+$	6×10^{-11}
(c) $I_2 + I^- \rightleftharpoons I_3^-$	725

A Figura 2.1 apresenta, a distribuição das espécies de iodo na água em função do pH e da concentração inicial, a 25 °C (Wehrli, B., *et al.*, 2000).

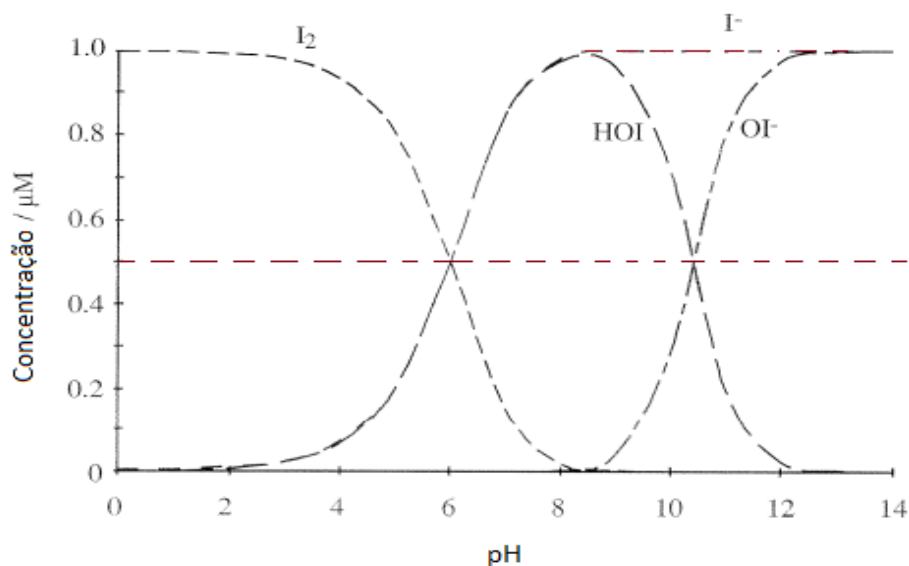


Figura 2.1: Espécies de iodo, em função do pH (concentração de iodo total, 1 μM) (adaptada de Wehrli, B., *et al.*, 2000).

O ácido hipiodoso, HOI, pode continuar a reagir através de um desproporcionamento de IO_3^- e I^- (b). O equilíbrio desta reacção, que não foi considerado na Figura 2.1, situa-se a mais de 99 % sobre o lado direito para as seguintes condições ambientais: $\text{pH} \geq 6$, iodo total $< 2 \mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$ ($250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). A pH baixo, o IO_3^- pode ser protonado a ácido iódico ($HI O_3$), que tem um pK_a de 0,8. O ião periodato (IO_4^-) pode formar-se através da oxidação electroquímica do IO_3^- num ânodo de óxido de chumbo (IV), PbO_2 (Wehrli, B., *et al.*, 2000).

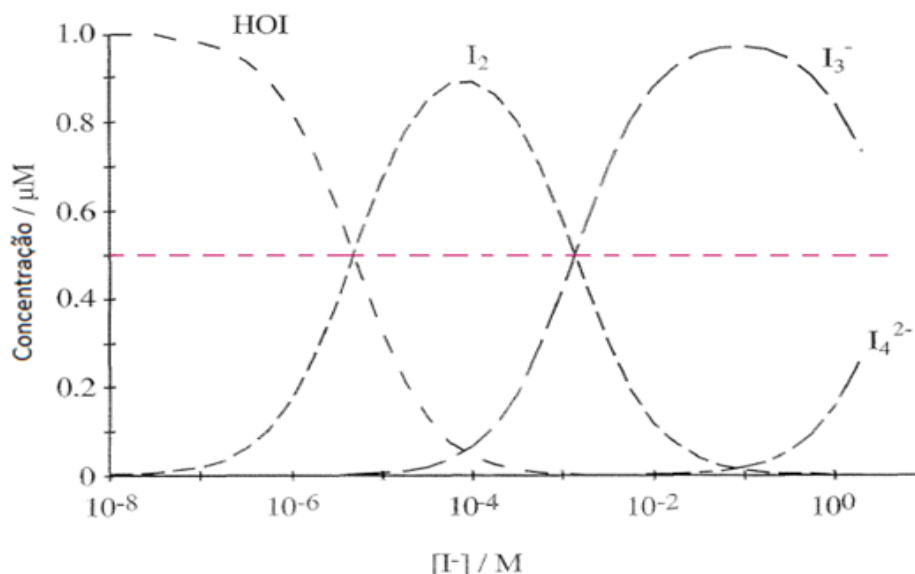


Figura 2.2: Especiação de HOI a 1 μM e $\text{pH}=7$, para diferentes concentrações de iodo livre (adaptada de Wehrli, B., *et al.*, 2000).

O iodo (I_2) é transformado em triiodeto (I_3^-) na presença de I^- (c). O I_2 , HOI, e OI^- são todos transformados em (I_3^-) quando a concentração de iodeto é igual a 0,1 M e $\text{pH} \leq 11$. A Figura. 2.2 evidência para diferentes concentrações de iodetos livres a especiação de HOI para $\text{pH}=7$; mostra também que para concentrações de iodeto menores que 10^{-6} M, o HOI é a espécie dominante. Pode observar-se que com o aumento da concentração de iodetos se formam as seguintes espécies, I_2 , I_3^- , e I_4^{2-} (Wehrli, B., *et al.*, 2000).

Na Tabela 2.5, pode ver-se que para além do I_3^- e do I_4^{2-} outros aniões tais como I_5^- e do I_6^{2-} podem ser formados através de reacções com I^- , I_2 e I_3^- . Compostos como por exemplo: ICl , ICl_2^- , I_2Cl^- , IBr , IBr_2^- , I_2Br^- , podem ser formados a partir de HOI e I^- , na presença de Cl^- e Br^- , respectivamente. De forma semelhante ao I_3^- , estes compostos têm coeficientes de absorção elevados (Wehrli, B., *et al.*, 2000). As constantes de equilíbrio, K_{eq} , correspondentes à formação das espécies onde o iodo está presente são referenciadas na mesma Tabela.

Tabela 2.5: Constantes de equilíbrio correspondentes à formação de compostos halogenados a 25 ° C (adaptada de Wehrli, B., *et al.*, 2000).

Equilíbrio	K_{eq}	Força Iônica/M
$I_3^- + I^- \rightleftharpoons I_4^{2-}$	0,184	2
$I_3^- + I_2 \rightleftharpoons I_5^-$	9	-
$2I_3^- \rightleftharpoons I_6^{2-}$	0,41	0,023
$ICl_2^- \rightleftharpoons ICl + Cl^-$	0,013	0,5 – 1,0
$I_2 + Cl^- \rightleftharpoons I_2Cl^-$	1,7	-
$ICl + H_2O \rightleftharpoons HOI + Cl^- + H^+$	$8,2 \times 10^{-5}$	0,5
$IBr_2^- \rightleftharpoons IBr + Br^-$	0,035	1,0
$IBr \rightleftharpoons I^- + I_2Br^-$	2×10^{-6}	1,0
$IBr + H_2O \rightleftharpoons HOI + Br^- + H^+$	$2,4 \times 10^{-7}$	0,5

2.2.3 Metabolismo

A importância biológica do iodo deriva do facto de ser um componente essencial das hormonas da tiróide. Na verdade, considera-se que essa é a sua principal função no organismo humano. A biossíntese destas hormonas é um processo que ocorre na glândula tiróide, que se encontra localizada na base do pescoço, abaixo da laringe e consiste em dois lóbulos unidos por uma "ponte" que circunda a parte frontal da traquéia. Esta glândula tem a função de formar e armazenar as hormonas, que as libertará segundo as necessidades do organismo. Estas hormonas são a triiodotirosina ou triiodotironina e a tetraiodotironina, que abreviadamente se denominam como T_3 e T_4 , respectivamente. A tetraiodotironina também é conhecida como tiroxina. Deve-se acrescentar que tanto a biossíntese como a libertação destas hormonas são estimuladas pela tireotrofina ou TSH, que se liberta na glandula pituitaria (Samoza, M. A., 2001).

O processo biossintético das hormonas T_3 e T_4 , que é mostrado na Figura 2.3, pode resumir-se como descrito a seguir.

A primeira etapa na formação destas hormonas consiste na captação de iodeto plasmático que é transportado activamente do sangue para as células glandulares da tiróide. Esse processo é estimulado pela TSH, e é frequentemente chamado de "mecanismo de concentração de iodeto" ou "mecanismo de captura de iodeto", e resulta numa concentração de iodeto na tiróide. Em seguida, ocorre a oxidação dos iões iodeto a iodo, promovida pela enzima peroxidase, que tem a capacidade de se combinar directamente com o aminoácido tirosina. A tirosina, é um constituinte da molécula da tireoglobulina e é o principal substrato que se combina com o iodo para formar as hormonas da tiróide (Samoza, M. A., 2001).

Este iodo livre, activo, reage rapidamente com os resíduos Tyr da proteína tireoglobulina, formando-se assim resíduos de monoiodotirosina (MIT ou T_1) e de diiodotirosina (DIT ou T_2) que, por enquanto, continuam ligados à cadeia peptídica da tireoglobulina. O passo a seguir consiste na reacção dos resíduos de T_2 , com os resíduos de T_1 e T_2 , para formar T_3 e T_4 , respectivamente, que ainda continuam a fazer parte da tireoglobulina (Samoza, M. A., 2001).

Enquanto não for necessária a sua libertação, a T_3 e a T_4 permanecem armazenadas na glândula, como resíduos, na tireoglobulina. Quando o organismo precisa de T_3 e T_4 , num processo catalisado por enzimas proteolíticas, libertam-se ambas as hormonas, passando através de difusão simples à corrente sanguínea para o seu transporte e distribuição.

Deve-se acrescentar que estas hormonas não circulam livremente no plasma, sendo que a maioria está ligada a globulinas e às albuminas plasmáticas. Como já foi indicado, todos estes processos correspondem a reacções enzimáticas e são regulados pela TSH. Finalmente, a T_3 e a T_4 separam-se das proteínas que as transportam para actuar sobre as células do corpo, podendo assim, estas proteínas, captar novas moléculas da hormona e transportá-las (Samoza, M. A., 2001).

Assim, na tiróide podemos encontrar diferentes espécies de iodo: iodeto, iodo livre, T_3 e T_4 , além de tireoglobulina, com resíduos de T_1 , T_2 , T_3 e T_4 . No plasma sanguíneo porém, ter-se-á maioritariamente T_4 estando a T_3 em menor concentração.

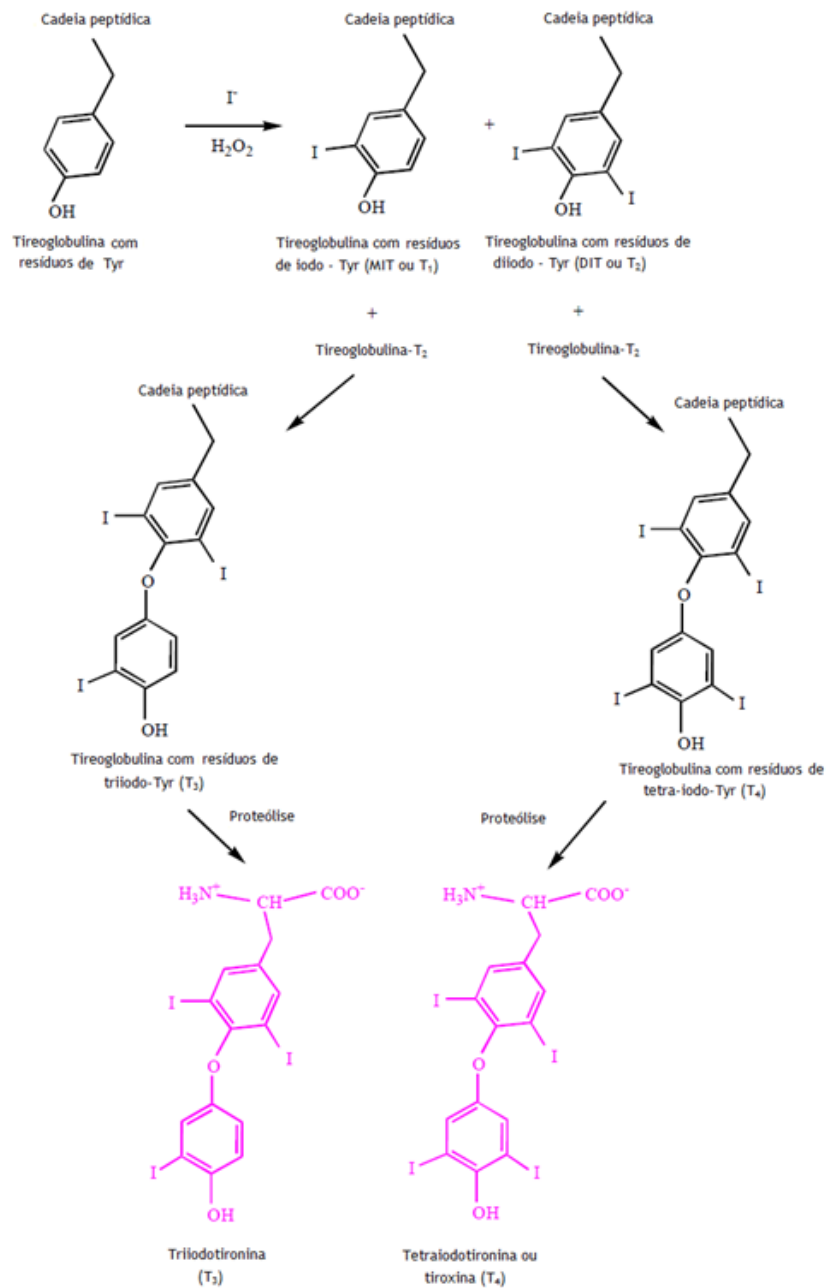


Figura 2.3: Biossíntese das hormonas da tiróide T_3 e T_4 (adaptada de Samoza, M. A., 2001).

Em suma, o iodo é um elemento essencial para a formação de tiroxina (T_4) e de triiodotironina (T_3), duas hormonas da tiróide que são importantes para o metabolismo celular, a temperatura corporal, a reprodução e o crescimento (Panneels, V., *et al.*, 2009; Navarro, A. M., *et al.*, 2008; Vanacor, R., 2007).

Uma dieta inadequada em iodo está associada a um vasto espectro de doenças agrupadas sob a denominação de *Iodine Deficiency Disorders* (IDD) (Duarte, G.C. *et al.*, 2004; WaterAid, 2000). A deficiência de iodo é muito mais frequente nas mulheres que nos homens e é considerado um problema de saúde pública que se verifica em todo o mundo, afectando principalmente as grávidas e as crianças. A doença mais frequentemente associada à deficiência de iodo é o hipotiroidismo vulgarmente designado por bócio (Duarte, G.C. *et al.*, 2004; Lin, C. C., *et al.*, 2009; Shah, M. *et al.*, 2005; Vanacor, R., 2007). Por outro lado, o consumo excessivo de iodo pode levar ao aumento de doenças auto-imunes da tiróide, que surgem quando o próprio organismo passa a fabricar anticorpos que destroem a própria glândula tiróide, conduzindo ao hipertiroidismo (Vanacor, R., 2007).

Na Tabela 2.6 estão resumidas as principais doenças provocadas pela falta de iodo (hipotiroidismo), e também pelo seu excesso (hipertiroidismo), bem como os atrasos físicos e mentais que se verificam em situações de hipotiroidismo.

Tabela 2.6: Doenças relacionadas com o metabolismo do iodo na tiróide (adaptada de WHO, 2007).

Feto	Abortos Prematuridade Anomalias congénitas Aumento da mortalidade perinatal Cretinismo endémico
Recém-nascido	Hipotiroidismo neonatal Atraso mental Aumento da susceptibilidade da glândula tiróide à radiação nuclear
Criança e Adolescente	Bócio Hipotiroidismo Hipertiroidismo Deterioração da função mental Desenvolvimento físico retardado Maior susceptibilidade da glândula tiróide à radiação nuclear
Adulto	Bócio Hipotiroidismo Deterioração da função mental Hipertiroidismo espontâneo em idosos Hipertiroidismo (iodo induzido) Aumento da susceptibilidade da glândula tiróide à radiação nuclear

A estratégia sugerida pela Organização Mundial de Saúde, para colmatar as necessidades de iodo é através da suplementação deste metalóide nos alimentos, nomeadamente no sal de cozinha, havendo um consenso de que a iodização do sal é a melhor forma de reposição de iodo, uma vez que é considerado o modo mais seguro, rentável e sustentável de garantir a ingestão adequada de iodo pela população mundial (Rädlinger, R., *et al.*, 1998; Vanacor, R., 2007).

São muitos os países que já aderiram aos programas de iodização do sal. A Tabela 2.7 resume os planos de iodização do sal nos diferentes países, o ano em que foram adoptados estes mesmos planos assim como, os teores de iodo adicionados sob a forma de iodato e iodeto.

O uso de sal iodado é voluntário em dezasseis dos países assinalados nesta Tabela 2.7, em treze destes é obrigatório e sete países ainda não têm legislação sobre os requisitos de iodo. A utilização de sal iodado na indústria é permitida apenas na Alemanha, Holanda e Suíça (WHO, 2007). Actualmente, existe uma diversidade muito grande nos aspectos legislativos e na respectiva regulamentação de um país para o outro.

Tabela 2.7: Regulamentação do sal iodado na Europa (adaptada de WHO, 2007).

País	Legislação	Ano Inicial e Quantidade de lodo (ppm)	Revisão mais Recente ^a	Substâncias Permitidas (iodato e iodeto)	Quantidade de lodo (ppm)	Condição da Legislação ^b
Albânia	Não	1997 ^c	-	Iodeto	75	-
Alemanha	Sim	1981 ^e	2001	Iodato	15-20	V
Andorra	-	-	-	-	-	-
Áustria	Sim	1963 (10)	1999	Ambos	15-20	O
Bélgica	Sim	1990	1992	Ambos	6-45	V
Bósnia e Herzegovina	Sim	1953	1998	Iodeto	20-30	O
Bulgária	Sim	1958	1997	Iodato	22-58	O
Chipre	-	-	-	-	-	-
Croácia	Sim	1953	1999	Iodeto	25	O
Dinamarca	Sim	1999	2001	Iodeto	13	O
Eslovénia	Sim	1953 (10)	1999	Iodeto	25	O
Espanha	Sim	1982 (60)	2000	Ambos	51-69	V
Estónia	-	-	-	Ambos	-	-
Eslováquia	Sim	1966 (19)	1999	Iodeto	25 ± 10	O
Finlândia	Não	1963 (25) ^d	1998	Iodeto	25	V
França	Sim	1952 (10-15)	1997	Iodeto	10-15	V
Grécia	Sim	1963	2000	Iodeto	40-60	V
Holanda	Sim	1968 (3-8)	1998-1999	Ambos	30-40	V
Hungria	Não	-	1999	Ambos	10-20	V
Irlanda	Não	-	1992	Iodeto	25	-
Islândia	-	-	-	-	-	-
Itália	Sim	1972 (15)	1997	Ambos	30	V
Letónia	Sim	-	-	Ambos	-	V
Liechtenstein	-	-	-	-	-	-
Lituânia	Sim	2003	2004	Ambos	20-40	O
Luxemburgo	Não	-	2000	Ambos	10-25	-
Malta	-	-	-	-	-	-
Mónaco	-	-	-	-	-	-
Noruega	Sim	-	1992	Iodeto	5	V
Polónia	Sim	1935 (5)	1999	Iodeto	30 ± 10	O, P
Portugal	Sim	1969 (20)	1996	Iodato	25-35	V
Reino Unido	Não	-	1992	Iodeto	10-22	V
República Checa	Sim	1950	1999	Iodato	27-42	V
República da Macedónia	Sim	1999	1999	Iodato	20-30	O
Roménia	Sim	1956 (15-25)	2002	Iodato	34 ± 8	O
San Marino	-	-	-	-	-	-
Sérvia e Montenegro	Sim	1951	2000	Iodeto	20	O
Suécia	Sim	1936 (10)	1999	Iodeto	40-70	V
Suíça	Sim	1922 (1,9-3,75)	2002	Ambos	20-30	V
Turquia	Sim	1999	2002	Iodeto/Iodato	40-70/20-40	O

- Sem dados;

^a Referente aos dados disponíveis mais recentes durante o período considerado;

^b V, voluntário; O, obrigatório; P, parcial;

^c Decreto que proíbe a importação de sal não iodado;

^d Recomendação;

^e Declaração.

O teor de iodo, $\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$, recomendado pela Organização Mundial de Saúde, em parceria com a *United Nations Children's*, UNICEF, e o *International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders*, ICCIDD, são apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8: Recomendações de ingestão diária de iodo (adaptada de Vanacor, R., 2007).

Grupos	Ingestão de Iodo	
	$\mu\text{g}/\text{dia}$	$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$
Crianças de 0-59 meses	90	6,0 – 30
Crianças de 6-12 anos	120	4,0
Adolescentes e adultos	150	2,0
Mulheres Grávidas	200	3,5
Mulheres Amamentando	200	3,5

De acordo com a OMS, aproximadamente 31 % da população mundial apresenta deficiência de iodo. Na Europa e em África cerca de metade da população apresenta carência, cuja percentagem é 52,0 % e 41,5 % respectivamente. Por outro lado, a América é o continente menos afectado (11,0 %) (WHO, 2007).

A Tabela 2.9 indica a situação de alguns países relativamente à ingestão de iodo na Europa, onde se verifica que Portugal apresentava uma deficiência moderada.

Tabela 2.9: Ingestão de iodo na Europa (adaptada de O'Hare *et al.*, 1998).

Quantidade Suficiente	Deficiência Moderada	Deficiência Moderada a Severa
Áustria	Bélgica	Bulgária
Suíça	Inglaterra	Alemanha
Noruega	Checoslováquia	Grécia
Suécia	Dinamarca	Itália
Finlândia	França	Polónia
	Hungria	Roménia
	Holanda	Espanha
	Irlanda	
	Portugal	
	Jugoslávia	

2.2.4 Métodos Analíticos

Assume-se, geralmente, na maioria dos métodos que as espécies de iodo presentes nas amostras de água natural são o iodeto (I^-) e o iodato (IO_3^-) e, conseqüentemente, a determinação destas duas quantidades corresponde ao iodo total (Edmonds, J.S. e Morita, M., 1998). De todos os elementos químicos que existem na água do mar o iodo é o elemento químico que existe em menor quantidade, sob a forma de iodeto (I^-) e iodato (IO_3^-). O iodato é considerado a forma termodinamicamente mais estável em águas oxigenadas e por isso teoricamente o iodeto não deve ser detectado em águas superficiais (Tian, R.C. e Nicolas, E., 1994).

Os principais métodos analíticos usados para a determinação do iodo e que estão normalizados são a espectrofotometria de absorção molecular, Uv-Vis, e o método catalítico (S.M., 2005). No entanto, a literatura faz referência a outros métodos, métodos electroquímicos, cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (Edmonds, J.S. e Morita, M., 1998).

▪ Espectrofotometria Ultravioleta-Visível

A espectrofotometria na faixa do ultravioleta e visível (UV-Vis) é das técnicas analíticas mais utilizadas nos últimos cinquenta anos. Baseia-se na propriedade que têm muitas espécies químicas de absorver determinados comprimentos de onda da radiação ultravioleta-visível (Leal *et al.*, 2008).

A fracção do espectro electromagnético compreendida entre 400 e 750 nm é denominada região do visível. Esta região é utilizada com frequência na determinação de inúmeras substâncias que formam soluções coloridas. Já a região do ultravioleta estende-se de 200 a 400 nm (Vieira, K. M., 2011). As regiões do espectro electromagnético estão definidas na Figura 2.4.

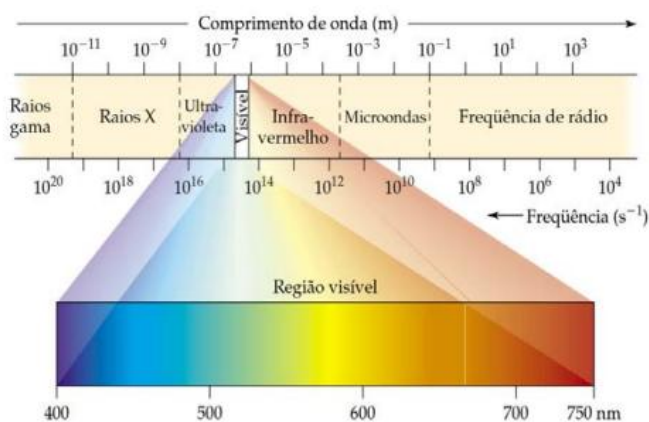


Figura 2.4: Espectro electromagnético (adaptado de Vieira, K. M., 2011)

A intensidade da absorção não é directamente mensurável, mas ela determina uma atenuação da radiação que incide na amostra que pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente (Leal *et al.*, 2008). Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução contendo uma espécie absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida, a parte restante atravessa o meio (Freitas, S. K. B., 2006). Designa-se de potência radiante, a quantidade de energia transportada por segundo através de uma unidade de secção transversal. A razão entre potência da radiação transmitida (P) e a potência da radiação incidente (P₀) é denominada de transmitância (T), que representa, portanto, a fracção da potência da radiação incidente que é transmitida pela solução (Skoog, D. A., *et al.*, 2001a, Leal *et al.*, 2008).

A lei que estabelece uma relação entre a absorvância (A), que corresponde ao inverso do logaritmo decimal da transmitância, com a concentração da espécie absorvente é conhecida como Lei de Lambert - Beer, cuja expressão matemática é dada pela Equação 2.1 (Leal *et al.*, 2008; Freitas, S. K. B., 2006; Skoog, D. A., *et al.*, 2001a):

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (2.1)$$

onde:

ϵ é a absorvidade molar do analito (cm⁻¹ · mol⁻¹ · L);

b é o comprimento do caminho óptico (cm);

c a concentração da substância absorvente (mol · L⁻¹).

A espectrofotometria UV-Vis é uma das técnicas analíticas mais utilizadas, dada a sua robustez, custo relativamente baixo e elevado número de aplicações desenvolvidas.

Método Espectrofotométrico “Leuco Cristal Violeta”

O método “leuco cristal violeta” determina o iodo aquoso sob a forma de iodo elementar e ácido hipiodoso. Embora o método utilize a soma do poder oxidante de todas as formas residuais de iodo activo, os resultados são expressos em iodo total. Este método também determina a soma das concentrações de iodo e de iodeto. Contudo, a concentração do iodeto pode ser determinado separadamente (S.M., 2005). Neste método o cloreto de mercúrio (HgCl₂), adicionado às soluções aquosas, provoca a hidrólise completa do iodo formando-se estequiometricamente o ácido hipiodoso. O composto N,N- dimetilnilina, conhecido pelo nome comum de “leuco cristal violeta”, reage imediatamente com o ácido hipiodoso para formar corante cristal violeta. A absorvância máxima da solução desenvolvida com o corante “leuco cristal violeta” na faixa de pH 3,5 a 4,0 é medida ao comprimento de onda de 592 nm. Verifica-se a Lei de Lambert Beer para uma ampla gama de concentrações de iodo, mantendo-se a cor desenvolvida estável durante várias horas (S.M., 2005).

▪ Método Catalítico

O iodeto pode ser determinado pela sua capacidade de catalisar a redução de iões cério pelo ácido arsenioso. O efeito é proporcional à quantidade de iodo presente na amostra que se pretende analisar. A reacção é interrompida após um intervalo de tempo específico, pela adição de sulfato ferroso amoniacal. Os iões férrico, resultantes são directamente proporcionais aos iões restantes de cério e produzem um complexo corado, relativamente estável, com tiocianato de potássio (S.M., 2005).

A acção catalítica do iodo na reacção entre o ácido arsenioso e o sulfato cério em solução ácida de ácido sulfúrico pode ser usada para quantificar tanto o iodo como o iodeto. Este método quantifica o iodeto ou o iodo total, em função do potencial de oxidação redução da mistura presente na água (S.M., 2005).

O método catalítico, para a determinação de iodeto, baseia-se na capacidade do iodeto de redução de iões cério pelo ácido arsenioso é a base do método recomendado pelo *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, para as amostras contendo menos de 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Edmonds, J.S. e Morita, M., 1998).

2.3 Metais Pesados

A designação de metal pesado, frequentemente utilizada na classificação dos elementos minerais, não possui uma definição única, variando de acordo com o ramo da ciência que o aborda (Catarino, S., *et al.*, 2008). A ideia comum às diferentes áreas é a de serem metais ou não metais que apresentam uma densidade relativamente alta, aproximadamente igual ou superior a $5\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, e estarem associados à poluição e à toxicidade do meio ambiente, fazem parte deste grupo o chumbo (Pb), o cádmio (Cd), o mercúrio (Hg) e o arsénio (As) (Alloway, 1995). Também se incluem outros elementos considerados biologicamente essenciais, caso se apresentem em baixas concentrações, como o cobalto (Co), o cobre (Cu), o manganês (Mn), o selénio (Se) e o zinco (Zn) (Gunnar, F. N., *et al.*, 2007).

Assim, o conceito de metais pesados não implica necessariamente serem “metais tóxicos”, a essencialidade (concentração óptima) ou toxicidade do elemento depende da concentração em que este se apresenta, sendo muitos deles considerados nutrientes indispensáveis aos seres vivos, desde que em baixas concentrações (Alarcón-Corredor, O.M., 2009).

Normalmente os intervalos de concentração que determinam a carência, a essencialidade e a toxicidade destes elementos, são extremamente curtos e estão representados na Figura 2.5. Assim, é necessário conhecer a concentração dos elementos com adequada precisão e exactidão, uma vez que os respectivos intervalos são apertados.

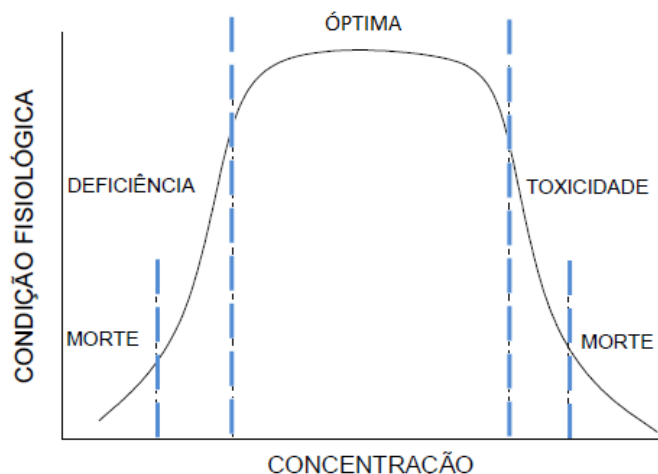


Figura 2.5: Variação da condição fisiológica de um organismo humano em função da concentração dos elementos essenciais traço (adaptada de Vandecasteele, C.; Block, C. B., 1997).

Os metais pesados aparecem nas águas naturais devido à contaminação por efluentes industriais nomeadamente de indústrias químicas, de peles e produtos similares, lavandarias e dos processos industriais petrolíferos (Gunnar, F. N., *et al.*, 2007). Os metais pesados constituem contaminantes químicos nas águas, uma vez que mesmo em concentrações diminutas provocam efeitos adversos à saúde humana (Gunnar, F. N., *et al.*, 2007).

2.3.1 Propriedades

▪ Cobre

O cobre nas águas ocorre de forma natural, em concentrações inferiores a $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Se o estiver presente em concentrações superiores a $1 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ pode provocar um sabor metálico acentuado às águas; a formação de precipitados de hidróxido de cobre, que turvam a água e levar ao escurecimento de alguns alimentos no decurso da cozedura. Quando a concentração se situa entre 5 e $8 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ torna a água praticamente impossível de ser consumida (Suess, M. J., 1982). Os valores máximos fixados para o cobre na água de consumo devem-se a razões de carácter organoléptico, não estando directamente relacionados com riscos para a saúde (Zuane, J., 1990).

O cobre é um micronutriente essencial para todos os organismos, sendo considerado um elemento essencial para o homem enquanto activador de sistemas enzimáticos, contribuindo para a regeneração da hemoglobina do sangue. Tem também um papel importante na activação ou repressão da transcrição dos genes; no entanto, pode também ter efeitos adversos, tais como provocar danos nos rins e fígado e ainda distúrbios gastrointestinais (Catarino, S., *et al.*, 2008). Do ponto de vista endócrino, na quantidade certa, o cobre restabelece o normal funcionamento da tiróide, da hipófise e das glândulas genitais (Suess, M. J., 1982; Zuane, J., 1990). O cobre desempenha um papel importante no metabolismo da tiróide, especialmente na produção e absorção hormonal. O cobre estimula a produção das hormonas tiroxina (T_4), e evita a absorção excessiva de T_4 nas células sanguíneas através do

controlo dos níveis de cálcio existentes no organismo (o cálcio é necessário para a estabilização das membranas celulares e reduz a permeabilidade celular). Os humanos necessitam de ingerir uma quantidade diária de 1,0 a 1,5 mg (Venezuela, T. C., 2001). Apesar da água de consumo poder apresentar concentrações significativas de cobre, geralmente esta não contribui de forma significativa para a ingestão total deste metal, sendo as necessidades do homem fundamentalmente garantidas através da alimentação (Suess, M. J., 1982; Zuane, J., 1990).

▪ Manganês

O manganês (Mn) está entre os metais mais abundantes na natureza (Soldin, O. P., *et al.*, 2007). O seu comportamento nas águas é muito semelhante ao do ferro, porém a sua ocorrência é mais rara. O manganês geralmente está presente em águas naturais superficiais em quantidades bastante pequenas, $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ou menos. Quantidades mais elevadas podem ocorrer em águas subterrâneas, em lagos e em reservatórios (Anjos, A.P., 1992). O manganês provoca coloração negra na água, podendo-se apresentar nos estados de oxidação (+2), forma mais solúvel, e (+4), forma menos solúvel. É um nutriente essencial no entanto pode ser potencialmente tóxico quando presente em teores elevados (Venezuela, T. C., 2001). Sendo constituinte e co-factor de inúmeras enzimas, ele desempenha um papel importante numa série de processos fisiológicos nos mamíferos. A enzima que contém manganês, superóxido dismutase de manganês (Mn-SOD), é a principal enzima antioxidante que neutraliza os efeitos tóxicos de espécies reactivas de oxigénio. Outras enzimas que contêm manganês incluem oxidoreductases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e glutamina sintetase (Soldin, O. P., *et al.*, 2007). A exposição ambiental a teores elevados de manganês pode originar neuropatia, uma doença que é semelhante à doença de Parkinson e é vulgarmente designada por manganismo. A dopamina, um neurotransmissor importante, desempenha um papel crucial na modulação da função cognitiva (Soldin, O. P., *et al.*, 2007; Venezuela, T. C., 2001). A dopamina é também um inibidor da secreção da hormona estimulante da tiróide (TSH). Supõe-se que a exposição excessiva ao manganês pode provocar efeitos adversos no desenvolvimento neurológico, devido à ruptura da homeostase da tiróide através da perda de controlo dopaminérgico da regulação TSH das hormonas da tiróide. Embora os efeitos do manganês na população adulta estejam relativamente bem documentados, são escassos os dados sobre os seus efeitos no desenvolvimento neurológico. Postula-se assim, a hipótese de que o manganês pode, directa ou indirectamente, afectar a função tiroidiana por lesar a glândula tiróide ou desregular a modulação dopaminérgica da síntese da hormona tiroidiana (Soldin, O. P., *et al.*, 2007). Não há uma quantidade diária estabelecida para a ingestão deste mineral, contudo considera-se que $2,5$ a $5,0 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$ satisfaçam as necessidades de um adulto.

▪ Zinco

Toxicologicamente, o zinco é insignificante para o homem, pois pode estar presente em águas potáveis em concentrações na ordem de $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ sem causar problemas (Gray, N. F., 1994). O zinco é um elemento essencial para o crescimento, porém, em concentrações acima de $5,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, confere sabor à água e uma certa opalescência a águas alcalinas. Entretanto, é preciso ressaltar que o zinco em quantidades adequadas é um elemento essencial e benéfico para o metabolismo humano, sendo que a actividade da insulina e diversos compostos enzimáticos dependem da sua presença (Wei, L., *et al.*, 2008; Júnior, 2002). Considera-se que a ingestão diária recomendada para adultos é de $15 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$. A deficiência de zinco ocasiona, inicialmente, uma mobilização das reservas funcionais e, com a deficiência prolongada, podem ocorrer problemas tais como: anorexia, atraso no crescimento, intolerância à glicose, lesões oculares, impotência sexual, disfunções imunológicas e hipotireoidismo (Júnior, 2002).

O zinco também é necessário para prevenir problemas da tiróide (Arthur, J. R., *et al.*, 1999), estando envolvido no processo que converte as hormonas inactivas T_4 em hormonas activas T_3 (Al-Juboori, I. A., *et al.*, 2009). O excesso de hormonas da tiróide inactivas, no organismo, pode levar a uma diminuição da actividade da glândula tiróide. Estudos realizados mostram que os pacientes que sofrem de hipotireoidismo, melhoraram a sua função tiroídiana com uma dieta adequada em zinco (Gunnar, F. N., *et al.*, 2007).

▪ Selénio

O selénio (Se) é um elemento não metálico e embora seja tóxico, é um nutriente essencial para o ser humano (Henn, L. E., 1975). O selénio encontrado no meio ambiente é proveniente de fontes naturais (processos geofísicos e biológicos) e fontes antropogénicas (processos industriais e agricultura); onde as primeiras são provavelmente responsáveis pela presença de selénio no ambiente, enquanto as demais são responsáveis pela sua redistribuição no ambiente (Seixas, T., *et al.*, 2007). Apesar de estar amplamente distribuído no ambiente (águas, solos e ar) encontra-se em concentrações muito baixas, inferiores a $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Bem, E. M., 1981). O selénio é um dos micronutrientes mais importantes para o bom funcionamento cerebral e, se ingerido nas doses adequadas, evita a propagação e diminui a incidência de cancro, previne cardiomiopatias, melhora o sistema imunológico, reduz a toxicidade de metais pesados, age como antioxidante, combatendo os radicais livres, hoje considerados verdadeiros "agentes" do envelhecimento e ajuda a equilibrar a hormona activa da tiróide (Coelho, N. M. M., *et al.*, 2004; Navarro, M., *et al.*, 1995; Seixas, T., *et al.*, 2007).

A deficiência de selénio tem efeito directo sobre a glândula tiróide que é a reguladora do metabolismo do corpo, do crescimento e do funcionamento. A utilização correcta das hormonas da tiróide, tiroxina (T_4) e triiodotironina (T_3) e a conversão de T_4 para T_3 activa é mediada e influenciada pelas quantidades de selénio disponível no corpo (Arthur, J. R., *et*

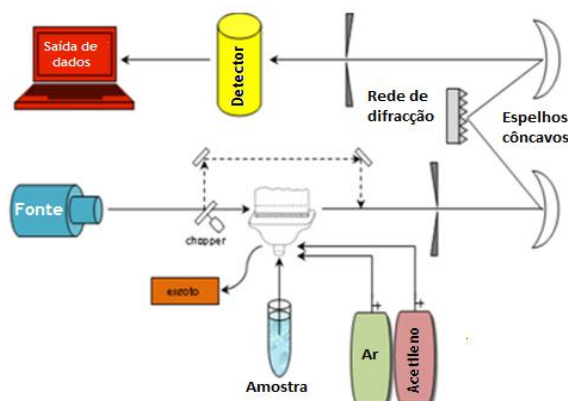
al.,1999; Nazifi, S. *et al.*, 2008). Contudo, o consumo deste metal pode causar a selenose, uma doença provocada pelo excesso de selênio, e que pode ser fatal.

Como micronutriente que é, são necessárias quantidades muito reduzidas para manter uma boa saúde. Cerca de 0,1 a 0,2 ppm de selênio na dieta é suficiente para os requerimentos dietéticos em seres humanos (Chang *et al.*, 1995).

2.3.2 Método Analítico

A quantificação dos metais pesados na água pode ser efectuada através da fotometria de chama por espectrofotometria de absorção ou emissão atómica ou por meio de métodos clássicos da química analítica, como os colorimétricos. A selecção do método a ser utilizado depende do grau de precisão desejado, do número de amostras e, evidentemente, da disponibilidade dos recursos humanos e materiais existentes

A espectrofotometria de absorção atómica é o método mais utilizado para a determinação de metais pesados em amostras de água. Na determinação directa da concentração de um elemento através da absorção atómica, devem ser considerados cinco componentes fundamentais do equipamento: uma fonte luminosa de linhas definidas e intensas, que emita radiação ressonante característica do elemento a ser determinado; um sistema atomizador, para atomizar a amostra na chama; um monocromador, que isole a linha de ressonância de outras linhas que emita a fonte; um sistema detector, que converta a radiação luminosa em corrente eléctrica; e um processador e leitor que mostre o sinal traduzido (Skoog, D. A., *et al.*, 2001b; Vogel, A. I., 2002). No caso da espectrofotometria de absorção atómica com chama, os componentes são colocados como ilustra a Figura 2.6.



a) b)
 Figura 2.6: a) Espectrofotómetro óptico com atomização por chama; b) Esquema representativo do funcionamento do espectrofotómetro.

A fonte de radiação mais utilizada para a espectrofotometria de absorção atómica com chama é a lâmpada de cátodo oco, que consiste num ânodo de tungsténio e num cátodo cilíndrico selado num tubo de vidro, com uma janela de quartzo contendo um gás inerte, como o argón,

à pressão de 1 a 5 Torr (Skoog, D. A., *et al.*, 2001b). O cátodo é construído com o metal do analito ou serve para suportar uma camada desse metal. As lâmpadas referidas são concebidas para o elemento de interesse, isto é, emitem radiação característica do analito, sendo depois o detector sintonizado para esta frequência (Suess, M. J., 1982). A actividade da lâmpada inicia-se quando é aplicada uma intensidade de corrente (2 a 30 mA) entre os eléctrodos. A passagem de corrente ioniza o gás nobre existente, sendo os catiões formados acelerados para o cátodo (Skoog, D. A., *et al.*, 2001a). A energia do impacto é suficiente para excitar os átomos do cátodo, que emitem radiação (Vogel, A. I., 2002).

O monocromador deve separar a linha espectral de interesse das outras linhas emitidas pela fonte de radiação, através da utilização de um prisma ou rede de difracção associado a duas fendas estreitas que servem para a entrada e saída da radiação (Krug, F. J., *et al.*, 2004; Skoog, D. A., *et al.*, 2001a). O prisma ou a rede de difracção (quartzo) irá decompor o feixe de radiação em discretos comprimentos de onda, com diferentes ângulos. Desta forma, através da fenda de saída, é possível seleccionar apenas a linha de comprimento de onda desejado (Krug, F. J., *et al.*, 2004; Skoog, D. A., *et al.*, 2001a). É aconselhável manter as fendas do monocromador tão estreitas quanto possível para rejeitar linhas indesejadas das lâmpadas de cátodo oco e da chama (Krug, F. J., *et al.*, 2004).

A função do atomizador é converter a amostra em vapor atómico. Geralmente uma chama aquece e excita os átomos para a absorção. As soluções são introduzidas no atomizador por nebulização, onde a amostra é convertida num aerossol por uma corrente de gás, que leva depois a amostra a uma região onde ocorre a atomização. A luz absorvida pelos átomos no estado fundamental é então medida (Suess, M. J., 1982). A absorção atómica obedece à Lei de Lambert Beer (Equação 2.1), em que a absorvância é directamente proporcional à concentração (Skoog, D. A., *et al.*, 2001b).

2.4 Validação de Métodos

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumular erros (sistemáticos e/ou aleatórios), o que, em determinadas situações, pode alterar de forma significativa o valor do resultado final (Guia Relacre 13, 2000; Henriques, M., 2010).

O processo de validação de métodos que envolve o estudo de parâmetros de avaliação indirecta e directa é necessário para a garantia da qualidade analítica, (Guia Relacre 13, 2000). Tal facto advém da necessidade de uniformizar os critérios utilizados com o objectivo de demonstrar que um dado método de ensaio, nas condições em que é praticado detém as características necessárias para assegurar a obtenção de resultados com a qualidade exigida (Guia Relacre 13, 2000; Mendes, A.S.R.; Henriques, M., 2010).

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros (Guia Relacre 13, 2000):

- Sensibilidade;
- Gama de trabalho/linearidade;
- Limiares analíticos;
- Precisão;
- Exactidão.

2.4.1 Avaliação Indirecta

▪ Selectividade e Especificidade

Define-se selectividade como a capacidade do método identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes, ou seja, a selectividade verifica a capacidade do método diferenciar compostos medindo exactamente a substância de interesse (analito) na presença de outras (interferente). A especificidade define-se como a capacidade de discriminação do analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, o método é específico para um dado analito quando somente a substância de interesse é detectada, não sendo possível a detecção de nenhuma outra (Henriques, M., 2010).

De forma a avaliar as interferências poder-se-á efectuar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas a concentração do analito varia em proporções conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Um dado método analítico pode ser considerado aplicável (selectivo e específico) se na prática, e após a realização de

testes de recuperação, se verifica que os valores das taxas de recuperação estão compreendidos entre 80 e 100 % (INMETRO, 2003).

Assim, qualquer que seja o valor obtido desde que esteja compreendido no intervalo referido fornece a informação de que, o método é capaz de identificar todo o analito presente e que tanto o procedimento, quanto a matriz, não tem influência significativa na detecção do analito.

▪ Gama de Trabalho

Sempre que se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias. Recomenda-se que sejam utilizados dez pontos de calibração, nunca sendo inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações (Guia Relacre 13, 2000). O primeiro e o último padrão deverão ser analisados em dez réplicas independentes. As variâncias associadas ao primeiro padrão (S_1^2) e ao último padrão S_{10}^2 podem ser calculadas para avaliar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho (Mendes, A.S.R.; Henriques, M., 2010). Desta forma o cálculo do valor do teste PG pode ser efectuado através das Equações 2.2 e 2.3 (Guia Relacre 13; Henriques, M., 2010):

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \quad \text{para } S_1^2 > S_{10}^2 \quad (2.2)$$

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2} \quad \text{para } S_{10}^2 > S_1^2 \quad (2.3)$$

Comparando o valor de PG com o valor tabelado na distribuição de Fisher (Anexo C), para $n-1$ graus de liberdade, a decisão estatística é a seguinte:

- Se $PG \leq F$, a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada;
- Se $PG > F$, a diferença entre as variâncias é significativa e a gama de trabalho deve ser reajustada até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter $PG \leq F$.

▪ Curvas de Calibração

Em análises quantitativas, a calibração é um processo pelo qual a resposta do equipamento (sinal) se relacionada com uma concentração conhecida (padrão). Caso se utilize o método dos mínimos quadrados, o eixo das ordenadas representa a resposta instrumental e o eixo das abcissas representa a concentrações do padrão. A forma algébrica da equação da recta que relaciona as duas variáveis é dada pela Equação 2.4 (Guia Relacre 13, 2000).

$$y = a + bx \quad (2.4)$$

sendo:

y- Resposta medida (absorvância, altura ou área do pico, etc.);

x- Concentração;

b- Declive da curva analítica = sensibilidade;

a- Intersecção com o eixo y, quando $x = 0$.

A regressão linear é utilizada com frequência para indicar o quanto a recta pode ser considerada adequada como modelo matemático para o caso em estudo. Um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica é através do coeficiente de correlação, onde os valores deverão ser superiores a 0,995 (INMETRO, 2003; Guia Relacre 13, 2000).

▪ Linearidade

A linearidade consiste na verificação da existência de uma relação linear entre os valores medidos e a concentração dos padrões de calibração. A linearidade é avaliada através de um método estatístico onde, a partir de um conjunto de pares ordenados, se calcula a função de calibração linear e a função de calibração não linear.

De seguida aplica-se o teste estatístico, PG, onde são comparadas as funções de calibração linear e não linear e os respectivos desvio padrão residuais. Calcula-se a diferença das variâncias (DS^2) definida na Equação 2.5 e realiza-se o teste PG como indicado na Equação 2.8.

$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y1}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2 \quad (2.5)$$

onde

N corresponde ao número de padrões de calibração utilizados e S_{y1} e S_{y2} aos desvio padrão residuais.

S_{y1} e S_{y2} são dados pela Equação 2.6 e 2.7 respectivamente.

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_1)^2}{(N - 2)}} \quad (2.6)$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_2)^2}{(N - 3)}} \quad (2.7)$$

sendo \hat{y}_1 e \hat{y}_2 o valores previstos através do ajuste polinomial com polinómios de grau 1 e 2, respectivamente.

Calcula-se o valor teste PG:

$$PG = \frac{DS^2}{S_y^2} \quad (2.8)$$

Analogamente ao teste de homogeneidade de variâncias compara-se o valor de PG com o valor tabelado da distribuição de F de *Snedecor/Fisher*:

- Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear;
- Se $PG > F$: a função de calibração é não linear.

No caso de $PG > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

▪ Limiares Analíticos do Método de Ensaio

O Limite de Detecção (LD) corresponde ao início da gama a partir do qual é possível distinguir o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal indicar se o analito em questão está ou não presente, com uma certeza estatística razoável (normalmente 95 %). Qualitativamente, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco (Mendes, A.S.R.).

O Limite de Quantificação (LQ) é a menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com precisão e exactidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Por outras palavras este limite de quantificação corresponde ao início da gama onde o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente < 10 %) para se poder efectuar uma detecção quantitativa. O LQ estimado deverá ser confirmado experimentalmente com um padrão de concentração semelhante (Mendes, A.S.R.). Estes parâmetros podem ser calculados a partir de dois princípios (Mendes, A.S.R.; Henriques, M., 2010):

- Através de uma série de ensaios com um branco representativo e calculando a respectiva média e desvio padrão; sugere-se que sejam utilizados brancos independentes para obter esta estimativa, (por exemplo dias diferentes) Equação 2.9 e 2.10.

$$LD = x_0 + 3,3S_0 \quad (2.9) \qquad LQ = x_0 + 10S_0 \quad (2.10)$$

onde:

x_0 – Corresponde ao valor médio do teor medido de uma série de branco para o conjunto de dados;

S_0 –Corresponde ao valor do desvio padrão associado a x_0 .

- A partir da estatística de mínimos quadrados da recta de calibração, Equação 2.11 e 2.12:

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.11)$$

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad (2.12)$$

onde:

b – Corresponde ao valor do declive da recta;

$S_{y/x}$ – Corresponde ao valor do desvio padrão residual da curva de calibração.

Sempre que exista uma alteração de factores estes limites devem ser determinados novamente (INMETRO, 2003; Mendes, A.S.R.).

A Figura 2.7 mostra a distinção entre as três principais zonas analíticas. Na zona inferior ao LD (zona 1) não é possível identificar a existência do analito sendo considerada uma zona desconhecida. A gama entre o LD e o LQ (zona 2) deve ser entendida como uma zona de detecção qualitativa, e não quantitativa, pelo que não se devem reportar valores numéricos nesta gama, o LQ (zona 3) corresponde ao início da zona de detecção quantitativa. Assim sendo, o valor mínimo de concentração, usado para delimitar a fronteira entre a detecção qualitativa e as medições quantitativas, é dado pelo LQ (Guia Relacre 13, 2000; INMETRO, 2003; Mendes, A.S.R.).

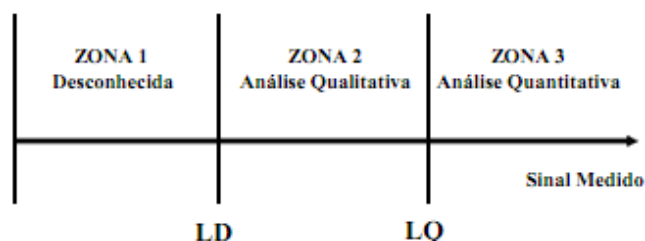


Figura 2.7: As três principais zonas analíticas.

▪ Precisão

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões e em condições pré-estabelecidas (Guia Relacre 13, 2000).

Existem duas formas para expressar esta dispersão, a repetibilidade e a reprodutibilidade, as quais apresentam os extremos da variabilidade de um método de ensaio. Contudo entre estas duas medidas existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia (INMETRO, 2003; Henriques, M., 2010; Guia Relacre 13, 2000).

Quantitativamente a precisão é avaliada através do desvio padrão associado à média de um conjunto de ensaios independentes, sendo expressa em coeficiente de variação (CV),

usualmente expresso em percentagem, também conhecido como desvio padrão relativo, e é calculado através da Equação 2.13.

$$CV = DPR = \frac{DP}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (2.13)$$

sendo:

DP – Desvio-padrão;

\bar{x} – Concentração média determinada.

Repetibilidade

A repetibilidade refere-se à precisão de um método de ensaio efectuado em condições análogas (mesmo laboratório, mesmo analista e o mesmo equipamento, etc.), isto é, refere-se a ensaios realizados sobre a mesma amostra em condições tão estáveis quanto possíveis em curtos intervalos de tempo (Mendes, A.S.R.).

O limite de repetibilidade (*r*) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (95 %), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio obtidos nas condições acima referidas (Guia Relacre 13, 2000).

Para se determinar a repetibilidade no laboratório efectuam-se uma série de medições ($n \geq 10$), em cada nível de concentrações sobre uma amostra ou padrões. O cálculo deverá ser efectuado individualmente para cada nível de concentração, a partir dos resultados obtidos excluindo os valores aberrantes. Deve ser calculada a variância associada à repetibilidade do método de ensaio, para cada nível de concentração, o limite de repetibilidade (*r*) e o coeficiente de variação de repetibilidade (*CV_r*) (Guia Relacre 13, 2000).

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método, sobre uma mesma amostra, efectuado sob condições de ensaio variadas, utilizando o mesmo método de ensaio, mas fazendo variar as condições de medição (diferentes laboratórios, diferentes operadores e equipamentos, etc.). O limite de reprodutibilidade (*R*) é o valor abaixo do qual se deve situar com uma probabilidade específica (95 %), a diferença absoluta entre dois ensaios, obtidos nas condições mencionadas (Mendes, A.S.R.; Guia Relacre 13, 2000).

Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre uma mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, usando o mesmo método, no mesmo ou em diferentes laboratórios, mas definindo exactamente quais as condições que se pretende variar (diferentes analistas, equipamentos, épocas e com ou sem verificação da calibração) (INMETRO, 2003). Identificada como sendo a medida mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório

esta medida como tal é a mais aconselhável de ser utilizada. Para determinar a precisão intermédia de um método, realizam-se n medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições estabelecidas (Guia Relacre 13, 2000). Na maior parte dos casos, o valor desta precisão é função da gama de concentração do ensaio e o seu cálculo é feito, através dos resultados obtidos, após a exclusão dos resultados aberrantes (Guia Relacre 13, 2000). Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo desta precisão existem diversos métodos para a determinação e controlo desse parâmetro de qualidade, tais como cartas de controlo de amplitudes e através da expressão do cálculo do desvio padrão da precisão intermédia (Henriques, M., 2010).

2.4.2 Avaliação Directa: Exactidão

A exactidão de um método fornece uma medida da aproximação entre o resultado experimental e o verdadeiro valor da grandeza que está a ser avaliada (Mendes, A.S.R.; Guia Relacre 13, 2000).

De forma a avaliar a exactidão, sempre que possível, devem ser utilizados Materiais de Referencia Certificados (MRC), os quais constituem uma excelente ferramenta no controlo externo da qualidade de uma análise química.

A qualidade dos resultados obtidos na análise de um MRC pode ser avaliada através dos quatro parâmetros descritos a seguir (INMETRO, 2003):

Erro Relativo

A exactidão do método pode ser avaliada através do cálculo do valor do erro relativo (Er) expresso em percentagem. A expressão é dada pela Equação 2.14.

$$Er (\%) = \left(\frac{x_{lab} - x_v}{x_v} \right) \times 100 \quad (2.14)$$

onde:

x_{lab} – Corresponde ao valor obtido experimentalmente (ou média aritmética de valores obtidos);

x_v – Corresponde ao valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC).

Teste de Hipótese (Teste t)

A existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada pode ser estimada através de um teste de hipóteses, sendo o valor deste parâmetro dado pela Equação 2.15.

$$t = \frac{\left(\frac{x_{lab} - x_v}{x_v} \right) - 100}{\frac{s}{\sqrt{N-1}}} \quad (2.15)$$

onde:

x_{lab} – Corresponde à média dos valores obtidos experimentalmente,

x_v – Corresponde ao valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC),

S – Desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (x_{lab}),

N – Número de amostras ensaiadas.

Factor de Desempenho Z (Z - score)

O factor de desempenho Z é um teste estatístico cujo objectivo é avaliar o desempenho do laboratório, este testa a igualdade entre uma média conhecida e uma média calculada. O cálculo do valor de Z-score (Z) é dado pela Equação 2.16.

$$Z = \left(\frac{x_{lab} - x_v}{S} \right) \quad (2.16)$$

onde:

x_{lab} – Corresponde à média dos valores obtidos experimentalmente,

x_v – Corresponde ao valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC),

S – Unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou ainda uma unidade de desvio interna.

A avaliação é feita de acordo a seguinte escala:

$|Z| \leq 2 \Rightarrow$ Resultado Satisfatório,

$2 < |Z| \leq 3 \Rightarrow$ Resultado Questionável,

$|Z| \geq 3 \Rightarrow$ Resultado Insatisfatório.

Erro Normalizado

O erro normalizado (E_n) é a forma de avaliar o desempenho, caso o valor verdadeiro esteja dentro do intervalo de incerteza do valor obtido experimentalmente, e calcula-se através da Equação 2.17:

$$E_n = \frac{x_{lab} - x_v}{\sqrt{U_{lab}^2 - U_{ref}^2}} \quad (2.17)$$

sendo:

U_{ref} – Corresponde à incerteza associada ao valor verdadeiro,

U_{lab} – Corresponde à incerteza associada ao valor dos resultados obtidos pelo laboratório,

x_{lab} – Corresponde à média dos valores obtidos experimentalmente,

x_v – Corresponde ao valor aceite como verdadeiro (valor certificado do MRC).

Se $|En| \leq 1$, então pode ser considerado que o resultado do laboratório é adequado.

CAPÍTULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

Capítulo 3 - Parte Experimental

3.1 Amostragem

Na realização deste trabalho experimental foram analisadas águas brutas e águas tratadas, recolhidas no distrito do Porto (Matosinhos e Póvoa de Varzim), de Castelo Branco (Covilhã, Capinha, Castelo Novo, Penhas da Saúde), de Leiria (Monte Real) e da Guarda (Guarda). A Figura 3.1 mostra o mapa (Google Earth) com a localização dos diferentes pontos de recolha das amostras. Considera-se que águas brutas são todas aquelas que não sofreram qualquer tipo de tratamento e que as águas tratadas são as que já foram sujeitas a tratamentos químicos, nas Estações de Tratamentos de Água (ETA) através de compostos clorados normalmente hipoclorito de sódio.



Figura 3.1: Mapa com os pontos de recolha das amostras assinalados.

A determinação da concentração de iodo deveria ser efectuada imediatamente após a recolha da amostra (S.M., 2005), contudo, considerando a distância entre o local de recolha e a localização do laboratório (Departamento de Química desta Universidade) tal facto não foi possível, o que de alguma forma complica a sua determinação.

As amostras de água foram recolhidas em frascos de polietileno e transportadas em malas térmicas com gelo; após a receção foram conservadas no frigorífico à temperatura de 4 °C até ao momento da análise. As amostras reservadas para a determinação dos metais pesados, após receção, foram acidificadas com ácido nítrico, 65 %, até pH < 2, e também preservadas a 4 °C, como recomenda o *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (S.M., 2005).

3.2 Materiais e Métodos

Todos os materiais foram lavados com água corrente e detergente comercial, emergidos em seguida em água ultrapura, obtida por um sistema de purificação de água, Milli-Q®₁₈₅. A resistividade específica desta água é 18 MΩ cm⁻¹ a 25 °C.

A célula de vidro utilizada na determinação do teor de iodo, antes de cada utilização foi emersa em álcool etílico, 99 %, e depois lavada com a água ultrapura.

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de elevada pureza analítica e com água ultrapura.

3.2.1 Reagentes

Na Tabela 3.1 estão registados todos os reagentes utilizados na preparação das soluções para a determinação do teor de iodo.

Tabela 3.1: Reagentes utilizados na preparação das soluções para a determinação do teor de iodo.

Reagentes	Fórmula Química	Marca	Massa Molecular (g·mol ⁻¹)
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	Scharlau	210,24
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich	98,08
Amido	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	Riedel-de Haën	-
Cloreto de Mercúrio	HgCl ₂	Panreac	271,5
Cloreto de Sódio	NaCl	Merck	58,44
Dihidrogenofosfato de Amónio	NH ₄ H ₂ PO ₄	Panreac	132,05
Hidróxido de Amónio	NH ₄ OH	Panreac	35,05
Iodeto de Potássio	KI	Riedel-de Haën	166
Iodo	I ₂	Merck	253,89
Leuco Cristal Violeta	C ₂₅ H ₃₁ N ₃	Acrös Organics	373,53
Tiosulfato de Sódio Pentahidratado	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O	Riedel-de Haën	248,18

Na preparação das soluções padrão dos metais Zn, Cu e Mn foram utilizados reagentes da marca Merck, com concentração de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que foram utilizadas como solução-mãe. As demais soluções padrão foram preparadas a partir de diluições sucessivas destas soluções.

3.2.2 Equipamento

O trabalho experimental foi realizado nos laboratórios de química da Universidade da Beira Interior, e decorreu entre Novembro de 2010 e Junho de 2011.

As medidas de absorvância para a determinação do teor de iodo foram realizadas num espectrofotómetro ultravioleta - visível (Unican He λ | 0,5 α), utilizando-se uma célula de vidro de 10 mm de percurso óptico (LAB-BOX MARQ-010-002 LB-Q).~

Na realização das medidas de absorvância para a determinação dos metais em água foi utilizado um espectrofotómetro de absorção atómica com chama, Pye Unicam Ltd. Foram utilizadas como fonte de radiação lâmpadas de cátodo oco específicas para cada metal (cobre (S. & J. JUNIPER & CO), zinco e manganês (Pye Unicam Ltd)) ajustando para cada uma delas a intensidade da corrente. Os parâmetros instrumentais de cada elemento estão especificados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2: Condições de operação do espectrómetro de absorção atómica, utilizando a calibração linear.

Parâmetro	Analito		
	Cu	Zn	Mn
Comprimento de Onda (nm)	324,8	213,9	279,5
Corrente da Lâmpada (mA)	10,0	7,0	8,0
Largura da Fenda (nm)	0,5	0,5	0,5
Chama	Ar/Acetileno	Ar/Acetileno	Ar/Acetileno

O acetileno foi utilizado como combustível, e o ar comprimido obtido através de um compressor de ar (Pye Unicam Ltd) como gás oxidante.

No decorrer de todo o trabalho prático foram utilizadas para a medição de volumes micropipetas de volume variável (10-100 μl , 100-1000 μl e 500-5000 μl) Eppendorf. As pesagens efectuadas na preparação das soluções foram executadas numa balança analítica Mettler AE260. Para a preservação das amostras a 4 °C utilizou-se um frigorífico Philiphs. A homogeneização de soluções, foi efectuada num agitador vortex Heidolph Diax 900. Foram

também utilizadas uma estufa Memmert; uma placa de agitação Selecta Agimatic, um titulador automático Methohm 775Dosimat e um pHmetro (827 pH lab, Metrohm), para o acerto do pH.

3.2.3 Métodos

▪ Determinação do Teor de Iodo

A metodologia para a quantificação do teor de iodo foi executada de acordo com descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 4500-I B (S.M., 2005)*.

A curva de calibração foi preparada com padrões de concentração 0,025; 0,050; 0,075; 0,100; 0,125; 0,150; 0,175; 0,200; 0,225 e 0,250 mg·L⁻¹ em balões de diluição de 100 ml.

As leituras de absorvância foram realizadas a 592 nm, à temperatura ambiente; comparadas com um branco nas mesmas condições.

A cada nova série de análises foi também analisado um padrão, para garantir a fiabilidade dos resultados obtidos, e as leituras absorvância foram realizadas no prazo de cinco minutos após a adição do indicador “leuco cristal violeta”.

A quantificação do teor de iodo na água foi efectuada através da padronização externa, sendo as curvas construídas através de dez níveis de concentração, em que cada ponto foi representado pela média de duas determinações.

▪ Determinação de Metais

Para a determinação dos metais, cobre e manganês, nas amostras de água foram preparados padrões com concentrações igual a 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 ppm em balões de diluição de 100 mL e para o zinco foram preparados padrões com concentrações igual a 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 ppm. A Tabela 3.3 apresenta os valores dos volumes medidos para os diferentes metais na preparação de cada solução padrão.

Tabela 3.3: Registo dos volumes medidos na preparação dos padrões.

Elemento		Soluções-Padrão (mg·L ⁻¹)							
		2,5	2,0	1,5	1,0	0,5	0,2	0,1	0,05
Volume a medir (mL)	Cu	0,25	80,00	75,00	66,67	50,00	40,00	50,00	50,00
	Zn	nd	nd	75,00	66,67	50,00	40,00	50,00	50,00
	Mn	0,25	80,00	75,00	66,67	50,00	40,00	50,00	50,00

nd- Não Determinado

As absorvâncias para cada padrão foram determinadas ao comprimento de onda correspondente de cada metal.

O tempo de integração foi de três segundos e as medições foram realizadas em triplicado. Aspirou-se directamente as amostras no queimador do espectrofotómetro e registaram-se os respectivos valores de absorvância. A cada nova série de análises foi realizada uma nova curva de calibração.

A quantificação dos metais em água foi efectuada através da padronização externa, sendo as curvas construídas através de seis níveis de concentração para o zinco e oito níveis de concentração para o manganês e para o cobre, em que cada ponto foi representado pela média de três determinações. Para cada conjunto de análise foi preparado um branco.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DE RESULTADOS

Capítulo 4. Análise de Resultados

Tendo em consideração os objectivos desta dissertação e face à importância que o iodo possui na saúde das populações tanto pela deficiência como pelo excesso, nomeadamente na glândula tiróide, torna-se necessária a sua quantificação nas águas naturais, uma vez que o Decreto-Lei 306/2007 não prevê o seu valor paramétrico.

4.1 Iodo

Expressar resultados de análises de uma forma consistente tem sido uma exigência cada vez maior, verificando-se uma crescente necessidade de obter dados analíticos comparáveis, que não apresentem qualquer dúvida razoável no que diz respeito a sua exactidão e que possuam uma precisão adequada para o fim a que se destinam.

Assim, inicialmente deve validar-se o método analítico para que esteja assegurado que o método está sob controlo.

O objectivo da validação do método “leuco cristal violeta”, para a determinação de iodo, é demonstrar que o método de ensaio químico, nas condições em que é praticado, apresenta as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade exigida.

O processo de validação utilizado neste trabalho experimental envolveu o estudo de parâmetros analíticos por validação directa e validação indirecta. A validação indirecta foi efectuada através de curvas de calibração, definição da gama de trabalho, determinação dos limites de detecção e quantificação, sensibilidade e precisão. A validação directa foi efectuada apenas através da determinação do erro relativo.

As amostras de água são provenientes de quatro distritos: Porto, Castelo Branco, Leiria e Guarda. As águas analisadas agruparam-se de acordo com o seguinte critério: águas tratadas e águas brutas. As águas provenientes da Estação de Tratamento de Águas (ETA) das Penhas da Saúde também vão ser agrupadas sob esta designação uma vez que se considera que foram recolhidas antes (água bruta) e após (água tratada) o tratamento com compostos clorados. A concentração de iodo refere-se aos valores médios \pm desvio padrão e as unidades apresentam-se em $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

As Tabelas 4.1 e 4.2 mostram a localização dos pontos de recolha das amostras de água tratada e água bruta respectivamente, a data da análise das mesmas e o número de determinações efectuadas para cada ponto de recolha.

Tabela 4.1: Água Tratada: Locais de recolha, data de análise e número de determinações.

Localidade	Data de Análise	Número de Determinações
Covilhã	24-01-2011	14
	27-01-2011	
	03-02-2011	
	15-02-2011	
	16-02-2011	
	21-02-2011	
	01-03-2011	
	10-03-2011	
	15-03-2011	
	21-03-2011	
	28-03-2011	
	04-04-2011	
	11-04-2011	
	17-05-2011	
Castelo Novo	11-04-2011	5
	18-04-2011	
	02-05-2011	
	09-05-2011	
	16-05-2011	
Capinha	28-03-2011	8
	11-04-2011	
	14-04-2011	
	28-04-2011	
	02-05-2011	
	11-05-2011	
	17-05-2011	
30-05-2011		
Penhas da Saúde	11-04-2011	3
	13-04-2011	
	14-04-2011	
Guarda	14-04-2011	6
	28-04-2011	
	02-05-2011	
	10-05-2011	
	16-05-2011	
	23-05-2011	
Monte Real	23-05-2011	3
	30-05-2011	
	07-06-2011	
Póvoa de Varzim	08-02-2011	8
	14-02-2011	
	21-02-2011	
	21-03-2011	
	28-03-2011	
	04-04-2011	
	11-04-2011	
	18-04-2011	

Tabela 4.2: Água Bruta: Locais de recolha, data de análise e número de determinações.

Localidade	Data de Análise	Número de Determinações
Covilhã	19-04-2011	8
	27-04-2011	
	02-05-2011	
	09-05-2011	
	17-05-2011	
	23-05-2011	
	31-05-2011	
	07-06-2011	
Castelo Novo	11-04-2011	5
	18-04-2011	
	02-05-2011	
	09-05-2011	
	16-05-2011	
Capinha	28-03-2011	8
	11-04-2011	
	14-04-2011	
	28-04-2011	
	02-05-2011	
	11-05-2011	
	17-05-2011	
	30-05-2011	
Penhas da Saúde	11-04-2011	3
	13-04-2011	
	14-04-2011	
Guarda	14-04-2011	6
	28-04-2011	
	02-05-2011	
	10-05-2011	
	16-05-2011	
	23-05-2011	
Monte Real	23-05-2011	3
	30-05-2011	
	07-06-2011	
Matosinhos	08-02-2011	8
	14-02-2011	
	21-02-2011	
	21-03-2011	
	28-03-2011	
	04-04-2011	
	11-04-2011	
	18-04-2011	

4.1.1 Validação do Método “Leuco Cristal Violeta”

A avaliação indirecta do método analítico compreendeu (como já foi referido) o estudo da gama de trabalho/linearidade, limiares analíticos (limites de detecção e de quantificação), sensibilidade e precisão (Guia Relacre 13, 2000).

As soluções-padrão irão ser designadas por: $P_{0,025}$; $P_{0,050}$; $P_{0,075}$; $P_{0,100}$; $P_{0,125}$; $P_{0,150}$; $P_{0,175}$; $P_{0,200}$; $P_{0,225}$; $P_{0,250}$, onde o índice representa a concentração de iodo em $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

▪ Gama de Trabalho

A gama de trabalho utilizada foi avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias usando-se a metodologia do traçado de uma curva de calibração (padrão externo).

O intervalo de trabalho estabelecido foi estudado através da utilização de uma serie de dez padrões de calibração cujo teor em iodo é: 0,025, 0,050, 0,075, 0,100, 0,125, 0,150, 0,175, 0,200, 0,225 e 0,250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, distribuídos regularmente ao longo do intervalo. O primeiro e o último padrão foram assim analisados em dez réplicas independentes e a gama de trabalho considerou-se ajustada quando a diferença de variâncias relativas aos dois padrões não foi significativa, isto é, igual ou inferior ao valor de F de *Fischer* para $n-1$ graus de liberdade. Os resultados obtidos para as dez leituras de absorvância efectuadas para o primeiro padrão (0,025 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e para o último (0,250 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) da gama de trabalho encontram-se na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Valores de absorvância dos padrões $P_{0,025}$ e $P_{0,250}$.

Padrões	$P_{0,025}$	$P_{0,250}$
Absorvância (nm)	0,011	0,089
	0,009	0,088
	0,010	0,088
	0,010	0,084
	0,011	0,080
	0,009	0,089
	0,009	0,087
	0,012	0,088
	0,013	0,082
	0,011	0,087
Variância	1,83E-06	9,73E-06

De acordo com os valores obtidos da variância para os dois padrões registados na Tabela 4.3, calculou-se o valor PG, de acordo com a Equação 2.3, sendo $PG = 5,31$.

Uma vez que o valor teste PG obtido através da razão das variâncias se mostrou inferior ao valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*, (Anexo C), para um nível de significância de 99 % e nove graus de liberdade, $F(9;9;0,99) = 5,35$, verifica-se que a gama de trabalho apresenta homogeneidade de variâncias, logo pode considerar-se a gama de trabalho ajustada. É, no entanto, de salientar que para que a gama cumprisse o referido teste foi necessário efectuar inúmeras tentativas com vários intervalos de concentração, cujos testes de homogeneidade de variâncias se mostraram insatisfatórios, chegando-se assim ao intervalo de 0,025 a 0,250 mg·L⁻¹. Com a gama de calibração ajustada, pode então prosseguir-se com a validação do método.

▪ Curva de Calibração

Em análises quantitativas, a calibração é um processo pelo qual a resposta do equipamento (sinal) se relaciona com uma concentração conhecida de analito. Quando a curva de calibração representa uma função polinomial do primeiro grau, isto é, uma recta, e caso se use o método dos mínimos quadrados para regressões lineares, pressupõe-se que os erros têm uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da recta. A equação algébrica da recta ($y = a + bx$) permite avaliar uma boa calibração analítica.

Na Tabela 4.4 encontram-se os valores de absorvância obtidos para as soluções padrão de calibração, bem como a média e o desvio padrão, sendo $n = 2$. Outras rectas de calibração foram calculadas, ao longo do tempo, encontrando-se os valores em anexo (Anexo D).

Tabela 4.4: Valores de absorvância obtidos para as soluções padrão de calibração.

Padrão (mg·L ⁻¹)	Branco	P _{0,025}	P _{0,050}	P _{0,075}	P _{0,100}	P _{0,125}	P _{0,150}	P _{0,175}	P _{0,200}	P _{0,225}	P _{0,250}
Média da Absorvância (nm)	0,000	0,011	0,020	0,028	0,034	0,048	0,055	0,062	0,071	0,079	0,087
Desvio Padrão	0,00E+00	5,00E-04	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,50E-03	1,00E-03	1,00E-03	2,00E-03	5,00E-04	1,50E-03

A partir dos valores de absorvância da recta obtida desenhou-se então a curva de calibração, segundo o método dos mínimos quadrados. A representação gráfica da curva de calibração e a respectiva equação da recta podem ser visualizadas na Figura 4.1.

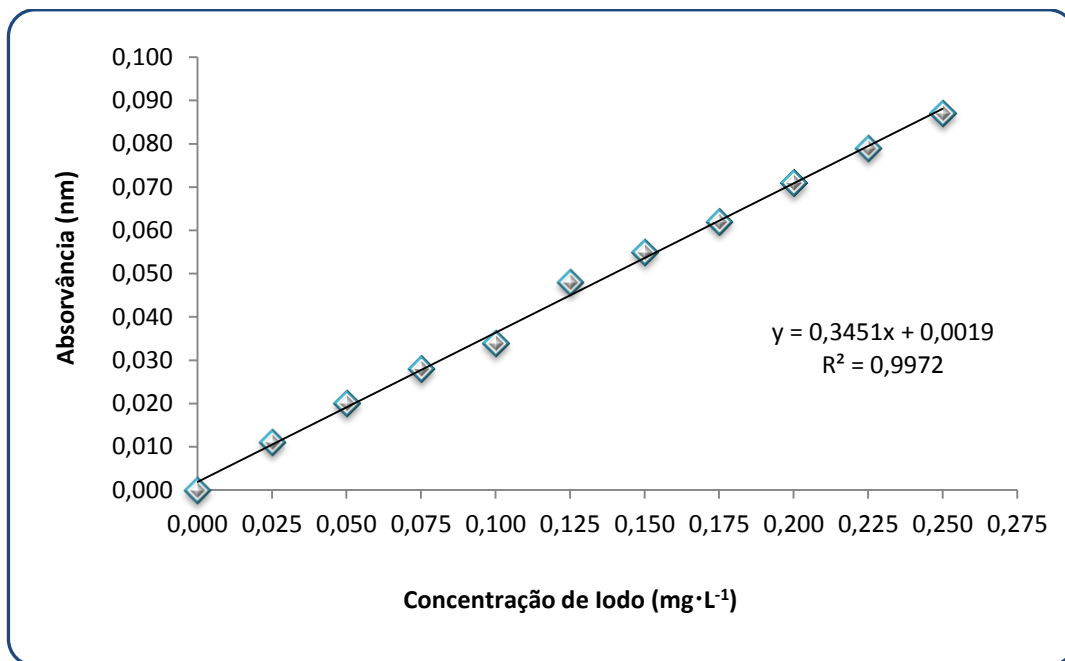


Figura 4.1: Curva de calibração para o iodo.

Os parâmetros desta curva de calibração são apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Curva de calibração.

Parâmetro	Valor
R^2	0,9972
Declive (b)	0,3451
Ordenada na Origem (a)	0,0019
$S_{y/x}$	0,0016
S_b	0,0137
S_a	0,0020

Através dos parâmetros da curva analítica verifica-se que o coeficiente de correlação da recta obtida é superior a 0,995 considerando-se assim que a mesma é uma boa representação das absorvâncias lidas em função da concentração dos padrões. Tal facto pode também ser verificado através do gráfico de resíduos, Figura 4.2, que representa os valores do sinal de resíduos em função do valor de sinal calculado ($Y_{\text{calculado}}$). Sendo os resíduos obtidos pela diferença entre o $Y_{\text{experimental}}$ e o $Y_{\text{calculado}}$.

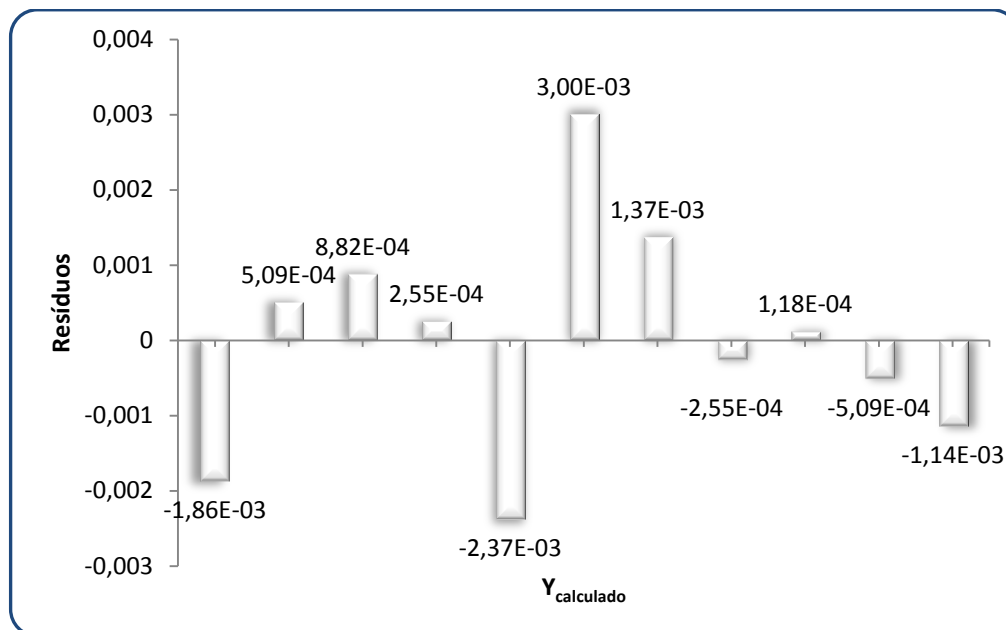


Figura 4.2: Resíduos ($Y_{\text{experimental}} - Y_{\text{calculado}}$).

A Figura 4.2 revela que não há tendência dos padrões num determinado sentido, ou seja, os resíduos distribuem-se simetricamente ao eixo das ordenadas, podendo considerar-se o método livre de tendências.

▪ Linearidade

É a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma determinada gama de concentração. A partir de um conjunto de pares ordenados determinou-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, bem como os seus respectivos desvios padrão residuais (Guia Relacre 13, 2000).

O cálculo de S_{y1} e S_{y2} foi efectuado através das Equações 2.6 e 2.7, respectivamente, obtendo-se $S_{y1}^2 = 1,60 \times 10^{-3}$ e $S_{y2}^2 = 1,48 \times 10^{-3}$ (Anexo E). A diferença de variâncias (DS^2) foi calculada através da Equação 2.5, do qual resultou um valor de $DS^2 = 5,25 \times 10^{-6}$.

Calculou-se o valor teste PG através da Equação 2.8 e comparou-se o valor obtido com o valor tabelado da distribuição F de Fisher (Anexo C), sendo $PG = 2,40$.

Como o valor de PG é menor que F_{tab} ($2,40 < 4.85$), concluímos que a função de calibração é linear.

▪ Sensibilidade

Este parâmetro avalia a capacidade de um método discriminar entre pequenas diferenças de concentração de um analito (Guia Relacre 13, 2000), podendo ser definida como o quociente

entre o acréscimo do valor lido (ΔL) e a variação da concentração (ΔC) correspondente àquele acréscimo, Equação 4.1.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (4.1)$$

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive (b) dessa curva de calibração.

Como a curva de calibração obtida para o doseamento do iodo é definida por um modelo linear, a sensibilidade para esse elemento é dada pelo declive da recta (Guia Relacre 13, 2000), ou seja:

$$\text{Sensibilidade} = (0,345 \pm 0,016)$$

Os valores obtidos para a sensibilidade do método “leuco cristal violeta” nos diferentes dias são evidenciados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Sensibilidade do método e respectivos desvio padrão nos diferentes dias.

Dia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sensibilidade	0,347	0,346	0,349	0,323	0,311	0,351	0,342	0,343	0,328	0,345
($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\pm 0,015$	$\pm 0,018$	$\pm 0,015$	$\pm 0,013$	$\pm 0,002$	$\pm 0,017$	$\pm 0,016$	$\pm 0,013$	$\pm 0,012$	$\pm 0,016$

▪ Coeficiente de Variação do Método

O desvio padrão de um método (S_m), e respectivo coeficiente de variação (CV_m), permitem ao analista avaliar a qualidade do seu trabalho (Guia Relacre 13, 2000). As Equação 4.2 e 4.3 apresentam as expressões matemáticas para o cálculo destes dois parâmetros.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\text{declive}} \quad (4.2)$$

$$CV_m = \frac{S_m}{C_m} \times 100 \% \quad (4.3)$$

Os valores calculados são $S_m = 0,004$ e $CV_m = 3,339 \%$.

Tanto o desvio padrão como o coeficiente de variação do método apresentam valores inferiores a 5 %, pelo que se pode inferir que há uma boa qualidade no trabalho efectuado.

▪ Limiares Analíticos

Na Tabela 4.7 apresenta-se o valor de dez leituras de absorvância, obtidas para o ensaio em branco, que permite calcular o valor do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ).

Tabela 4.7: Leituras de absorvância efectuadas ao Branco e respectiva concentração.

Número de Leituras do Branco	Absorvância (nm)
1	0,002
2	0,001
3	0,004
4	0,000
5	0,001
6	0,003
7	0,000
8	0,001
9	0,004
10	0,001

Recorrendo a Equação 2.9 e 2.10, calculou-se LD e LQ para o método do branco. Estes limites podem também ser calculados através do método da curva calibração, Equação 2.11 e 2.12. A Tabela 4.8 apresenta os valores obtidos para o LD e LQ, através dos dois métodos.

Tabela 4.8: Limiares analíticos.

Parâmetro ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Método do Branco	Método da Curva de Calibração
LD	12,6	14,5
LQ	41,7	46,4

Assim, neste trabalho procedeu-se à análise de dez brancos independentes e comparou-se os limites obtidos com os determinados pela curva de calibração, uma vez que os valores não são significativamente diferentes, optou-se por considerar os valores obtidos através da curva de calibração.

▪ Precisão

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95 %, a diferença absoluta entre dois resultados obtidos nas condições referidas: $|x_i - x_{i-1}| \leq r$ (Guia Relacre 13, 2000). Para calcular o limite de repetibilidade (r) e o respectivo coeficiente de variação de repetibilidade, foram analisados em duplicado três padrões, fazendo variar o dia de análise. Porém antes de avaliar a precisão é necessário testar se existem ou não, valores aberrantes para os resultados obtidos, para tal recorre-se ao teste de Grubbs (Equação 4.4) (Anexo F) o qual consiste no cálculo da média e do desvio padrão dos valores ordenados, testando-se assim se o valor menor e o valor maior são ou não aberrantes. Caso o teste indique a existência de valores aberrantes retira-se esse valor e volta-se a fazer o teste, caso contrário pode-se proceder ao cálculo da repetibilidade.

$$G_{X_i} = \frac{X_i - \bar{X}}{s} \quad (4.4)$$

Onde

X_i é a concentração da amostra, onde $i = 1$ e $i = 10$;

\bar{X} é a média amostral;

S é o desvio padrão amostral, calculado através da Equação 4.5.

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (4.5)$$

As Tabelas 4.9, 4.10, 4.11 contêm o teor de iodo calculados bem como a média e o desvio padrão, correspondentes a $P_{0,025}$; $P_{0,125}$; $P_{0,250}$. Estes valores são necessários para o cálculo de G .

Tabela 4.9: Teste de Grubbs aplicado ao padrão $P_{0,025}$.

Leitura $P_{0,025}$	Absorvância (nm)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração Ordenada ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média da Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão	G
1	0,011	0,026	0,021			-1,49
2	0,010	0,023	0,021			
3	0,011	0,026	0,023			
4	0,009	0,021	0,023			
5	0,011	0,026	0,023	0,024	0,002	
6	0,010	0,023	0,023			
7	0,010	0,023	0,023			
8	0,009	0,021	0,026			
9	0,010	0,023	0,026			
10	0,010	0,023	0,026			1,22

Tabela 4.10: Teste de Grubbs aplicado ao padrão $P_{0,125}$.

Leitura $P_{0,125}$	Absorvância (nm)	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração Ordenada ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média da Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão	G
1	0,048	0,134	0,122			-1,95
2	0,048	0,134	0,125			
3	0,049	0,136	0,131			
4	0,047	0,131	0,131			
5	0,050	0,139	0,131	0,132	0,005	
6	0,049	0,136	0,134			
7	0,047	0,131	0,134			
8	0,044	0,122	0,136			
9	0,047	0,131	0,136			
10	0,045	0,125	0,139			1,49

Tabela 4.11: Teste de Grubbs aplicado ao padrão P_{0,250}.

Leitura P _{0,250}	Absorvância (nm)	Concentração (µg·L ⁻¹)	Concentração Ordenada (µg·L ⁻¹)	Média da Concentração (µg·L ⁻¹)	Desvio Padrão	G
1	0,087	0,247	0,238			-1,65
2	0,086	0,244	0,241			
3	0,085	0,241	0,244			
4	0,088	0,249	0,244			
5	0,088	0,249	0,247	0,247	0,006	
6	0,091	0,258	0,249			
7	0,089	0,252	0,249			
8	0,089	0,252	0,252			
9	0,084	0,238	0,252			
10	0,086	0,244	0,258			1,85

Verifica-se que, não existem valores aberrantes, uma vez que os valores de G obtidos são inferiores ao valor tabelado, $G_{\text{tab}} = 2,29$, (Anexo 6) logo os valores obtidos são aceites. Uma vez que não existem valores aberrantes pode proceder-se ao cálculo da repetibilidade.

Para a determinação do desvio padrão de repetibilidade (S_{ri}), limites de repetibilidade (r) e respectivos coeficientes de variação de repetibilidade (CV_r) foram analisados os mesmos três padrões.

Para um intervalo de confiança de 95 %, o limite de repetibilidade (r) é avaliado segundo a Equação 4.6.

$$r = t \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_{ri} = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (4.6)$$

sendo S_{ri} o desvio padrão associado aos resultados obtidos no ensaio de repetibilidade.

O coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) para cada nível de concentrações, expresso em percentagem, é expressa pela Equação 4.7:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (4.7)$$

Nas Tabelas 4.12, 4.13 e 4.14, apresenta-se o tratamento matemático correspondente a dez leituras de cada padrão analisado.

Tabela 4.12: $P_{0,025}$: Estudo da repetibilidade.

Leitura $P_{0,025}$	Concentração de lodo ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$ x_i - x_{i-1} $	r	(CV_r) (%)
1	0,026			0,0029		
2	0,023			0,0029		
3	0,026			0,0058		
4	0,021			0,0058		
5	0,026	0,024	0,002	0,0029	0,006	8,998
6	0,023			0,0000		
7	0,023			0,0029		
8	0,021			0,0029		
9	0,023			0,0000		
10	0,023					

Tabela 4.13: $P_{0,125}$: Estudo da repetibilidade.

Leitura $P_{0,125}$	Concentração de lodo ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$ x_i - x_{i-1} $	r	(CV_r) (%)
1	0,134			0,000		
2	0,134			0,003		
3	0,136			0,006		
4	0,131			0,009		
5	0,139	0,132	0,005	0,003	0,015	3,817
6	0,136			0,006		
7	0,131			0,009		
8	0,122			0,009		
9	0,131			0,006		
10	0,125					

Tabela 4.14: P_{0,250}: Estudo da repetibilidade.

Leitura P _{0,250}	Concentração de lodo (µg·L ⁻¹)	Média (µg·L ⁻¹)	Desvio Padrão (µg·L ⁻¹)	x _i - x _{i-1}	r	(CV _r) (%)
1	0,247			0,003		
2	0,244			0,003		
3	0,241			0,009		
4	0,249			0,000		
5	0,249	0,247	0,006	0,009	0,017	2,429
6	0,258			0,006		
7	0,252			0,000		
8	0,252			0,014		
9	0,238			0,006		
10	0,244					

Verifica-se que para P_{0,025} o coeficiente de variação é o mais elevado enquanto o limite de repetibilidade é o mais baixo.

Observando as Tabelas 4.12, 4.13 e 4.14, verifica-se que a diferença absoluta entre dois resultados consecutivos |x_i - x_{i-1}| é sempre inferior ao valor de r, o que significa que os resultados apresentam boa repetibilidade. Outro facto que confirma esta conclusão, é o valor do coeficiente de variação de repetibilidade ser inferior a 10 % (Guia Relacre 13, 2000).

A precisão intermédia foi avaliada fazendo variar o dia da análise e efectuando medições em replicado sobre três padrões. Os resultados obtidos estão registados nas Tabelas 4.15 a 4.17.

A estimativa da precisão intermédia, quando o número de ensaios efectuados por amostra é igual a dois (n = 2), é dada pela expressão 4.10 (Guia Relacre 13, 2000).

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \times \sum_{j=1}^t (Y_{j1} - Y_{j2})^2} \quad (4.10)$$

onde:

S_i = é o desvio padrão de precisão intermédia;

t é o número total de amostras ensaiadas;

Y_{j1} é o primeiro resultado obtido para a amostra j ;

Y_{j2} é o segundo resultado obtido para a amostra j .

Sendo o limite da precisão intermédia (R_z) é dado pela expressão 4.11.

$$R_z = 1,96 \times \sqrt{2} \times S_i \quad (4.14)$$

Tabela 4.15: $P_{0,025}$: Precisão intermédia.

Padrão	X_1 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_2 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$(X_1 - X_2)^2$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
$P_{0,025}$	0,025	0,022	8,45E-06
	0,017	0,022	3,38E-05
	0,019	0,019	0,00E+00
	0,022	0,025	8,45E-06
	0,019	0,019	0,00E+00
	0,019	0,022	8,45E-06
	0,028	0,019	7,61E-05
	0,019	0,019	0,00E+00
	0,019	0,022	8,45E-06
	0,022	0,025	8,45E-06
Somatório			1,52E-04
S_i	0,028		
R_z	0,076		

Tabela 4.16: $P_{0,125}$: Precisão intermédia.

Padrão	X_1 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_2 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$(X_1 - X_2)^2$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ²
$P_{0,125}$	0,130	0,133	8,45E-06
	0,127	0,127	0,00E+00
	0,127	0,136	7,61E-05
	0,130	0,136	3,38E-05
	0,124	0,130	3,38E-05
	0,124	0,127	8,45E-06
	0,127	0,130	8,45E-06
	0,124	0,136	1,35E-04
	0,133	0,124	7,61E-05
	0,133	0,130	8,45E-06
Somatório			3,89E-04
S_i	0,044		
R_z	0,122		

Tabela 4.17: $P_{0,250}$: Precisão intermédia.

Padrão	X_1 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	X_2 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	$(X_1 - X_2)^2$ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ²
$P_{0,250}$	0,246	0,243	8,45E-06
	0,243	0,246	8,45E-06
	0,243	0,252	7,61E-05
	0,246	0,252	3,38E-05
	0,252	0,255	8,45E-06
	0,255	0,243	1,35E-04
	0,258	0,246	1,35E-04
	0,246	0,240	3,38E-05
	0,240	0,240	0,00E+00
	0,240	0,246	3,38E-05
Somatório			4,73E-04
S_i	0,049		
R_z	0,135		

Verifica-se que os valores de $(X_1 - X_2)^2$ são aceitáveis uma vez que são sempre inferiores ao valor do limite de precisão intermédia R_Z .

Um outro parâmetro recomendado para avaliar a precisão é a reprodutibilidade que é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais, a qual não foi possível determinar, neste trabalho experimental.

Neste trabalho de investigação a avaliação directa apenas foi estudada através do cálculo do erro relativo, dado que os outros parâmetros necessitam de participação em ensaio interlaboratoriais.

Erro Relativo

A determinação do erro relativo foi calculada para cada um dos padrões, sendo a expressão dada pela Equação 2.14.

Os valores apresentados na Tabela 4.18, indicam o valor do erro relativo correspondente a cada um dos padrões da curva de calibração, bem como os valores da média e desvio padrão.

Tabela 4.18: Erro relativo.

Padrão (mg·L ⁻¹)	Concentração Média Experimental (mg·L ⁻¹)	Erro Relativo (%)
P _{0,025}	0,026	5,477
P _{0,050}	0,054	7,795
P _{0,075}	0,079	4,704
P _{0,100}	0,096	4,086
P _{0,125}	0,134	6,868
P _{0,150}	0,157	4,511
P _{0,175}	0,177	1,172
P _{0,200}	0,203	1,565
P _{0,225}	0,225	0,061
P _{0,250}	0,248	0,782

Verifica-se que todos os padrões têm um erro relativo inferior a 10 %, o que indica que não existe uma diferença significativa entre o valor experimental e o valor real.

4.1.2 Teor de Iodo

Com o processo de validação concluído procedeu-se então à análise de amostras de água de consumo humano para determinar a concentração de iodo.

Os valores de concentração de iodo obtidos nas 47 amostras de água tratada, encontram-se na Tabela 4.19 e valores correspondentes às 41 amostras de água bruta estão registados na Tabela 4.20. Com base nestes resultados elaboraram-se dois gráficos correspondentes às Figuras 4.3 e 4.4 para visualizar as diferenças encontradas nas águas destinadas ao consumo humano, água tratada e água bruta, nos vários pontos de recolha.

Tabela 4.19: Água Tratada: Valores médios e respectivo desvio padrão.

Água Tratada	Covilhã	Castelo Novo	Capinha	Penhas da Saúde	Guarda	Monte Real	Póvoa de Varzim
Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	7,43	8,11	15,14	13,57	9,09	12,85	18,81
Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,92	1,65	3,77	1,51	0,83	2,21	4,85
Número de Determinações	14	5	8	3	6	3	8

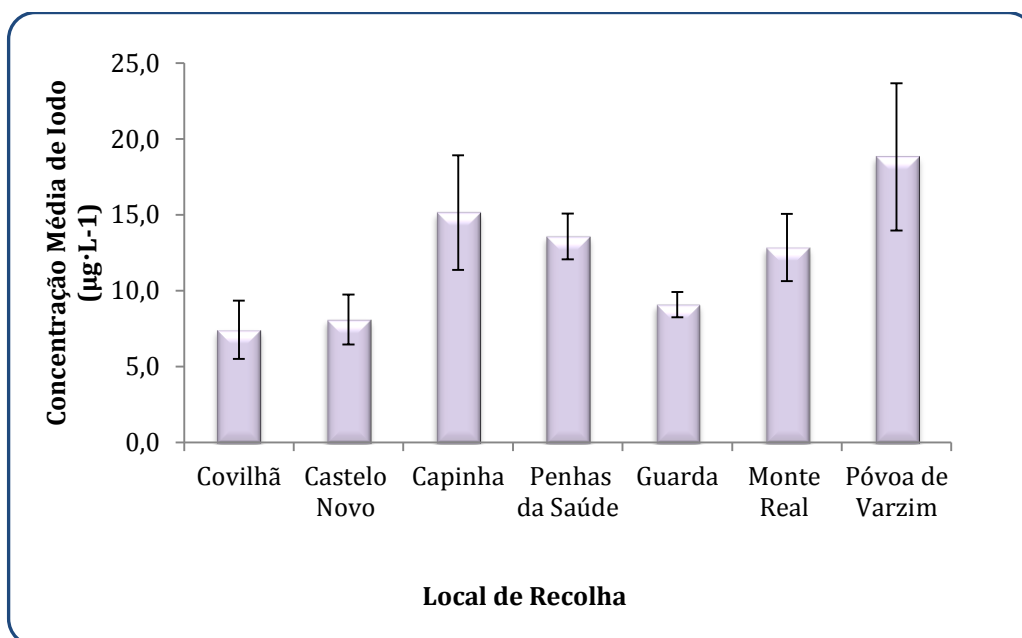


Figura 4.3: Representação gráfica do teor de iodo registado na tabela 4.20.

Como é possível observar através dos valores indicados na Tabela 4.19, e pela representação dos mesmos na Figura 4.3, a Póvoa de Varzim é o local que maior teor de iodo apresenta

($18,81 \pm 4,85 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), seguida da Capinha ($15,14 \pm 3,77 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Contudo todas as amostras analisadas estão abaixo do limite de quantificação do método analítico utilizado ($\text{LQ} = 46,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e que apenas a Póvoa de Varzim e a Capinha apresentam valores superiores ao limite de detecção $\text{LD} = 14,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tabela 4.20: Água Bruta: Valores médios e respectivo desvio padrão.

Água Bruta	Covilhã	Castelo Novo	Capinha	Penhas da Saúde	Guarda	Monte Real	Matosinhos
Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	6,20	13,62	13,51	5,84	12,96	8,50	17,90
Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,47	1,21	1,91	1,11	1,63	0,84	2,84
Número de Determinações	8	5	8	3	6	3	8

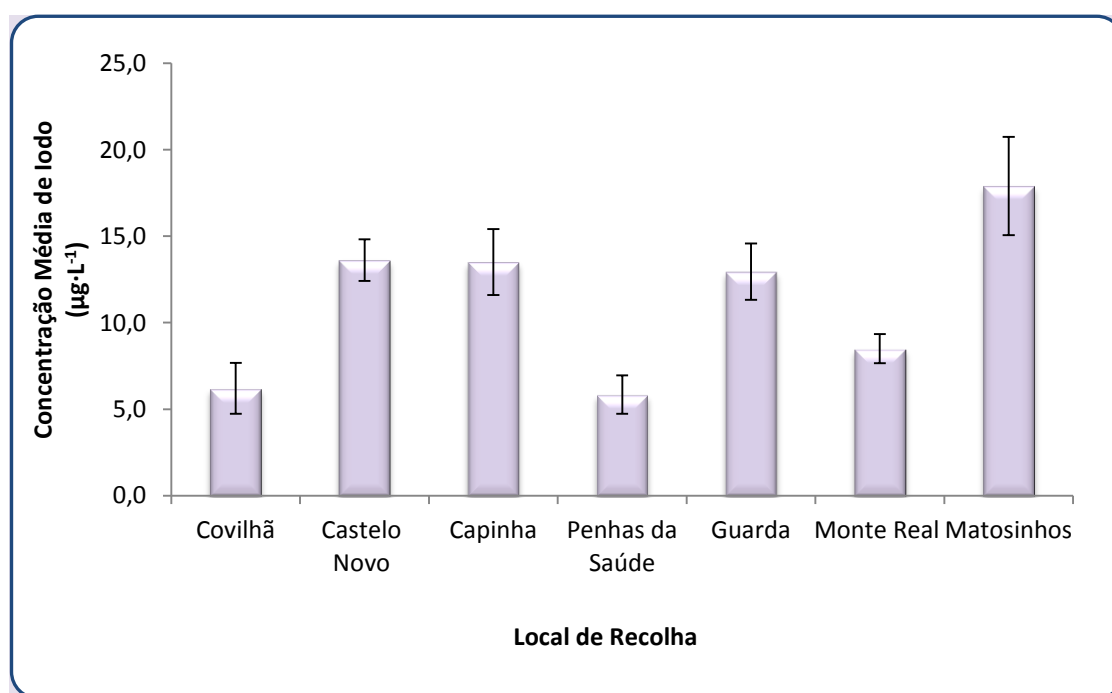


Figura 4.4: Representação gráfica dos valores obtidos do teor de iodo para a água bruta dos diferentes pontos de recolha, e o respectivo desvio padrão.

Como é possível observar através dos valores indicados na Tabela 4.20, e pela representação dos mesmos na Figura 4.4, verifica-se mais uma vez que todos os valores se situam abaixo do limite de quantificação do método, e só a água proveniente de Matosinhos com $17,90 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ é ligeiramente superior ao limite de detecção.

.∴ Através dos resultados obtidos neste subcapítulo relativamente ao teor de iodo, verifica-se que nestas águas não existe iodo. Contrariamente a alguns países europeus, como por exemplo a Dinamarca onde a concentração de iodo pode ir até $139 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Andersen *et al*, 2008).

4.2 Metais Pesados

O presente estudo foi feito com o objectivo de determinar a concentração de Zn, Cu, Mn e Se em amostras de água, uma vez que as suas concentrações são geralmente baixas. Neste trabalho apenas foi possível estudar o teor do Zn, Cu e Mn, uma vez que, por falta de recursos, o Se não pode ser determinado.

A concentração dos metais em estudo foi calculada através do método do padrão externo. As medidas foram realizadas em triplicado, utilizando-se a espectrofotometria de absorção atómica com chama (ar-acetileno). Para cada metal foram optimizadas as condições de medição e utilizadas lâmpadas de cátodo vazio específicas.

O teor de Zn, Mn e Cu foi determinado nas mesmas amostras de águas, brutas e tratadas, usadas na determinação do teor de iodo, sendo no entanto o número inferior (37 determinações).

As Tabelas 4.21 e 4.22, mostram a localização dos pontos de recolha, a data de análise e o número de determinações efectuadas.

Tabela 4.21: Água Tratada: Locais de recolha, data de análise e número de determinações.

Localidade	Data de Análise	Número de Determinações
Covilhã	14-04-2011	8
	19-04-2011	
	04-05-2011	
	10-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
	31-05-2011	
	07-06-2011	
Castelo Novo	14-04-2011	7
	19-04-2011	
	04-05-2011	
	10-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
	31-05-2011	
Capinha	14-04-2011	6
	28-04-2011	
	04-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
	07-06-2011	
Penhas da Saúde	14-04-2011	3
	19-04-2011	
	21-04-2011	
Guarda	14-04-2011	6
	28-04-2011	
	04-05-2011	
	10-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
Monte Real	24-05-2011	4
	26-05-2011	
	31-05-2011	
	07-05-2011	
Póvoa de Varzim	14-04-2011	3
	19-04-2011	
	21-04-2011	

Tabela 4.22: Água Bruta: Locais de recolha, data de análise e número de determinações.

Localidade	Data de Análise	Número de Determinações
Covilhã	28-04-2011	7
	04-05-2011	
	10-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
	31-05-2011	
	07-06-2011	
Castelo Novo	14-04-2011	7
	19-04-2011	
	04-05-2011	
	10-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
	31-05-2011	
Capinha	14-04-2011	6
	28-04-2011	
	04-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
	07-06-2011	
Penhas da Saúde	14-04-2011	3
	19-04-2011	
	21-04-2011	
Guarda	14-04-2011	6
	28-04-2011	
	04-05-2011	
	10-05-2011	
	17-05-2011	
	24-05-2011	
Monte Real	24-05-2011	4
	26-05-2011	
	31-05-2011	
	07-05-2011	
Matosinhos	14-04-2011	3
	19-04-2011	
	21-04-2011	

Nos subcapítulos 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3 são apresentados os teores dos metais Cu, Mn e Zn, respectivamente e simultaneamente fez-se o tratamento estatístico correspondente às curvas de calibração necessárias para a quantificação por absorção atómica.

Tal como na secção anterior as soluções padrão de cada um dos três metais são designadas por P_i , onde o índice i corresponde à concentração.

4.2.1 Cobre

A absorvância média obtida correspondente às soluções padrão de cobre assim como o valor médio e o desvio padrão associado, apresentam-se na Tabela 4.23.

Tabela 4.23: Valores de absorvância correspondentes aos padrões de calibração.

Concentração (mg·L ⁻¹)	Absorvâncias Medidas (nm)						Desvio Padrão
P _{0,003}	0,001	0,006	0,006	0,006	0,005	0,005	0,002
P _{0,005}	0,014	0,014	0,015	0,015	0,016	0,015	0,001
P _{0,010}	0,029	0,027	0,029	0,031	0,033	0,033	0,002
P _{0,025}	0,074	0,070	0,076	0,077	0,083	0,083	0,005
P _{0,050}	0,147	0,145	0,150	0,156	0,167	0,166	0,010
P _{0,075}	0,222	0,227	0,227	0,235	0,249	0,243	0,011
P _{0,100}	0,296	0,301	0,302	0,318	0,330	0,327	0,015
P _{0,125}	0,368	0,377	0,387	0,389	0,413	0,407	0,017

A partir dos valores de absorvância construiu-se a curva de calibração segundo o método dos mínimos quadrados (Figura 4.5).

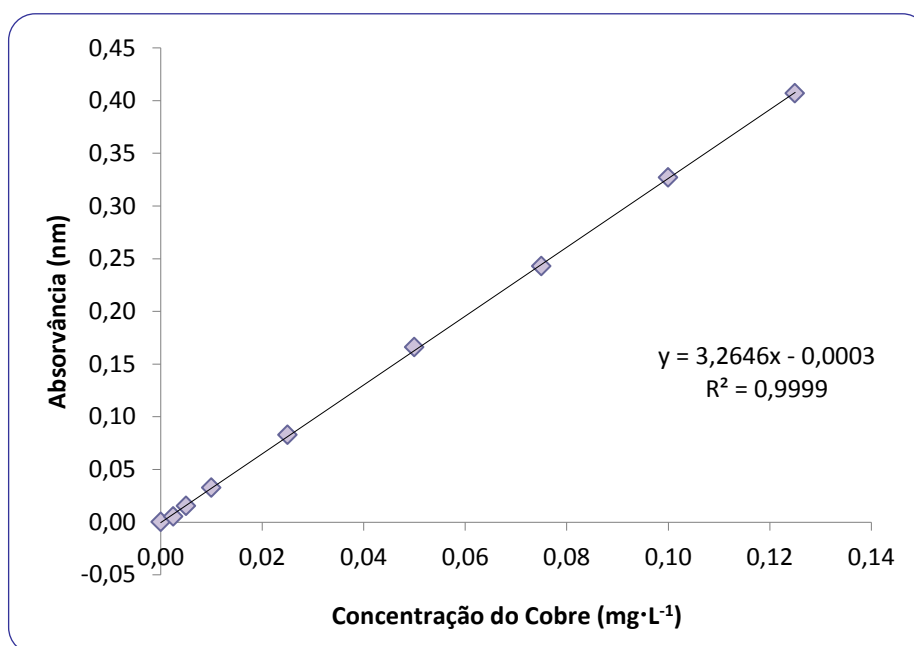


Figura 4.5: Curva de calibração.

Os parâmetros de regressão da curva de calibração são apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24: Parâmetros da curva de calibração.

Parâmetro	Valor
R^2	0,999
Declive (b)	3,265
Ordenada na Origem (a)	-0,0003
$S_{y/x}$	0,0019

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados através da equação (2.11 e 2.12) e estão registados na Tabela 4.25. Na mesma tabela apresenta-se o desvio padrão (S_m) e o coeficiente de variação do método (CV_m), calculados através das equações 4.2 e 4.3, respectivamente. Ainda na mesma tabela faz-se referência à sensibilidade do método.

Tabela 4.25: Valores de LD e LQ, desvio padrão (S_m), coeficiente de variação do método (CV_m) e Sensibilidade.

Parâmetro	Valor
LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1,97
LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	5,64
S_m	5,82E-04
CV_m (%)	2,42
Sensibilidade	3,27

A partir da curva de calibração procedeu-se à determinação do teor de cobre nas amostras de água (água tratada e bruta), cujos valores são apresentados nas Tabelas 4.26 e 4.27, respectivamente.

Tabela 4.26 Água tratada: Teor médio de cobre e desvio padrão.

Localidade	Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de Determinações
Covilhã	0,53	0,11	8
Castelo Novo	23,68	1,76	7
Capinha	0,50	0,06	6
Penhas da Saúde	0,36	0,11	3
Guarda	0,35	0,13	6
Monte Real	1,96	0,17	4
Póvoa de Varzim	1,01	0,10	3

Tabela 4.27 Água Bruta: Teor médio de cobre e desvio padrão.

Localidade	Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de Determinações
Covilhã	0,67	0,08	7
Castelo Novo	0,70	0,07	7
Capinha	2,44	0,53	6
Penhas da Saúde	0,55	0,06	3
Guarda	9,50	0,62	6
Monte Real	0,25	0,06	4
Matosinhos	0,40	0,10	3

Foi observada uma diferença significativa na concentração de cobre nas águas. O valor mais elevado foi detectado na água tratada para a amostra de Castelo Novo e foi significativamente diferente da concentração de outras amostras de água tratada e mesmo de água bruta. Como se trata de água da torneira é provável que esteja relacionado com fenómenos de corrosão metálica que normalmente se verificam nos sistemas de distribuição de águas, mais antigos.

.∴ A concentração de cobre nas águas tratadas analisadas variou entre $0,35 \pm 0,13$ a $23,68 \pm 1,76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $0,25 \pm 0,06$ a $9,50 \pm 0,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água bruta. O limite estabelecido pelo Decreto-Lei 306/2007 para o cobre para a água de consumo humano é de $2,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, pela análise das Tabelas 4.26 e 4.27, observa-se que os valores obtidos encontram-se muito abaixo do limite estabelecido.

O procedimento experimental e o tratamento de resultados, aqui apresentado, é equivalente para os três metais estudados, de modo que os dados são expostos segundo o mesmo critério.

4.2.2 Manganês

A intensidade de absorvância média obtida para cada padrão da curva de calibração referente a este metal, assim como o desvio padrão, apresentam-se na Tabela 4.28.

Tabela 4.28: Valor de absorvância medida para os padrões de calibração.

Concentração ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Absorvâncias Medidas (nm)						Desvio Padrão
P _{0,003}	0,003	0,007	0,006	0,008	0,004	0,007	0,002
P _{0,005}	0,009	0,015	0,014	0,014	0,013	0,010	0,002
P _{0,010}	0,022	0,031	0,031	0,029	0,028	0,031	0,004
P _{0,025}	0,057	0,077	0,075	0,073	0,072	0,082	0,009
P _{0,050}	0,116	0,154	0,150	0,143	0,147	0,165	0,016
P _{0,075}	0,181	0,230	0,223	0,215	0,223	0,249	0,022
P _{0,100}	0,245	0,304	0,297	0,285	0,293	0,329	0,028
P _{0,125}	0,307	0,380	0,376	0,353	0,368	0,410	0,034

A partir dos valores de absorvância desenhou-se então a curva de calibração para o manganês, segundo o método dos mínimos quadrados (Figura 4.6).

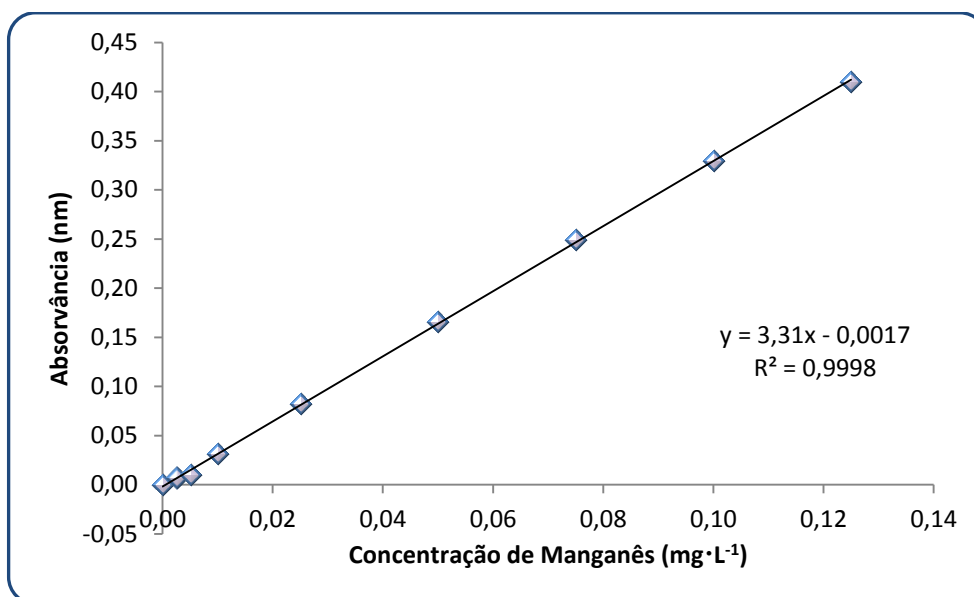


Figura 4.6: Curva de calibração.

Os parâmetros estatísticos correspondentes à curva de calibração anteriormente estabelecida são apresentados na Tabela 4.29.

Tabela 4.29: Parâmetros da curva de calibração.

Parâmetro	Valor
R^2	0,999
Declive (b)	3,310
Ordenada na Origem (a)	-0,0017
$S_{y/x}$	0,0024

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados através da equação (2.11 e 2.12) e estão registados na Tabela 4.30. Na mesma tabela apresenta-se o desvio padrão (S_m) e o coeficiente de variação do método (CV_m), calculados através das equações 4.2 e 4.3, respectivamente. Ainda na mesma tabela faz-se referência à Sensibilidade do método.

Tabela 4.30: Valores obtidos para o LD e LQ, desvio padrão, coeficiente de variação e sensibilidade do método.

Parâmetro	Valor
LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	2,40
LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	7,27
S_m	7,25E-04
CV_m (%)	3,02
Sensibilidade	3,31

Com a curva de calibração já definida procedeu-se à determinação do teor de manganês nas amostras de água (água tratada e bruta), cujos valores são apresentados nas Tabelas 4.31 e 4.32, respectivamente.

Tabela 4.31: Água tratada: Teor médio e desvio padrão.

Água Tratada	Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de Determinações
Covilhã	2,41	0,24	8
Castelo Novo	0,72	0,08	7
Capinha	0,56	0,05	6
Penhas da Saúde	0,51	0,00	3
Guarda	0,68	0,08	6
Monte Real	0,54	0,05	4
Póvoa de Varzim	0,61	0,00	3

Tabela 4.32: Água Bruta: Teor médio e desvio padrão.

Água Bruta	Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de Determinações
Covilhã	0,69	0,08	7
Castelo Novo	0,70	0,07	7
Capinha	2,44	0,53	6
Penhas da Saúde	0,55	0,06	3
Guarda	0,56	0,05	6
Monte Real	0,61	0,08	4
Matosinhos	0,58	0,06	3

. Para o manganês, não foi observada qualquer diferença significativa na concentração deste metal nas águas analisadas. Contudo, o valor mais elevado verificou-se na água bruta da Capinha no entanto não é significativamente diferente.

A concentração de manganês nas águas analisadas variou entre $0,51\pm 0,00$ a $2,41\pm 0,24$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água tratada e $0,55\pm 0,06$ a $2,44\pm 0,53$ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água bruta. O limite estabelecido pelo Decreto-Lei 306/2007 para o manganês para a água de consumo humano é de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.2.3 Zinco

Finalmente, apresentam-se os valores obtidos para o tratamento estatístico da curva de calibração assim como o teor de zinco correspondente aos os dois conjuntos de águas em questão. Na Tabela 4.33 estão os valores de intensidade de absorvância média e desvio padrão necessários para o traçado da curva de calibração.

Tabela 4.33: Valores de absorvância obtidos para os padrões de calibração de zinco.

Concentração (mg·L ⁻¹)	Absorvâncias Medidas (nm)						Desvio Padrão
P _{0,003}	0,048	0,027	0,030	0,030	0,035	0,040	0,008
P _{0,005}	0,096	0,063	0,068	0,075	0,068	0,081	0,012
P _{0,010}	0,175	0,122	0,132	0,130	0,143	0,145	0,019
P _{0,025}	0,355	0,255	0,270	0,276	0,276	0,280	0,035
P _{0,050}	0,645	0,489	0,500	0,495	0,491	0,502	0,061
P _{0,075}	0,899	0,680	0,693	0,699	0,712	0,726	0,082

Com estes valores desenhou-se a curva de calibração, segundo o método dos mínimos quadrados, Figura 4.7.

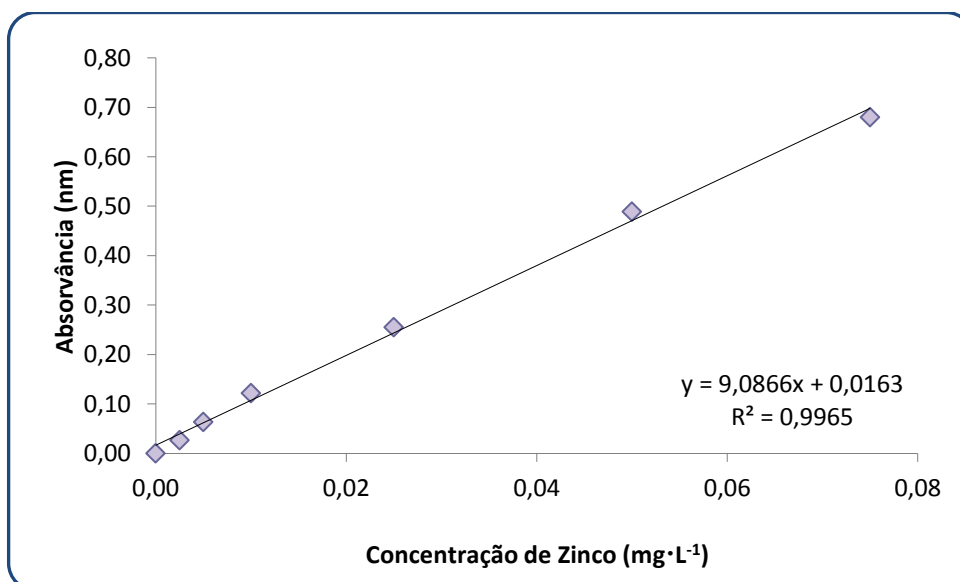


Figura 4.7: Curva de calibração para o zinco.

Os parâmetros estatísticos correspondentes à curva de calibração são apresentados na Tabela 4.34.

Tabela 4.34: Parâmetros da curva de calibração.

Parâmetro	Valor
R^2	0,997
Declive (b)	9,087
Ordenada na Origem (a)	0,016
$S_{y/x}$	0,016

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados através da equação (2.11 e 2.12) e o desvio padrão e o coeficiente de variação do método, calculados através das equações 4.2 e 4.3, respectivamente encontram-se na Tabela 4.35.

Tabela 4.35: Valores de LD e LQ, desvio padrão, coeficiente de variação e Sensibilidade do método.

Parâmetro	Valor
LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	4,74
LQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	5,58
S_m	1,43E-03
CV_m (%)	5,95
Sensibilidade	9,087

O teor de zinco das águas tratada e bruta está assinalado nas Tabelas 4.36 e 4.37.

Tabela 4.36: Água Tratada: Teor médio e desvio padrão.

Localidade	Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de Determinações
Covilhã	63,16	10,41	8
Castelo Novo	0,56	0,20	7
Capinha	0,00	0,00	6
Penhas da Saúde	0,00	0,00	3
Guarda	41,20	5,35	6
Monte Real	6,45	0,78	4
Póvoa de Varzim	0,46	0,12	3

Tabela 4.37: Água Bruta: Teor médio e desvio padrão.

Localidade	Concentração Média ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Número de Determinações
Covilhã	0,00	0,00	7
Castelo Novo	0,00	0,00	7
Capinha	0,00	0,00	6
Penhas da Saúde	0,00	0,00	3
Guarda	18,62	1,24	6
Monte Real	0,00	0,00	4
Matosinhos	0,00	0,00	3

∴ Foi observada uma diferença significativa na concentração de zinco nas diferentes fontes de águas. O valor mais elevado foi detectado na água tratada da Covilhã. Relativamente à água bruta o teor mais elevado foi encontrado na Guarda.

A concentração de zinco nas águas analisadas variou entre $0,00 \pm 0,00$ a $63,16 \pm 10,41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a água tratada e $0,00 \pm 0,00$ a $18,62 \pm 1,24 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para a água bruta.

Os valores elevados de zinco na água tratada devem-se provavelmente à falta de manutenção do sistema de canalização.

4.2.4 Conclusão

Em suma, pela análise das Tabelas 4.25, 4.30 e 4.35, pode-se inferir que o método mais sensível é o do Zinco, uma vez que apresenta um declive na recta de calibração, maior do que qualquer um dos outros. Contrariamente o método do cobre é o menos sensível.

Pode-se também verificar que o método que apresenta melhor correlação entre o valor da intensidade/sinal e o valor da concentração é o referente ao Cobre.

O coeficiente de variação do método (CV_m) é um parâmetro que avalia a qualidade do trabalho. Pelas Tabelas 4.25, 4.30 e 4.35, pode-se verificar que todos os elementos em estudo apresentam CV_m relativamente pequenos, pelo que é de supor que o laboratório apresenta um bom desempenho.

Verifica-se que para a água tratada apenas a da Covilhã apresenta valores superiores ao limite de quantificação, $23,68 \pm 1,76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o cobre. Para o manganês nenhum dos valores está acima do limite de quantificação e relativamente ao zinco apenas a Guarda e a Covilhã apresentam valores superiores, $41,20 \pm 5,35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $63,16 \pm 10,41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente.

Quanto à água bruta apenas a proveniente da Guarda apresenta valores superiores ao limite de quantificação, $9,50 \pm 0,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para o cobre. Para o manganês e para o zinco nenhum dos valores obtidos nas diferentes localidades está acima do limite de quantificação.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES E PRESPECTIVAS
FUTURAS

Capítulo 5. Conclusões e Perspectivas Futuras

A importância deste trabalho reside na necessidade de medir, através de um método analítico adequado, o iodo na água destinada ao consumo humano, e relacionar o teor de iodo, que se supõe ser baixo, com as doenças associadas à IDD. Existem diversos métodos para quantificar o iodo na água, sendo os métodos o “leuco cristal violeta” e o catalítico, os normalizados. Contudo é fundamental ter um método de análise validado e otimizado capaz de quantificar adequadamente, este elemento nas águas naturais e especificamente na água destinada ao consumo humano. Um processo de validação bem definido e fundamentado proporciona a certeza de que o sistema e o método são adequados ao uso pretendido. Assim, o objectivo primordial deste trabalho foi estudar, validar e implementar um método de análise elementar aplicado às águas naturais, e relacionar a carência de iodo com a existência de problemas na glândula tiróide, mais frequentes no interior do País, uma vez que o iodo é o elemento mais importante para o seu bom funcionamento e que o Decreto-Lei nº 306/2007 não prevê o seu valor paramétrico.

O método utilizado para quantificar o iodo nas amostras de água foi o de espectrofotometria de ultravioleta-visível “leuco cristal violeta”, que é um método espectrofotométrico de absorção molecular.

A validação do método foi efectuada após a selecção da gama de trabalho e seguidamente determinou-se os parâmetros de validação: sensibilidade, linearidade, coeficiente de variação do método, limiares analíticos, precisão intermédia, repetibilidade sendo a exactidão só avaliada através do erro relativo. Todas as determinações e testes realizados demonstram que os métodos cumprem pelo menos os mínimos estipulados pelos princípios descritos no Guia Relacre 13 relativamente à validação de métodos.

Desta forma e após inúmeras tentativas verificou-se que o intervalo da gama de trabalho situa-se entre 0,025 a 0,250 mg·L⁻¹. A linearidade apresenta um R² de 0,997; e o coeficiente de variação do método é de 3,34 %, o que representa uma bom desempenho no trabalho efectuado.

O método apresenta limites de detecção 14,5 µg·L⁻¹, enquanto o limite de quantificação obtido experimentalmente é de 46,4 µg·L⁻¹.

A repetibilidade do método é aceitável para os três níveis de concentração estudados, variando os valores de coeficiente de variação de repetibilidade entre 9,00 % para o primeiro nível de concentração, 3,82 % para o nível de concentração intermédia e 2,43 % para o

terceiro nível de concentração estudado, sendo 10 % o valor aceite pelo Laboratório Central de Análises (Guia Relacre 13, 2000).

Os valores obtidos para a precisão intermédia são aceitáveis uma vez que os valores obtidos experimentalmente são inferiores aos limites de precisão intermédia (R_z) calculados.

No que diz respeito ao estudo da exactidão do método analítico, apenas foi calculado o erro relativo, uma vez que por falta de recursos, durante a fase de estudo não foi possível fazer ensaios inter-laboratoriais.

A validação do método foi concretizada com sucesso.

Neste contexto, foram efectuadas análises a várias amostras de água tratada e de água bruta, de diferentes pontos de recolha. Apesar do número de amostras que foram analisadas não ser muito grande, devido a falta de recursos, tentou-se juntar o maior número possível de resultados.

Os resultados obtidos permitem concluir que, relativamente às águas analisadas pode afirmar-se que o teor de iodo é inferior a $46,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ou seja inferior ao limite de quantificação do método, o que significa que o teor de iodo nestas águas é muito baixo como inicialmente se suspeitava. A zona interior do país é considerada uma zona endémica relativamente ao hipotiroidismo. Já em 1987, estudos efectuados na região de castelo Branco, revelaram graves problemas de bócio associados à carência de iodo.

O resultado da análise dos diferentes metais estudados para as diferentes águas naturais que foram analisadas através do método da absorção atómica com chama e em condições adequadas de operação do equipamento, não apresentam concentrações acima do estipulado pelo Decreto-Lei nº306/2007. Os valores de cobre obtidos superiores ao limite de quantificação encontram-se na água tratada da amostra da Covilhã, $23,68 \pm 1,76 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, e na amostra de água bruta da Guarda, $9,50 \pm 0,62 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Relativamente ao manganês nenhum dos valores obtidos ultrapassou o limite de quantificação, e o zinco apenas apresenta valores superiores para a água tratada da Guarda e Covilhã, $41,20 \pm 5,35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $63,16 \pm 10,41 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados para o zinco podem ser justificados, em alguns casos, pela falta de manutenção do sistema de canalização, da rede de distribuição da água.

Numa perspectiva futura, se o método de análise for executado, poderiam ser elaboradas cartas de controlo e analisar um maior conjunto de amostras por forma a verificar se o processo está estatisticamente controlado. Era também muito interessante incidir o estudo sobre as águas subterrâneas.

Existem novas metodologias analíticas e pensando nos métodos instrumentais de análise, cujos limites de quantificação são da ordem dos ng, é possível dosear quantidades vestigiais de iodo e mesmo de metais. Uma vez que a quantidade de iodo encontrado na água é muito baixa, torna-se necessário quantificar o iodo através de métodos cromatográficos (HPLC) ou

cromatografia iónica (IC). Considera-se, através de pesquisa bibliográfica efectuada que o doseamento do iod-131 (^{131}I), através de método radioquímicos efectuados permite dosear, adequadamente, o iodo nas águas.

Referências Bibliográficas

Aihara, K.; Nishi, Y.; Hatano, S.; Kihara, M.; Yoshimitsu, K.; Takeichi, N.; Ito, T.; Ezaki, H.; Usui, T. *Zinc, copper, manganese, and selenium metabolism in thyroid disease*. The American Journal of Clinical Nutrition 40:pp 26-35, 1984.

Al-Juboori, I. A.; Al-Rawi, A.; A-Hakeim, H. K. *Estimation of Serum Copper, Manganese, Selenium, and Zinc in Hypothyroidism Patient*. IJFS Journal Biology, 68(2): pp.121-126, 2009.

Alarcón-Corredor, O. M. *Los elementos traza*. Revista Médica de la Extensión Portuguesa-ULA. Vol.4, N°3, 2009.

Alloway, B.J. *Heavy metals in soils*. Blackie Academic & Professional. p368, 1995.

Alternative Medecine Review. *Iodine Monograph*. Vol. 15, 2010.

Ahmad, S.; Mannan, A.; Qureshi, H.; Khan, S. M.; Ahmad, I. *Iodine Determination in Water Samples from Endemic Goitrous Areas Using NAA*. Elsevier Sequoia S.A., vol.120, No. 1, pp.89-95, 1988.

Andersen, S., Hvingel, B., Laurberg, P. - *Iodine content of traditional Greenlandic food items and tap water in West and West Greenland*. International Journal of Circumpolar Health, 61, pp. 332-340, 2002.

Anjos, A. P. *Determinação de traços de manganés por espectrofotometria de absorção atômica após pré-concentração selectiva em coluna contendo 1-82-piridilazo)-2-naftol [Pan] adsorvido em naftaleno microcristalino*. Dissertação de Mestrado em Química Analítica na Universidade Estadual de Campinas, 1992.

Arthur, J. R.; Beckett, G. J. *Thyroid function*. British Medical Bulletin; 55 (No. 3): 658-66, 1999.

Bem, E. M. *Determination of Selenium in the Environment and in Biological Material*. Environmental Health Perspectives, Vol.37, pp.183-200, 1981.

Catarino, S.; Curvelo-Garcia, A.S.; Sousa, R. B. *Revisão: Elementos Contaminantes Nos Vinhos*. Ciência Téc. Vitiv. 23 (1) 3-19. 2008.

Chang, C.J.; Gutenmann, W.H.; Reid, C. M.; Lisk, D.J. *Selenium content of Brazil nuts from two geographic locations in Brazil*. Chemosphere, vol. 30, n. 4, p. 801-802, 1995.

Coelho, N. M. M.; Baccan, N. *Determinação de ultratraços de selênio em urina por geração de hidretos e espectrometria de absorção atômica em fluxo*. Eclética Química, 29(1): 7-14, 2004.

Diário da República, I série - A - Nº 176 - 1 de Agosto de 1998 (Decreto-Lei nº236/98).

Diário da República, 1ª série - Nº 164 - 27 de Agosto de 2007 (Decreto-Lei nº306/2007).

Duarte, G.C.; Tomimor, E.K.; Boriolli, R.A.; Ferreira, J.E.; Catarino, R.M.; Camargo, R.Y.A.; Medeiros-Neto, G. *Avaliação ultra-sonográfica da tireóide e determinação da iodúria em escolares de diferentes regiões do Estado de São Paulo*. Arq Bras Endocrinol Metab, vol.48, nº6, 2004.

Edmonds, J.S.; Morita, M. *The Determination of Iodine Species in Environmental and Biological Samples*. IUPAC, Vol. 70, Nº8, 1998.

Freitas, S. K. B. *Uma Metodologia para Screening Analysis de Sucos Cítricos Utilizando um Analisador Automático em Fluxo-Batelada, Espectrometria UV-VIS e Técnicas Quimiométricas*. Dissertação de Mestrado em Química na Universidade Federal da Paraíba, 2006.

Guia Relacre 13: *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. 2000.

Gray, L. *The Elements Iodine*. Benchmark Books, 2005.

Gray, N. F. *Drinking Water Quality: Problems and Solutions*. Chicester. John Wiley and Sons, 1994.

Gunnar, F. N.; Bruce A. F.; Nordberg M.; Friberg L. *Handbook on the Toxicology of Metals*. Elsevier. 3rd edition; 2007.

Henn, L. E. *Determination of Selenium in Water and Industrial Effluents by Flameless Atomic Absorption*. Analytical Chemistry, Vol.47, N.3, March 1975.

Henriques, M. *Análise quantitativa de metais contaminantes em adoçantes comercializados em Portugal*. Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade e Toxiologia dos Alimentos na Universidade de Lisboa, 2010.

Hou, X. *Iodine Speciation in Foodstuffs, Tissues, and Environmental Samples: Iodine Species and Analytical Method*. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. pp.139-150, 2009.

INMETRO, *Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos*. DOQ-CGCRE-008, 2003.

Ito, K.; Hirokawa, T. *Iodine and Iodine Species in Seawater: Speciation, Distribution, and Dynamics*. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. pp.83-91, 2009.

Kirk-Othmer. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. John Wiley & Sons, 2005.

Krug, F. J.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, P. V. *Espectrometria de Absorção Atômica. Parte 1. Fundamentos e atomização com chama*. 2004.

Júnior, A. F. S. *Determinação de Mn, Cu E Zn em matrizes salinas após separação e pré-concentração usando amberlite xad-7 impregnada com vermelho de alizarina S*. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 6B, 1086-1090, 2002.

Leal, A. A. X.; Assumpção, C.; Henriques; Luna, A. S.; *Validação e estimativa da incerteza do método de determinação de fósforo por espectrofotometria UV-Vis*. *Revista Analytica*, Nº32, 2008. *The British Journal of Radiology*, 71: 535-543, 1998.

Laurberg, S. A. P.; *The Nature of Iodine in Drinking Water*. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. pp.124-124, 2009.

Lazarus, J. H.; Smyth, P. P.A. *Iodine Deficiency in Pregnancy: Iodine Deficiency and Supplementation in Pregnancy*. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. pp.469-476, 2009.

Lin, C.C.; Chao, J. H. *Radiochemistry of Iodine: Relevance to Health and Disease*. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. pp.171-182, 2009.

Mendes, A.S.R. *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*. Laboratório Regional de Contolo da Qualidade da Água, Funchal.

Mendes, B., Oliveira, J.F.S. *Qualidade da água para consumo humano*. Lidel, 2004.

Navarro, A. M.; Oliveira, L. A.; Pelizzari, L.A.; Ferreira, J. F.; Ribeiro, C, A. F.; Costa, T. M. B.; Oliveira, J. E. D. *Alterações Físico-Química e Sensorial da Água Potável Fortificada com Diferentes sais de Iodo*. Alim. Nutr., vol.19, n.3, pp.321-328, 2008.

Navarro, M.; López, H.; Ruiz, M. L.; González, S.; Pérez, V.; López, M. C. *Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake*. The Science of the Total Environment. pp. 245-252, 1995.

Nazifi,S.; Saeb, M.; Abangah, E.; Karimi, T. *Studies on the relationship between thyroid hormones and some*. Veterinarski Arhiv 78 (2), 159-165, 2008.

O´Hare, N. J.; Murphy, D.; Malone, J. F. *Thyroid dosimetry of adult European populations*.

Panneels, V.; Juvenal, G.; Boeynaems, J.M.; Dumont, J.E.; Sande, J. V. *Iodide Effects on the Thyroid: Biochemical, Physiological, Pharmacological, and Clinical Effects of Iodide in the Thyroid*. Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects. pp.303-314, 2009.

Rädlinger R.; Heumann, k. G. *Iodine Determination in Food Samples Using Inductively Coupled Plasma Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Anal. Chem. vol.70, pp.2221-2224, 1998.

Samoza, M. A., *Contribución al desarrollo de métodos indirectos de análisis por espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito: determinación de yodo*. Tese de Doutoramento apresentada á Universidade de Santiago de Compostela.2001.

Seixas, T. G.; Kehrig, H. A. *O Selénio no Meio Ambiente*. Oecol. Bras., 11 (2): 264-276, 2007.

Shah, M.; Kannamkumarath, S. S.; Caruso, J. A.; Wuilloud,R. G. *Iodine Speciation of Seaweed Using Different Chromatographic Techniques With ICP-MS Detection*. J. Anal. At. Spectrom., vol.20, pp.176-182, 2005.

Skoog, D. A.; West. ; Holler, F. J.; Crouch. *Fundamentos de Química Analítica*. McGraw-Hill. 8rd ed, 2001a.

Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Princípios de Análisis Instrumental*. McGraw-Hill. 5rd ed, 2001b.

Soldin, O. P.; Aschner, M. *Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: Potential links*. *Neurotoxicol.*, 2007, 28: 951-956.

Sood, A.; Moorthy, D. *The Effects of Salt Iodization on Normal Thyroid Physiology and Graves' Disease in India*. *Comprehensive Handbook of Iodine: Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects*. pp.847-851, 2009.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2005. APHA; AWWA; WPCF. 21st edition; 2005.

Suess, M. J. *Examination of Water for Pollution Control: a reference handbook*. Pergamon Press, vol.2, 1982.

Takaku, Y.; Shimamura, T; Masuda, K; Igarashi, Y. *Iodine Determination in Natural and Tap Water Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. *Analytical Sciences*, Vol. 1, 1995.

Templeton, D. M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L. G.; Muntau, H.; van Leeuwen, H. P.; Łobiński, R. *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*. *Pure Appl. Chem.* 72:1453-1470, 2000

Tian, R. C.; Nicolas, E. *Iodine speciation in the northwestern Mediterranean Sea: method and vertical profile*. *Marine Chemistry*, Vol.48, 1995.

Vanacor, R. *Variabilidade da Excreção de Iodo Urinario em 24H e sua Associação com a Natriurese*. Dissertação de Mestrado em Medicina na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007)

Vandecasteele, C.; Block, C. B. *"Modern Methods for Trace Element Determination"*. John Wiley & Sons, West Sussex, 1997.

Venezuela, T. C. *Determinação de contaminantes metálicos (metal tóxico) num solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de nova friburgo*. Dissertação de

Mestrado em Saúde Pública na Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, 2001.

Vieira, K. M. *Aplicação dos processos oxidativos, redutivos e (foto)electroquímicos na degradação de fármacos em meio aquoso*. Tese de Doutorado em Ciências-Química na Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

Vogel, A. I. *Análise Química Quantitativa*. LTC, 6ª ed, 2002.

WaterAid. *Water Quality Fact Sheet: Iodine*. British Geological Survey, 2000.

Wehrli, B.; Koppenol, W. H.; Gunten, U.; Bruchet, A. *Behavior of Iodine Species in Oxidative Processes During Drinking Water Treatment*. Diss. ETH, N.13429, 2000.

Wei, L.; Zhang, X.; Dai, Y.; Huang, J.; Xie, Y.; Xiao, K. *Online Preconcentration and Determination of Trace Amounts of Zinc in Nature Waters*. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 2008.

World Health Organization. *Assessment of iodine deficiency disorders and monitoring their elimination*. Geneva, 2007.

World Health Organization. *Iodine deficiency in Europe: a continuing public health problem*. Geneva, 2007a.

Zuane, J. *Handbook of drinking water quality: Standards and Controls*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1990.

Anexo A: Decreto-Lei n. 236/98 de 1 de Agosto

ANEXO I

Qualidade das águas doces superficiais destinadas à produção de água para consumo humano

Parâmetros	Expressão dos resultados	A1		A2		A3	
		VMR	VMA	VMR	VMA	VMR	VMA
pH, 25°C	Escala de Sorensen	6,5-8,5	-	5,5-9,0	-	5,5-9,0	-
Cor (após filtração simples)	mg/l, escala Pt-Co	10	(O) 20	50	(O) 100	50	(O) 200
Sólidos suspensos totais	mg/l	25	-	-	-	-	-
Temperatura	°C	22	(O) 25	22	(O) 25	22	(O) 25
Condutividade	µS/cm, 20°C	1 000	-	1 000	-	1 000	-
Cheiro	Factor de diluição, a 25°C	3	-	10	-	20	-
Nitratos (*)	mg/l NO ₃	25	(O) 50	-	(O) 50	-	(O) 50
Fluoretos (1)	mg/l F	0,7-1,0	1,5	0,7-1,7	-	0,7-1,7	-
Cloro orgânico total extraível	mg/l Cl	-	-	-	-	-	-
Ferro dissolvido (*)	mg/l Fe	0,1	0,3	1,0	2,0	1,0	-
Manganês (*)	mg/l Mn	0,05	-	0,10	-	1,00	-
Cobre	mg/l Cu	0,02	(O) 0,05	0,05	-	1,00	-
Zinco	mg/l Zn	0,5	3,0	1,0	5,0	1,0	5,0
Boro	mg/l B	1,0	-	1,0	-	1,0	-
Berílio	mg/l Be	-	-	-	-	-	-
Cobalto	mg/l Co	-	-	-	-	-	-
Níquel	mg/l Ni	-	-	-	-	-	-
Vanádio	mg/l V	-	-	-	-	-	-
Arsénio	mg/l As	0,01	0,05	-	0,05	0,05	0,10
Cádmio	mg/l Cd	0,001	0,005	0,001	0,005	0,001	0,005
Crómio total	mg/l Cr	-	0,05	-	0,05	-	0,05
Chumbo	mg/l Pb	-	0,05	-	0,05	-	0,05
Selénio	mg/l Se	-	0,01	-	0,01	-	0,01
Mercurio	mg/l Hg	0,0005	0,0010	0,0005	0,0010	0,0005	0,0010
Bário	mg/l Ba	-	0,1	-	1,0	-	1,0
Cianetos	mg/l CN	-	0,05	-	0,05	-	0,05
Sulfatos	mg/l SO ₄	150	250	150	(O) 250	150	(O) 250
Cloretos	mg/l Cl	200	-	200	-	200	-
Substâncias tensoactivas (que reagem com o azul-de-metileno).	mg/l, sulfato de lauril e sódio	0,2	-	0,2	-	0,5	-
Fosfatos (*) (2)	mg/l P ₂ O ₅	0,4	-	0,7	-	0,7	-
Fenóis	mg/l C ₆ H ₅ OH	-	0,001	0,001	0,005	0,010	0,100
Hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados	mg/l	-	0,05	-	0,20	0,50	1,00
Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares	µg/l	-	0,2	-	0,2	-	1,0
Pesticidas totais (paratíio, hexaclorociclo-hexano, dieldrina e outros).	µg/l	-	1,0	-	2,5	-	5,0
Carência química de oxigénio (CQO) (*)	mg/l O ₂	-	-	-	-	30	-
Oxigénio dissolvido (*) (3)	% saturação de O ₂	70	-	50	-	30	-
Carência bioquímica de oxigénio a (CBO ₅ , 20°C) (*)	mg/l O ₂	3	-	5	-	7	-
Azoto Kjeldahl (excluindo o azoto de NO ₂ e NO ₃)	mg/l N	1	-	2	-	3	-
Azoto amoniacal	mg/l NH ₄	0,05	-	1,00	1,50	2,00	(O) 4,00
Substâncias extraíveis com clorofórmio	mg/l	0,1	-	0,2	-	0,5	-
Carbono orgânico total (COT)	mg/l C	-	-	-	-	-	-

Parâmetros	Expressão dos resultados	A1		A2		A3	
		VMR	VMA	VMR	VMA	VMR	VMA
Carbono orgânico residual após floculação e filtração através de membrana (5µm).	mg/l C	-	-	-	-	-	-
Coliformes totais	/100 ml	50	-	5 000	-	50 000	-
Coliformes fecais	/100 ml	20	-	2 000	-	20 000	-
Estreptococos fecais	/100 ml	20	-	1 000	-	10 000	-
Salmonelas	Ausência em 5 000 ml	-	-	Ausência em 1 000 ml	-	-	-

(O) Os limites podem ser excedidos em caso de condições geográficas ou meteorológicas excepcionais (n.º 1 do artigo 10.º).
 (*) Os limites podem ser excedidos para os parâmetros marcados com * em lagos de pouca profundidade e baixa taxa de renovação.
 (1) Os valores indicados constituem os limites inferior e superior das concentrações, determinados em função da média anual das temperaturas máximas diárias.
 (2) Este parâmetro é incluído para satisfazer as exigências ecológicas de certos meios.
 (3) Refere-se a um VmR.

VMR — valor máximo recomendado.
 VMA — valor máximo admissível.

ANEXO II

Esquemas tipo de tratamento referentes às classes A1, A2 e A3 das águas superficiais

Classe A1 — tratamento físico e desinfecção.

Classe A2 — tratamento físico e químico e desinfecção.

Classe A3 — tratamento físico, químico de afinação e desinfecção.

ANEXO III

Métodos analíticos de referência para águas superficiais

Parâmetros	Expressão dos resultados	Limite de detecção	Precisão (±)	Exactidão (±)	Métodos analíticos de referência (1)
pH, 25°C	Escala de Sorensen	-	0,1	0,2	Electrometria.
Cor (após filtração simples)	mg/l, escala Pt-Co	5	10%	20%	Método fotométrico, após filtração simples, com padrões da escala platina-cobalto.
Sólidos suspensos totais	mg/l	-	5%	10%	Centrifugação (tempo mínimo de cinco minutos; aceleração média de 2800 g a 3200 g), secagem a 105°C e pesagem. Filtração através de membrana filtrante de 0,45 µm, secagem a 105°C e pesagem.
Temperatura	°C		0,5	1,0	Termometria.
Condutividade	µS/cm, 20°C	-	5%	10%	Electrometria.
Cheiro	Factor de diluição, a 25°C	-	-	-	Diluição sucessiva®.
Nitratos	mg/l NO ₃	2	10%	20%	Espectrometria de absorção molecular.
Fluoretos	mg/l F	0,05	10%	20%	Espectrometria de absorção molecular. Eléctrodos específicos.
Cloro orgânico total extraível	mg/l Cl				
Ferro dissolvido	mg/l Fe	0,02	10%	20%	Espectrometria atómica após filtração sobre membrana filtrante (0,45 µm). Espectrometria de absorção molecular após filtração sobre membrana filtrante (0,45 µm).
Manganês	mg/l Mn	(2) 0,01	10%	20%	Espectrometria atómica.
		(3) 0,02	10%	20%	Espectrometria atómica. Espectrometria de absorção molecular.

Determinação de Iodo e Metais Pesados em Águas Naturais

Parâmetros	Expressão dos resultados	Limite de detecção	Precisão (±)	Exactidão (±)	Métodos analíticos de referência (1)
Cobre (10)	mg/l Cu	0,005	10 %	20 %	Espectrometria atómica.
		(4) 0,02	10 %	20 %	Espectrometria de absorção molecular.
Zinco (10)	mg/l Zn	(2) 0,01	10 %	20 %	Espectrometria atómica.
		0,02	10 %	20 %	Espectrometria de absorção molecular.
Boro (10)	mg/l B	0,1	10 %	20 %	Espectrometria atómica. Espectrometria de absorção molecular 8.
Berílio	mg/l Be	-	-	-	
Cobalto	mg/l Co	-	-	-	
Níquel	mg/l Ni	-	-	-	Espectrometria atómica.
Vanádio	mg/l V	-	-	-	
Arsénio (10)	mg/l As	(2) 0,002	20 %	20 %	Espectrometria atómica.
		(5) 0,01			Espectrometria atómica. Espectrometria de absorção molecular.
Cádmio (10)	mg/l Cd	0,0002 (2) 0,001	30 %	30 %	Espectrometria atómica. Polarografia.
Crómio total (10)	mg/l Cr	0,01	20 %	30 %	Espectrometria atómica. Espectrometria de absorção molecular.
Chumbo (10)	mg/l Pb	0,01	20 %	30 %	Espectrometria atómica. Polarografia.
Selénio (10)	mg/l Se	0,005	-	-	Espectrometria atómica.
Mercúrio (10)	mg/l Hg	0,001 (2) 0,0002	30 %	30 %	Espectrometria atómica sem chama (vaporização a frio).
Bário (10)	mg/l Ba	0,02	15 %	30 %	Espectrometria atómica.
Cianetos	mg/l CN	0,01	20 %	30 %	Espectrometria de absorção molecular.
Sulfatos	mg/l SO ₄	10	10 %	10 %	Análise gravimétrica. Complexometria com EDTA. Espectrometria de absorção molecular.
Cloretos	mg/l Cl	10	10 %	10 %	Titulação (método de Mohr). Espectrometria de absorção molecular.
Substâncias tensoactivas (que reagem com o azul-de-metileno).	mg/l, sulfato de laurilo e sódio	0,05	20 %		Espectrometria de absorção molecular.
Fosfatos	mg/l P ₂ O ₅	0,02	10 %	20 %	Espectrometria de absorção molecular.
Fenóis	mg/l C ₆ H ₅ OH	0,0005 (2) 0,001	0,0005 30 %	0,0005 50 %	Espectrometria de absorção molecular 8. Método de 4-aminopirina 8. Método da parantranilina 8.
Hidrocarbonetos dissolvidos ou emulsionados.	mg/l	0,01	20 %	30 %	Espectrometria no infravermelho após extração pelo tetracloreto de carbono 8.
		(2) 0,04			Gravimetria após extração por meio de éter de petróleo 8.

Determinação de Iodo e Metais Pesados em Águas Naturais

Parâmetros	Expressão dos resultados	Limite de detecção	Precisão (±)	Exatidão (±)	Métodos analíticos de referência (1)
Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (10).	µg/l	0,04	50 %	50 %	Medição da fluorescência por ultravioleta após cromatografia em camada fina. Medição comparativa em relação a uma mistura de controlo constituída por seis substâncias padrão com a mesma concentração (9) 11.
Pesticidas totais (paratão, hexaclorociclo-hexano, dieldrina e outros) (10).	µg/l	0,1	50 %	50 %	Cromatografia em fase gasosa ou líquida após extração por solventes adequados e purificação. Identificação dos constituintes da mistura. Determinação quantitativa (9) 8.
Carência química de oxigénio (CQO)	mg/l O ₂	15	20 %	20 %	Método do dicromato de potássio.
Oxigénio dissolvido	% saturação de O ₂	5	10 %	10 %	Método de Winkler 8. Método electroquímico 8.
Carência bioquímica de oxigénio (CBO ₅ , 20°C).	mg/l O ₂	2	1,5	2	Determinação de O ₂ dissolvido antes e após cinco dias de incubação a 20°C ± 1°C ao abrigo da luz, com adição de um inibidor da nitrificação.
Azoto Kjeldahl (não inclui o azoto de NO ₂ e NO ₃).	mg/l N	0,5	0,5	0,5	Mineralização, destilação segundo o método Kjeldahl e determinação do amónio por espectrometria de absorção molecular ou titulação.
Azoto amoniacal	mg/l NH ₄	(2) 0,01 (2) 0,1	(2) 0,03 (2) 10 %	(2) 0,03 (2) 20 %	Espectrometria de absorção molecular.
Substâncias extraíveis com clorofórmio.	mg/l	(1)	-	-	Extração a pH neutro com clorofórmio purificado, evaporação no vácuo à temperatura ambiente e pesagem do resíduo 8.
Carbono orgânico total (COT)	mg/l C	-	-	-	
Carbono orgânico residual após floculação e filtração através de membrana (5 µm).	mg/l C	-	-	-	
Coliformes totais	/100 ml	(2) 5 (2) 500 (2) 5 (2) 500			Cultura a 37°C em meio sólido específico adequado para o efeito com (2) ou sem (2) filtração e contagem das colónias. As amostras devem ser diluídas ou, quando apropriado, concentradas a fim de que o número de colónias fique compreendido entre 10 e 100. Identificação por detecção de gás, se necessária*. Método de diluição com fermentação em substratos líquidos em pelo menos três tubos em três diluições. Subcultura dos tubos positivos em meios de confirmação. Contagem em número mais provável (NMP). Temperatura de incubação 37°C ± 1°C*.
Coliformes fecais	/100 ml	(2) 2 (2) 200 (2) 2 (2) 200			Cultura a 44°C em meio sólido específico adequado com (2) ou sem (2) filtração e contagem das colónias. As amostras devem ser diluídas ou, quando apropriado, concentradas a fim de que o número de colónias fique compreendido entre 10 e 100. Se necessário, identificação por gás*. Método de diluição com fermentação em substratos líquidos em pelo menos três tubos em três diluições. Subculturas dos tubos positivos como meios de confirmação. Contagem em número mais provável (NMP). Temperatura de incubação 44°C ± 0,5°C*.

Parâmetros	Expressão dos resultados	Limite de detecção	Precisão (8)	Exactidão (8)	Métodos analíticos de referência (1)
Estreptococos fecais	/100 ml	(2) 2 (1) 200			Cultura a 37°C em meio sólido específico adequado com (2) ou sem (1) filtração e contagem de colónias. As amostras devem ser diluídas ou concentradas a fim de que o número de colónias fique compreendido entre 10 e 100*. Método de diluição em caldo de azoto de sódio em pelo menos três tubos para cada uma das três diluições. Contagem segundo NMP*.
Salmonelas (12)		1/5000 ml 1/1000 ml			Concentração por filtração (através de membrana ou filtro apropriado). Sementeira em meio de pré-enriquecimento. Enriquecimento, subcultura em meio de isolamento. Identificação*.

(1) As amostras das águas superficiais são analisadas e medidas após sofrerem uma tamisação com rede metálica, a fim de eliminar os resíduos flutuantes, tais como partículas de madeira e plástico.
 (2) Para VMR das águas de classe A1.
 (1) Para as águas de classes A2 e A3.
 (2) Para as águas de classe A3.
 (1) Para o VMR das águas de classes A1, A2 e A3.
 (1) Para o VMR das águas de classe A2 e para as águas de classe A3.
 (1) Para o VMR das águas de classes A2 e A3.
 (2) Mistura de seis substâncias padrão a tomar em consideração e que têm a mesma concentração: fluoranteno, benzo [3,4] fluoranteno; benzo [1,1,12] fluoranteno; benzo [3,4] pireno; benzo [1,12] pireno; indeno [1,2,3-cd] pireno.
 (1) Mistura de três substâncias a tomar em consideração e tendo a mesma concentração: paratilo, hexafluorociclo-hexano, dielétrina.
 (1) Se a concentração das amostras em sólidos em suspensão for tão elevada que elas necessitem de um tratamento prévio especial, poderão excepcionalmente ser ultrapassados os valores de exactidão que constam do presente anexo, e estas amostras devem ser tratadas de modo a garantir que a maior parte das substâncias a determinar seja analisada.
 (1) No caso de não ser este o método utilizado, poderá não ser possível garantir o limite de detecção necessário para controlo dos valores constantes do anexo II.
 (2) Ausência em 500 ml (A1, VMR) e ausência em 1000 ml (A2, VMR).

Material recomendado para o recipiente:

- ⊗ — vidro;
- * — vidro esterilizado;
- — vidro ou alumínio;
- ⊗ — sem quantidades significativas de boro.

ANEXO IV

Frequência mínima de amostragem e de análise de águas superficiais (*)

	Classe de água								
	A1			A2			A3		
	Grupo de parâmetros								
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
Frequência mínima (número/ano)	4	2	1	8	4	2	12	6	3

(*) A determinação dos parâmetros correspondentes ao grupo G2 implica, em simultâneo, a determinação dos parâmetros contidos em G1 e, idênticamente para G3, implica G2 e G1.

ANEXO V

Classificação dos parâmetros de qualidade de águas superficiais em grupos (G1, G2 e G3) segundo a frequência de amostragem e de análise

G1	G2	G3
pH Cor Sólidos suspensos totais Temperatura Condutividade eléctrica Cheiro Nitratos Cloratos Fosfatos Carência química de oxigénio (CQO) Oxigénio dissolvido Carência bioquímica de oxigénio (CBO5) Azoto amoniacal Coliformes totais Coliformes fecais	Ferro dissolvido Manganés Cobre Zinco Sulfatos Substâncias tensoactivas Fenóis Azoto Kjeldahl Estreptococos fecais	Fluoretos Boro Arsénio Cádmio Crómio total Chumbo Selénio Mercúrio Bário Cianetos Hidrocarbonetos dissolvidos e emulsionados Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares Pesticidas totais Substâncias extraíveis com clorofórmio Salmonelas

Anexo B: Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto

Parte II – Parâmetros químicos

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Acrilamida	0,10	µg/l	V. n. 1.
Antimônio	5,0	µg/l <i>Sb</i>	
Arsénio	10	µg/l <i>As</i>	
Benzeno	1,0	µg/l	
Benzo(a)pireno	0,010	µg/l	
Boro	1,0	mg/l <i>B</i>	
Bromatos	25 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2008). 10 (após 25 de Dezembro de 2008).	µg/l <i>BrO₃</i>	V. n. 2.
Cádmio	5,0	µg/l <i>Cd</i>	
Crómio	50	µg/l <i>Cr</i>	V. n. 3.
Cobre	2,0	mg/l <i>Cu</i>	V. n. 3.
Cianetos	50	µg/l <i>Cn</i>	
1,2 dicloroetano	3,0	µg/l	
Epicloridrina	0,10	µg/l	V. n. 1.
Fluoretos	1,5	mg/l <i>F</i>	
Chumbo	25 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2013). 10 (após 25 de Dezembro de 2013).	µg/l <i>Pb</i>	V. n. 3 e 4.
Mercurio	1	µg/l <i>Hg</i>	
Níquel	20	µg/l <i>Ni</i>	V. n. 3.
Nitratos	50	mg/l <i>NO₃</i>	V. n. 5.
Nitritos	0,5	mg/l <i>NO₂</i>	V. n. 5.
Pesticida individual	0,10	µg/l	V. n. 6 e 7.
Pesticidas — total	0,50	µg/l	V. n. 6 e 8.
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP)	0,10	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados. V. n. 9.
Selénio	10	µg/l <i>Se</i>	
Tetracloroetano e tricloroetano	10	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados.
Trihalometanos — total (THM)	150 (de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2008). 100 (após 25 de Dezembro de 2008).	µg/l	Soma das concentrações dos compostos especificados. V. n. 10.
Cloreto de vinilo	0,50	µg/l	V. n. 1.

Parte III – Parâmetros indicadores

Parâmetro	Valor paramétrico	Unidade	Observações
Alumínio	200	µg/l <i>Al</i>	
Amônio	0,50	mg/l <i>NH₄</i>	
Cálcio	-	mg/l <i>Ca</i>	V. n. 1, 2 e 5.
Cloretos	250	mg/l <i>Cl</i>	V. n. 1.
<i>Clostridium perfringens</i> (incluindo esporos)	0	N/100 ml	V. n. 6.
Cor	20	mg/l <i>PtCo</i>	
Condutividade	2 500	µS/cm a 20°C	V. n. 1.
Dureza total	-	mg/l <i>CaCO₃</i>	V. n. 1, 4 e 5.
<i>pH</i>	≥ 6,5 e ≤ 9	unidades de <i>pH</i>	V. n. 1 e 7.
Ferro	200	µg/l <i>Fe</i>	
Magnésio	-	mg/l <i>Mg</i>	V. n. 1, 3 e 5.
Manganês	50	µg/l <i>Mn</i>	
Microcistinas — LR total	1	µg/l	V. n. 16.
Cheiro, a 25°C	3	Factor de diluição	
Oxidabilidade	5	mg/l <i>O₂</i>	V. n. 8.
Sulfatos	250	mg/l <i>SO₄</i>	V. n. 1.
Sódio	200	mg/l <i>Na</i>	
Sabor, a 25°C	3	Factor de diluição	
Número de colónias	Sem alteração anormal	N/ml a 22°C	V. n. 17 e 18.
Número de colónias	Sem alteração anormal	N/ml a 37°C	V. n. 17 e 18.
Bactérias coliformes	0	N/100 ml	V. n. 9.
Carbono orgânico total (COT)	Sem alteração anormal	mg/l <i>C</i>	V. n. 10 e 18.
Turvação	4	UNT	V. n. 11.
α-total	0,5	Bq/l	V. n. 12 e 14.
β-total	1	Bq/l	V. n. 12 e 14.
Tritio	100	Bq/l	V. n. 12 e 14.
Dose indicativa total	0,10	mSv/ano	V. n. 13, 14 e 15.
Desinfecante residual	-	mg/l	V. n. 19.

Anexo C: Valores F da Distribuição de Fisher

VALORES F DA DISTRIBUIÇÃO DE FISHER

1 - α = 0.99

1 - α = P (F ≤ f_{α, v1, v2})

v₁ = graus de liberdade do numerador

v₂ = graus de liberdade do denominador

v ₂ \ v ₁	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	4052.185	4999.340	5403.534	5624.257	5753.955	5858.950	5928.334	5980.954	6022.397	6055.925	6083.399	6106.682	6125.774	6143.004	6156.974	6170.012	6181.188	6191.432	6200.746	6208.662
2	98.502	99.000	99.164	99.251	99.302	99.331	99.357	99.375	99.390	99.397	99.408	99.419	99.422	99.426	99.433	99.437	99.441	99.444	99.448	99.448
3	34.116	30.816	29.457	28.710	28.237	27.911	27.671	27.489	27.345	27.228	27.132	27.052	26.983	26.924	26.872	26.826	26.786	26.751	26.719	26.690
4	21.198	18.000	16.694	15.977	15.522	15.207	14.976	14.799	14.659	14.546	14.452	14.374	14.306	14.249	14.198	14.154	14.114	14.079	14.048	14.019
5	16.258	13.274	12.060	11.392	10.967	10.672	10.456	10.289	10.158	10.051	9.963	9.888	9.825	9.770	9.722	9.680	9.643	9.609	9.580	9.553
6	13.745	10.925	9.780	9.148	8.746	8.468	8.260	8.102	7.976	7.874	7.790	7.718	7.657	7.605	7.559	7.519	7.483	7.451	7.422	7.396
7	12.246	9.547	8.451	7.847	7.460	7.191	6.993	6.840	6.719	6.620	6.538	6.469	6.410	6.359	6.314	6.275	6.240	6.209	6.181	6.155
8	11.259	8.649	7.591	7.006	6.632	6.371	6.178	6.029	5.911	5.814	5.734	5.667	5.609	5.559	5.515	5.477	5.442	5.412	5.384	5.359
9	10.562	8.022	6.992	6.422	6.057	5.802	5.613	5.467	5.351	5.257	5.178	5.111	5.055	5.005	4.962	4.924	4.890	4.860	4.833	4.808
10	10.044	7.559	6.552	5.994	5.636	5.388	5.200	5.057	4.942	4.849	4.772	4.706	4.650	4.601	4.558	4.520	4.487	4.457	4.430	4.405
11	9.646	7.206	6.217	5.668	5.316	5.069	4.886	4.744	4.632	4.539	4.462	4.397	4.342	4.293	4.251	4.213	4.180	4.150	4.123	4.099
12	9.330	6.927	5.953	5.412	5.064	4.821	4.640	4.499	4.388	4.296	4.220	4.155	4.100	4.052	4.010	3.972	3.939	3.910	3.883	3.858
13	9.074	6.701	5.739	5.205	4.862	4.620	4.441	4.302	4.191	4.100	4.025	3.960	3.905	3.857	3.815	3.778	3.745	3.716	3.689	3.665
14	8.862	6.515	5.564	5.035	4.695	4.456	4.278	4.140	4.030	3.939	3.864	3.800	3.745	3.698	3.656	3.619	3.586	3.556	3.529	3.505
15	8.683	6.359	5.417	4.893	4.556	4.318	4.142	4.004	3.895	3.805	3.730	3.666	3.612	3.564	3.522	3.485	3.452	3.423	3.396	3.372
16	8.531	6.226	5.292	4.773	4.437	4.202	4.026	3.890	3.780	3.691	3.616	3.553	3.498	3.451	3.409	3.372	3.339	3.310	3.283	3.259
17	8.400	6.112	5.185	4.669	4.336	4.101	3.927	3.791	3.682	3.593	3.518	3.455	3.401	3.353	3.312	3.275	3.242	3.212	3.186	3.162
18	8.285	6.013	5.092	4.579	4.248	4.015	3.841	3.705	3.597	3.508	3.434	3.371	3.316	3.269	3.227	3.190	3.158	3.128	3.101	3.077
19	8.185	5.926	5.010	4.500	4.171	3.939	3.765	3.631	3.523	3.434	3.360	3.297	3.242	3.195	3.153	3.116	3.084	3.054	3.027	3.003
20	8.096	5.849	4.938	4.431	4.103	3.871	3.699	3.564	3.457	3.368	3.294	3.231	3.177	3.130	3.088	3.051	3.018	2.989	2.962	2.938
21	8.017	5.780	4.874	4.369	4.042	3.812	3.640	3.506	3.398	3.310	3.236	3.173	3.119	3.072	3.030	2.993	2.960	2.931	2.904	2.880
22	7.945	5.719	4.817	4.313	3.988	3.758	3.587	3.453	3.346	3.258	3.184	3.121	3.067	3.019	2.978	2.941	2.908	2.879	2.852	2.827
23	7.881	5.664	4.765	4.264	3.939	3.710	3.539	3.406	3.299	3.211	3.137	3.074	3.020	2.973	2.931	2.894	2.861	2.832	2.805	2.780
24	7.823	5.614	4.718	4.218	3.895	3.667	3.496	3.363	3.256	3.168	3.094	3.032	2.977	2.930	2.889	2.852	2.819	2.789	2.762	2.738
25	7.770	5.568	4.675	4.177	3.855	3.627	3.457	3.324	3.217	3.129	3.056	2.993	2.939	2.892	2.850	2.813	2.780	2.751	2.724	2.699
26	7.721	5.526	4.637	4.140	3.818	3.591	3.421	3.288	3.182	3.094	3.021	2.958	2.904	2.857	2.815	2.778	2.745	2.715	2.688	2.664
27	7.677	5.488	4.601	4.106	3.785	3.558	3.388	3.256	3.149	3.062	2.988	2.926	2.872	2.824	2.783	2.746	2.713	2.683	2.656	2.632
28	7.636	5.453	4.568	4.074	3.754	3.528	3.358	3.226	3.120	3.032	2.959	2.896	2.842	2.795	2.753	2.716	2.683	2.653	2.626	2.602
29	7.598	5.420	4.538	4.045	3.725	3.499	3.330	3.198	3.092	3.005	2.931	2.868	2.814	2.767	2.726	2.689	2.656	2.626	2.599	2.574
30	7.562	5.390	4.510	4.018	3.699	3.473	3.305	3.173	3.067	2.979	2.906	2.843	2.789	2.742	2.700	2.663	2.630	2.600	2.573	2.549
40	7.314	5.178	4.313	3.828	3.514	3.291	3.124	2.993	2.888	2.801	2.727	2.665	2.611	2.563	2.522	2.484	2.451	2.421	2.394	2.369
50	7.171	5.057	4.199	3.720	3.408	3.186	3.020	2.890	2.785	2.698	2.625	2.563	2.508	2.461	2.419	2.382	2.348	2.318	2.290	2.265
60	7.077	4.977	4.126	3.649	3.339	3.119	2.953	2.823	2.718	2.632	2.559	2.496	2.442	2.394	2.352	2.315	2.281	2.251	2.223	2.198
70	7.011	4.922	4.074	3.600	3.291	3.071	2.906	2.777	2.672	2.585	2.512	2.450	2.395	2.348	2.306	2.268	2.234	2.204	2.176	2.150
80	6.963	4.881	4.036	3.563	3.255	3.036	2.871	2.742	2.637	2.551	2.478	2.415	2.361	2.313	2.271	2.233	2.199	2.169	2.141	2.115
90	6.925	4.849	4.007	3.535	3.228	3.009	2.845	2.715	2.611	2.524	2.451	2.389	2.334	2.286	2.244	2.206	2.172	2.142	2.114	2.088
100	6.895	4.824	3.984	3.513	3.206	2.988	2.823	2.694	2.590	2.503	2.430	2.368	2.313	2.265	2.223	2.185	2.151	2.120	2.092	2.067
200	6.763	4.713	3.881	3.414	3.110	2.893	2.730	2.601	2.497	2.411	2.338	2.275	2.220	2.172	2.129	2.091	2.057	2.026	1.997	1.971
500	6.686	4.648	3.821	3.357	3.054	2.838	2.675	2.547	2.443	2.356	2.283	2.220	2.166	2.117	2.075	2.036	2.002	1.970	1.942	1.915
1000	6.660	4.626	3.801	3.338	3.036	2.820	2.657	2.529	2.425	2.339	2.265	2.203	2.148	2.099	2.056	2.018	1.983	1.952	1.923	1.897

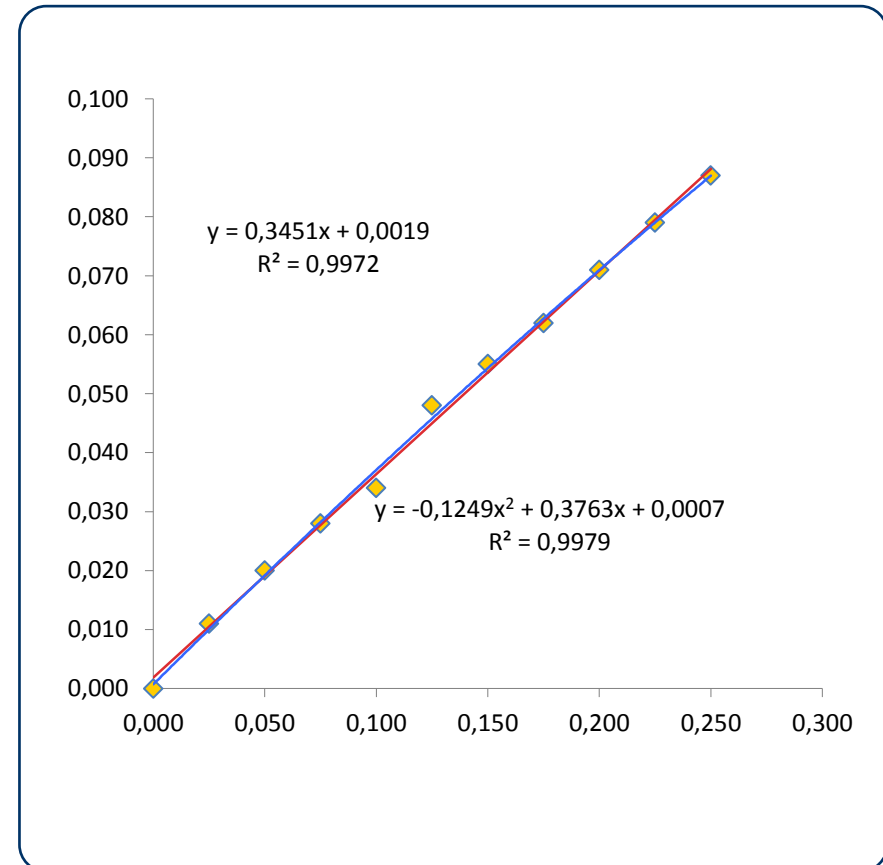
Anexo D: Curvas de Calibração

Padrão (mg.L ⁻¹)	Absorvância (nm)									
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,025	0,011	0,009	0,010	0,010	0,011	0,009	0,009	0,012	0,013	0,011
0,050	0,022	0,020	0,020	0,022	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
0,075	0,028	0,030	0,029	0,028	0,026	0,029	0,030	0,029	0,027	0,028
0,100	0,038	0,036	0,040	0,037	0,034	0,038	0,038	0,037	0,035	0,034
0,125	0,048	0,048	0,048	0,044	0,044	0,049	0,048	0,048	0,045	0,048
0,150	0,054	0,057	0,056	0,054	0,049	0,055	0,054	0,053	0,052	0,055
0,175	0,064	0,063	0,064	0,058	0,058	0,065	0,063	0,063	0,059	0,062
0,200	0,069	0,069	0,070	0,066	0,064	0,071	0,070	0,069	0,069	0,071
0,225	0,081	0,078	0,081	0,075	0,072	0,078	0,077	0,080	0,075	0,079
0,250	0,089	0,088	0,088	0,084	0,080	0,089	0,087	0,088	0,085	0,087

Equação da Recta	$Y=0,347(\pm 0,015)x + 0,003(\pm 0,002)$	$Y=0,346(\pm 0,018)x + 0,002(\pm 0,003)$	$Y=0,349(\pm 0,015)x + 0,002(\pm 0,002)$	$Y=0,323(\pm 0,017)x + 0,003(\pm 0,002)$	$Y=0,311(\pm 0,013)x + 0,003(\pm 0,002)$	$Y=0,351(\pm 0,017)x + 0,002(\pm 0,002)$	$Y=0,342(\pm 0,016)x + 0,002(\pm 0,002)$	$Y=0,343(\pm 0,013)x + 0,003(\pm 0,002)$	$Y=0,328(\pm 0,012)x + 0,003(\pm 0,002)$	$Y=0,345(\pm 0,014)x + 0,002(\pm 0,002)$
Coefficiente de Correlação (R)	0,998	0,998	0,998	0,998	0,999	0,998	0,998	0,999	0,999	0,999
Coefficiente de Determinação (R ²)	0,997	0,995	0,997	0,995	0,997	0,996	0,996	0,998	0,998	0,997
S _{xy}	0,002	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002
Limite de Detecção (µg.L ⁻¹)	16,120	19,540	16,620	19,840	15,750	17,980	18,010	14,510	14,460	14,290
Limite de Quantificação (µg.L ⁻¹)	48,860	59,190	50,360	60,120	47,770	54,480	54,580	43,970	43,800	45,710

Anexo E: Cálculo da Diferença de Variâncias

Concentração (mg·L ⁻¹)	Y _{medido}	Y _{calculado1}	(Y _{medido} - Y _{calculado1}) ²	Y _{calculado2}	(Y _{medido} - Y _{calculado2}) ²
0,00E+00	0,00E+00	1,90E-03	3,61E-06	7,00E-04	4,90E-07
2,50E-02	1,10E-02	1,05E-02	2,23E-07	1,00E-02	9,42E-07
5,00E-02	2,00E-02	1,92E-02	7,14E-07	1,92E-02	6,36E-07
7,50E-02	2,80E-02	2,78E-02	4,73E-08	2,82E-02	4,84E-08
1,00E-01	3,40E-02	3,64E-02	5,81E-06	3,71E-02	9,49E-06
1,25E-01	4,80E-02	4,50E-02	8,78E-06	4,58E-02	4,90E-06
1,50E-01	5,50E-02	5,37E-02	1,78E-06	5,43E-02	4,43E-07
1,75E-01	6,20E-02	6,23E-02	8,56E-08	6,27E-02	5,29E-07
2,00E-01	7,10E-02	7,09E-02	6,40E-09	7,10E-02	1,30E-09
2,25E-01	7,90E-02	7,95E-02	3,00E-07	7,90E-02	1,97E-09
2,50E-01	8,70E-02	8,82E-02	1,38E-06	8,70E-02	9,77E-10
Soma			2,27E-05		1,75E-05



Anexo F: Valores Críticos de Grubbs

Valores Críticos de G ($P=0,05$)	
Tamanho da Amostra	Valor Critico
3	1.155
4	1.481
5	1.715
6	1.887
7	2.020
8	2.126
9	2.215
10	2.290