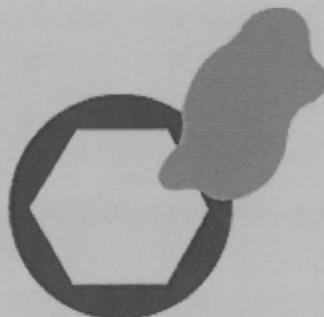




Universidade do Porto

**FEUP** Faculdade de Engenharia



**AlQuímica**

Tecnologia Química e Ambiental

10

ANOS  
AlQuímica  
1992 - 2002

Realizado por Ana Maria Fernandes Pereira Polidoro

sob orientação do

Professor Doutor João Marques da Silva Santos

Relatório de Estágio

# Remoção de Compostos Prioritários em Efluentes

Ana Maria Fernandes Pereira Polidoro

Maio de 2003

66(047.3)  
LEQ 2002/POLa





Universidade do Porto  
**FEUP** Faculdade de  
Engenharia



**AlQuímica**  
Tecnologia Química e Ambiental



Realizado por Ana Maria Fernandes Pereira Polidoro

sob orientação do

Professor Ana Maria da Silva Santos

Relatório de Estágio  
Remoção de Compostos  
Prioritários em Efluentes

Ana Maria Fernandes Pereira Polidoro

Maio de 2003



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Social Europeu



Mais Educação

66 (647.3) / LE Q 2002 / POL a

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca	
Nº	88389
CDU	
Data	/ / 20

## Agradecimentos

Ho conclui este estágio, gostaria de agradecer à Dra. Lúcia Santos pelo apoio e disponibilidade para realização deste trabalho nas melhores condições possíveis.

A Eng.ª Maria João Archer pela oportunidade concedida e cooperação demonstrada.

À Eng.ª José Luís Morais e ao técnico Hugo Roldão com quem tive a prazer de aprender e conviver, não posso deixar de manifestar a minha profunda gratidão em toda a estância no decorrer deste projecto.

A Eng.ª Cláudia Estêvão e ao Eng.ª António Estêvão pelo apoio e encorajamento demonstrado no decorrer de todo o estágio.

## Estágio PRODEP III 2002/2003

A todos os colegas de laboratório, com quem tive o prazer de trabalhar, gostaria de apresentar o meu sincero obrigado pela amizade e apoio ao longo de todo este estágio.

Realizado por Ana Maria Fernandes Pereira Polidoro  
sob orientação da  
Doutora Lúcia Maria da Silveira Santos  
e  
Engenheira Maria João Archer

## **Agradecimentos**

Ao concluir este Estágio, gostaria de agradecer à Dra. Lúcia Santos pelo apoio e disponibilidade para realização deste trabalho nas melhores condições possíveis.

À Eng.ª Maria João Archer pela oportunidade concedida e cooperação demonstrada.

Ao Eng.º José Luís Moreira e ao Mestre Nuno Ratola com quem tive o prazer de aprender e conviver, não posso deixar de manifestar a minha profunda gratidão em toda a assistência no decorrer deste projecto.

À Eng.ª Cláudia Heitor pela relação de amizade, ajuda e aperfeiçoamento demonstrado no decorrer de todo o trabalho experimental.

A todos os colegas de laboratório, com quem tive o imenso prazer de trabalhar, gostaria de apresentar o meu sincero obrigado pela amizade e apoio ao longo de todo este estágio.

## Resumo

Este estágio teve como principal objectivo verificar se o sistema de lamas activadas para tratamento biológico, anteriormente implementado para degradar pesticidas como o lindano e o heptacloro, seria capaz através de uma cultura pura de microrganismos, de degradar o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP).

O processo de biorremediação é uma alternativa atractiva no tratamento de solos e efluentes líquidos contaminados e é alcançado fazendo uso do potencial metabólico natural de microrganismos para degradar contaminantes orgânicos, como é o caso dos clorofenóis.

Os clorofenóis são usados como conservantes na indústria da madeira e no tratamento da mesma. Deste modo será de esperar que se desenvolvam estirpes de microrganismos capazes de degradar os mesmos.

Os clorofenóis são considerados poluentes prioritários tanto pela a Agência de Protecção Ambiental dos EUA (US-EPA), como pela União Europeia (UE), devido à sua elevada toxicidade, propriedades mutagénicas e carcinogénicas. Surge por isso a necessidade de avaliar a capacidade de biodegradação do 2,4-DCP, presente em efluentes em baixas concentrações (abaixo de 1 mg/l) e na presença de outras fontes competitivas de carbono, de modo a compatibilizar as descargas de águas residuais com os requisitos da legislação em vigor.

Realizou-se um ensaio num reactor biológico aeróbio contínuo, com um volume de 3 litros (tempo de retenção hidráulico de 4 horas) usando como inóculo uma cultura pura de *Ralstonia basilensis*. A percentagem de degradação foi obtida pela análise do 2,4-DCP por SPME - GC/ECD sendo a incerteza global máxima do método analítico de 49,1% (a 5,4 µg/l). Foi também analisada a CQO e a densidade óptica a 610 nm tendo-se obtido uma remoção média de 2,4-DCP superior a 98%, para uma alimentação de 1 mg/l e de 69,7%, para uma alimentação de 500 µg/l, sendo a remoção média de CQO no período de ensaio de 62,4%.

O sistema implementado de tratamento biológico original tinha acoplado uma unidade de tratamento terciário, a qual não foi associada ao tratamento efectuado. Para trabalho futuro considera-se indispensável uma unidade de refinação (adsorção), e também uma confirmação dos resultados obtidos.

**Abreviaturas**

Abreviatura	Designação
A	Ampere
CP	Clorofenol
CP's	Clorofenóis
CQO	Carência química em oxigénio
D	Diclorofenoxiacético
DCE	Detector de captura electrónica
DCP	Diclorofenol
DO	Densidade óptica
ELL	Extracção líquido-líquido
EPA-US	Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos
eq.	Equação
g	Gramma
GAC	Carvão activado granular
GC	Cromatografia gasosa
h	Hora
l	Litro
LC	Cromatografia líquida
m	Metro
min	Minuto
PCP	Pentaclorofenol
ppb	Partes por bilião
ppm	Partes por milhão
TCP	Triclorofenol
SPME	Micro-extracção em fase sólida
SPE	Extracção em fase sólida
UE	União Europeia
UV/VIS	Radiação ultra-violeta/ visível
°C	Grau Celsius

## **Breve referência à empresa**

### **ALQUÍMICA, Química Industrial Lda.**

(perfil da empresa referente a Abril de 2003)

A ALQUÍMICA, já com 10 anos de experiência, é uma empresa que se dedica à prestação de serviços especializados nas áreas do Ambiente e da Qualidade.

A ALQUÍMICA é a representante exclusiva no nosso país da empresa italiana CTIDA. Esta é especializada no fabrico de instalações compactas e automatizadas para o tratamento de pequenos e médios caudais de águas residuais que se encontrem bastante contaminadas. A CTIDA possui um grande número de unidades que se encontram em Itália e outros países europeus, já tendo atingido a qualidade dos modelos que fabrica, ao estar certificada segundo a norma ISO 9001.

A CTIDA está integrada no grupo de empresas da ENEL (similar à EDP em Portugal) formando a Enel.Hydro. Esta é líder do seu mercado em Itália, tendo capacidade para cobrir o completo ciclo hídrico em todo o país, desde a captação, e de seguida à aducção, potabilização, distribuição, finalizando no tratamento das águas residuais.

A ALQUÍMICA está especialmente vocacionada para as áreas de Qualidade e Ambiente, conforme anteriormente referido, em que os seus serviços podem estar divididos em três áreas de actividade: Análises e Estudos Laboratoriais, Consultadoria e Engenharia.

**Análises e Estudos Laboratoriais:**

- Análises a águas potáveis, recreativas, para rega, de processo e residuais
- Análises a produtos químicos, cosméticos e de higiene e limpeza
- Análises a efluentes e resíduos industriais
- outras análises e estudos laboratoriais mediante consulta e avaliação prévias

**Consultadoria:**

- Estudos de diagnóstico e auditorias ambientais. Estudos de impacte ambiental
- Consultas sobre legislação ambiental e de higiene e segurança industrial
- Gestão e controlo das estações de águas residuais
- Gestão de resíduos industriais produzidos nas empresas, e elaboração e manutenção do inventário obrigatório e do respectivo mapa anual de registo
- Elaboração de fichas técnicas de segurança e de produtos químicos
- Estudos de avaliação comparativa da qualidade de produtos de grande consumo
- Controlo de efluentes gasosos
- Estudos de ruído

**Engenharia:**

- Projecto, fornecimento e montagem de estações de tratamento de águas residuais industriais
- Projecto, fornecimento e montagem de estações e tratamento de efluentes gasosos
- Projecto, fornecimento e montagem de estações de tratamento de águas primárias
- Projecto, fornecimento e montagem de estações de tratamento de águas residuais domésticas
- Projecto, fornecimento e montagem de instalações industriais de processo químico, mediante consulta e avaliação prévias

1.7.1	Temperatura, tempo de detenção	17
1.7.1.2	Alicho de vácuo, alterações do pH	19
1.7.1.7	Agitação	20

**CAPÍTULO 2. Procedimento Experimental**

2.1	Materiais	21
2.1.1	Reagentes	21
2.1.2	Indúcio	21
2.2	Instalação Experimental	22
2.2.1	Sítio de instalação	23
2.2.2	Arranque e funcionamento da instalação experimental	24
2.3	Análise e controlo	25

**ÍNDICE****CAPÍTULO 1. Introdução Teórica**

1.1 Aplicações, fontes de contaminação, efeitos na saúde e ambientais .....	1
1.2 Limites legais .....	2
1.3 Propriedades físicas dos clorofenóis .....	2
1.4 Tratamento de efluentes contaminados com clorofenóis .....	4
1.4.1 Biorremediação .....	4
1.4.2 Métodos físico-químicos: Adsorção .....	5
1.5 Clorofenol em estudo: 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) .....	7
1.6 Método cromatográfico .....	8
1.6.1 Mecanismo da separação cromatográfica (cromatografia gasosa) .....	8
1.6.2 Instrumentação básica de um cromatógrafo (em fase gasosa) .....	9
1.6.2.1 Gás de arraste e controlador de pressão .....	10
1.6.2.2 Sistema Injector da amostra .....	10
1.6.2.3 Colunas .....	11
1.6.2.4 Forno .....	12
1.6.2.5 Detectores .....	13
1.6.3 Análise qualitativa .....	14
1.6.4 Análise quantitativa .....	14
1.7 Micro-extracção em fase sólida (SPME) .....	15
1.7.1 Parâmetros que influenciam a eficiência .....	18
1.7.1.1 Tipo de fibra .....	18
1.7.1.2 Modo de extracção .....	18
1.7.1.3 Temperatura de adsorção .....	19
1.7.1.4 Tempo de adsorção .....	19
1.7.1.5 Temperatura/ tempo de dessorção .....	19
1.7.1.6 Adição de sal/ alteração do pH .....	19
1.7.1.7 Agitação .....	20

**CAPÍTULO 2. Procedimento Experimental**

2.1 Materiais .....	21
2.1.1 Reagentes .....	21
2.1.2 Inóculo .....	21
2.2 Instalação Experimental .....	22
2.2.1 Efluente sintético .....	23
2.2.2 Arranque e funcionamento da instalação experimental .....	24
2.3 Análise e controlo .....	26

2.3.1 Densidade óptica (DO).....	27
2.3.2 Carência química em oxigénio (CQO) .....	28
2.3.2.1 Princípio do método .....	28
2.3.2.2 Condições experimentais .....	28
2.3.3 Extração e pré-concentração por SPME .....	32
2.3.4 Análise cromatográfica com detector de captura de electrões (GC-DCE) .....	33

### **CAPÍTULO 3. Resultados e discussão**

3.1 Validação do procedimento analítico.....	35
3.1.1 Estudo da linearidade de resposta do detector de GC-DCE.....	35
3.1.2 Incerteza global associada aos resultados.....	37
3.2 Controlo de parâmetros relacionados com adições do poluente .....	38
3.2.1 Crescimento da biomassa.....	38
3.2.2 Carência química de oxigénio (CQO) .....	40
3.2.3 Degradação do 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP) .....	42

### **CAPÍTULO 4. Conclusões..... 44**

### **Bibliografia..... 45**

#### **Anexos:**

<b>Anexo A – Recta de calibração.....</b>	<b>A1</b>
A.1 Preparação das soluções mãe e padrões .....	A1
A.2 Resultados obtidos na quantificação dos padrões de 2,4-DCP .....	A2
<b>Anexo B – Incerteza global do método .....</b>	<b>A6</b>
B.1 Incerteza relativa associada à concentração obtida pela recta de calibração	A6
B.2 Incerteza relativa associada à preparação dos padrões.....	A7
B.3 Incerteza relativa associada à precisão do método .....	A8
B.4 Incerteza relativa associada à exactidão do método .....	A9
B.5 Incerteza global do método .....	A10
<b>Anexo C – Densidade óptica.....</b>	<b>A12</b>
<b>Anexo D – Carência química em oxigénio .....</b>	<b>A14</b>
<b>Anexo E – Remoção do 2,4-DCP .....</b>	<b>A16</b>
<b>Anexo F – Ensaio de evaporação .....</b>	<b>A18</b>

## **Capítulo 1. Introdução Teórica**

Nas últimas décadas verificou-se um aumento inadvertido na produção e utilização de produtos químicos, os quais deram origem a problemas de poluição ambiental de modo generalizado. O risco de exposição ambiental aos produtos químicos tornou-se um dos problemas de maior preocupação para investigadores. Neste seguimento, a protecção ambiental tem adquirido grande importância na sociedade contemporânea, que cada vez mais tem exigido mecanismos com rapidez e eficiência, para um melhor controlo da contaminação ambiental. Estudos sobre possíveis riscos da exposição ambiental a agentes naturais ou sintéticos, têm como principal motivo, factores como a expansão progressiva do sistema produtivo, com carácter geral, as indústrias químicas. Estas colocam anualmente no mercado cerca de mil novos produtos, ignorando por sua vez a toxicidade desses mesmos produtos. Uma Comissão Europeia sobre riscos ambientais cita a existência de cerca de 100.000 produtos químicos que estão disponíveis no mercado, dos quais, cerca de 20.000 substâncias podem ser perigosas e apenas 2.500 têm uma classificação detalhada e de confiança [7]. Assim, dentro deste contexto é necessário encontrar novas metodologias de forma a ter uma melhor determinação e quantificação dos diversos tipos de poluentes, com selectividade, rapidez e sensibilidade.

### **1.1 Aplicações, fontes de contaminação, efeitos na saúde e ambientais**

No meio ambiente são actualmente descarregados em larga escala poluentes orgânicos, sendo a maioria desses mesmos poluentes de estrutura fenólica. Os fenóis e seus derivados, como clorofenóis (CP's) e compostos aromáticos relacionados, são conhecidos devido a possuírem uma elevada toxicidade e por serem compostos comuns em efluentes industriais, cuja proveniência é diversa. Os clorofenóis podem estar presentes nas actividades de produção de: herbicidas, insecticidas, fungicidas, retardadores de chama, plásticos, corantes, tintas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, desinfectantes, refinaria de óleos e principalmente no fabrico de papel e celulose [1, 39].

Os clorofenóis podem também ser encontrados em solos contaminados, águas residuais e águas de consumo. A água desinfectada com cloro é uma das fontes directas de contaminação, devido à facilidade que possui de reagir com substratos orgânicos [18]. Outra fonte de contaminação das águas resulta da presença de clorofenóis em lixiviados de aterros sanitários e lixeiras. Se estes não forem devidamente tratados poderão assim afectar os solos e os respectivos cursos de água.

Devido à sua toxicidade, já referida anteriormente, propriedades lipofílicas e recalcitrantes, os clorofenóis têm tendência a acumular-se nos sedimentos bem como nos organismos aquáticos, vítimas directas da contaminação das águas, permanecendo assim ao longo da cadeia alimentar [18, 40].

A persistência destes compostos em ambientes aquáticos e terrestres pode ser prejudicial para o meio ambiente e para a saúde pública. Os efeitos sanitários da presença de quantidades elevadas de CP's em água para consumo humano são particularmente graves para o Homem. Estes compostos aumentam a probabilidade do aparecimento de cancro, abortos espontâneos e diversas malformações congénitas graves [18].

Um uso que não seja o mais adequado, derrames acidentais ou deposição inadequada de CP's resulta numa dramática poluição intensiva.

### 1.2 Limites legais

Os clorofenóis possuem propriedades carcinogénicas e mutagénicas sobre os seres vivos [17], sendo considerados poluentes perigosos devido à sua dualidade, toxicidade e persistência no meio ambiente. Por estes motivos, estes compostos estão listados na União Europeia (UE) como substâncias perigosas e na Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-US) como poluentes prioritários [38]. Recente legislação ambiental restringe o uso de clorofenóis. Por exemplo, a UE estabeleceu um limite máximo de 100 µg/l. A EPA-US fixou um limite de 40 µg/l. Em Portugal, o objectivo de qualidade mínima para a descarga de águas residuais para o 2,4-DCP é de 20 µg/l [9].

### 1.3 Propriedades físicas dos clorofenóis

Nas Tabelas 1 e 2 apresentam-se, respectivamente, importantes características e propriedades físicas dos clorofenóis. Todos os CP's possuem um odor característico forte e concedem um gosto fortemente desagradável à água. São sólidos à temperatura ambiente, excepto o 2-Clorofenol (2-CP), ligeiramente solúveis em água mas altamente solúveis em álcoois [8, 23, 37].

Tabela 1.1 – Características dos clorofenóis [8, 23].

Composto	Fórmula	MM (g/mol)	p.f. (°C)	p.e. (°C)	pKa em água a 25°C
2-CP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClO	128,56	8,7	174,5	8,52
3-CP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClO	128,56	32,8	216	8,97
4-CP	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClO	128,56	42,8	217	9,37
2,3-DCP	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	163,00	58	206	7,71
2,4-DCP	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	163,00	45	210	7,90
2,5-DCP	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	163,00	59	210	7,51
2,6-DCP	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	163,00	66	220	6,78
3,4-DCP	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	163,00	65	253	8,62
3,5-DCP	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O	163,00	68	233	8,25
2,3,5-TCP	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O	197,45	62	248-249	-
2,4,5-TCP	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O	197,45	68	245-246	6,72
2,4,6-TCP	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O	197,45	68	246	5,99
2,3,4-TCP	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O	197,45	83,5	sublima	6,97
3,4,5-TCP	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O	197,45	101	275	7,55
2,3,6-TCP	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> O	197,45	101	272	5,80
2,3,5,6-TeCP	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> O	231,89	115	sublima	5,03
2,3,4,6-TeCP	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> O	231,89	69-70	164 (3 kPa)	5,22
2,3,4,5-TeCP	C <sub>6</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> O	231,89	116-117	sublima	5,64
PCP	C <sub>6</sub> HCl <sub>5</sub> O	266,34	190	309-310	4,74

**Tabela 1.2** – Propriedades físicas dos clorofenóis com maior importância [23].

Propriedade	2-CP	4-CP	2,4-DCP	2,6-DCP	2,4,6-TCP	PCP
p.e. (°C) a						
0,1333 kPa	12	50	53	59,5	76,5	132
1,333 kPa	51	92	93	101	120,2	178
5,333 kPa	82	125	123	131,6	152,2	
13,33 kPa	106	150	146	154,6	177,8	
53,33 kPa	150	190	187	197,7	222,5	
Calor específico a 20°C, J.mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>	172	177	190			
Calor de formação a 50°C, kJ/mol	185	198,9				295
Viscosidade a 50°C, mPa.s	2	5	2,65			
Solubilidade em água a 20°C, g/l	28,5	27,1	4,5		0,8	0,014
Ponto de flash (closed cup), °C	121	84	113			

#### 1.4 Tratamento de efluentes contaminados com clorofenóis

Actualmente, existe um consenso geral no que diz respeito à necessidade de monitorizar continuamente o teor de CP's nos cursos de águas naturais e nos inúmeros efluentes industriais descarregados nestes recursos hídricos. Tendo em conta os factos que têm sido apresentados, é relevante o desenvolvimento de métodos que permitam a degradação dos CP's em compostos com menor toxicidade ou na sua mineralização completa.

##### 1.4.1 Biorremediação

O processo de biorremediação é uma alternativa atractiva no tratamento de solos e efluentes líquidos contaminados [21].

Através do potencial metabólico natural de microrganismos, a biorremediação é conseguida para degradar os contaminantes, quer sejam inorgânicos ou orgânicos (o caso dos clorofenóis) [14, 30]. A actividade metabólica para poder ocorrer necessita da adição de

oxigénio ou de um aceitador final de electrões alternativo, de nutrientes limitantes como é o azoto e o fósforo e de uma optimização das condições de temperatura e humidade [14].

A maioria dos contaminantes orgânicos são biodegradáveis para determinadas condições, a sua optimização deve ser efectuada para se atingir velocidades de degradação máximas [14, 30]. Os poluentes orgânicos recalcitrantes (produtos halogenados e pesticidas) necessitam da adição de co-substratos, de forma a estimular o crescimento microrganismos que possuem a capacidade de degradar, de tratamentos de modo a aumentar a biodisponibilidade do contaminante e de degradação anaeróbia e aeróbia [30].

O tipo de microrganismos a utilizar está directamente relacionado com o tipo de poluentes a eliminar [32]. A capacidade para a degradação de compostos aromáticos clorados encontra-se difundida entre bactérias e fungos [14, 20], mas ocorre frequentemente entre espécies do género *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Burkholderia* e *Mycobacterium* [37].

Uma grande parte de aplicações práticas e de estudos realizados incorporam sistemas de pré-tratamento anaeróbios com tratamento posterior aeróbio [3].

A biorremediação apresenta como principal vantagem ser uma técnica económica e com facilidade de implementação, relativamente a outros métodos de remediação não biológicos [6, 30]. A introdução de estirpes seleccionadas tolerando elevadas concentrações de clorofenóis poderá aumentar a eficiência do processo de tratamento biológico. Este poderá ser uma forma de combater os elevados custos verificados nos tratamentos físico-químicos. Porém, a biorremediação possui algumas desvantagens relacionadas com o desenvolvimento dos microrganismos que depende de muitos factores: nutrientes presentes no meio, concentração dos poluentes no meio, temperatura, pH, oxigénio, entre outros.

### 1.4.2 Métodos físico-químicos: Adsorção

Os métodos físico-químicos são uma alternativa à biorremediação e os seus principais objectivos passam por: modificar a estrutura do composto orgânico de modo a que este seja mais facilmente biodegradado, alterar parcialmente a estrutura do composto de forma a diminuir a sua toxicidade, e se possível oxidar completamente o composto a água e dióxido de carbono (respectivamente,  $H_2O$  e  $CO_2$ ).

A adsorção é um processo físico-químico que pode ser utilizado na remoção de clorofenóis em soluções aquosas. Um adsorvente usualmente utilizado é o carvão activado. A eficiência de adsorção de pesticidas organoclorados ao carvão activado granular (GAC) em minicolumnas, num estudo de *Brás et al* obteve resultados muito satisfatórios desde 78% para o Heptacloro, até 100% para outros pesticidas organoclorados. Conclui-se assim que é possível obter elevadíssimas eficiências na remoção de compostos prioritários, apesar de apresentarem

alguns inconvenientes. O carvão activado é um material caro, e quanto maior a sua qualidade maior é o seu custo associado [4].

Os resíduos vegetais são outro adsorvente em estudo, para purificação dos efluentes, em causa a casca de pinheiro, espécie *Pinus pinaster*. Brás et al determinaram as propriedades físicas da casca de pinheiro, em comparação com o carvão activado, para partículas cujo diâmetro varia entre 125 e 300  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 1.3** – Características físicas da casca de pinheiro e carvão activado para granulometria de 125-300  $\mu\text{m}$  [4].

Adsorvente	$S_e$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$\rho_{\text{ap}}$ ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	$V_p$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
Casca de Pinheiro	0,687	1,3629	0,003227
Carvão Activado	8,60	1,4236	0,004012

Ao observar a tabela anterior, destaca-se a área específica,  $S_e$ , existindo uma diferença considerável entre os valores da casca de pinheiro e do carvão activado, tendo este último uma área superior que permitirá influenciar a adsorção de compostos [35]. A principal vantagem da casca de pinheiro é o custo deste material natural ser baixo, se efectuar uma comparação directa com o custo do carvão activado. Este adsorvente já foi testado com sucesso em alguns compostos organoclorados, revelando eficiências de remoção superiores a 80% [5].

Foram efectuados ensaios de adsorção "batch" com a granulometria acima referida de casca de pinheiro, onde se conseguiram obter remoções superiores a 80% para compostos como, o lindano e heptacloro. O tempo de equilíbrio foi de 24 horas para as experiências e seguiu o modelo da isotérmica de Freundlich [24].

As cinzas volantes têm sido consideradas um adsorvente eficaz, com capacidade para remover contaminantes orgânicos. Kao et al realizaram ensaios experimentais, em "batch" e em colunas de adsorção, para avaliar a eficiência de remoção do 2-CP e do 2,4-DCP em soluções aquosas, utilizando as cinzas resultantes da queima de carvão de centrais termoeléctricas como adsorvente. Antes da realização das experiências verificaram as propriedades das cinzas. As experiências em "batch" para ambos clorofenóis permitiram obter uma eficiência de remoção elevada, atingindo 90% de máximo ao fim de 1h de adsorção. O fenómeno de adsorção seguiu uma isotérmica de Freundlich, sendo este processo exotérmico. Outra conclusão retirada foi que quanto maior o tamanho das partículas maior seria a sua quantidade adsorvida. Em águas residuais na remoção do 2-CP, a eficiência é afectada pela presença do 2,4-DCP. Os ensaios realizados numa coluna de enchimento permitiram concluir

que os clorofenóis obtiveram uma remoção eficiente com as cinzas até a saturação da mesma ser obtida. As cinzas adsorveram, neste caso, preferencialmente o 2,4-DCP. O tempo de *breakthrough* do 2-CP foi sempre inferior ao do 2,4-DCP [19].

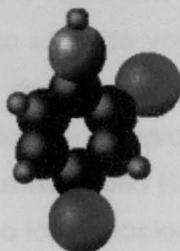
Porém, apesar da eficiência obtida, este método físico-químico obriga a que exista um tratamento posterior ao adsorvente utilizado, pois os clorofenóis ficam concentrados no mesmo e por vezes, atingem a saturação.

### 1.5 Clorofenol em estudo: 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP)

O 2,4-DCP é um fenol substituído que é produzido comercialmente e é utilizado globalmente na produção de produtos industriais e da agricultura. Como um intermediário na indústria química, o 2,4-DCP é utilizado como matéria-prima para a produção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético(2,4-D) – germicidas, esterilizantes do solo, etc. – e seus derivados, e em determinados compostos de metil que são utilizados como anti-sépticos e desinfectantes de sementes. É assim um intermediário extensamente usado nos pesticidas [34].

O principal grupo de risco é o grupo de trabalhadores industriais que estão envolvidos na produção e manipulação do 2,4-DCP e do 2,4-D, que têm uma exposição directa relativamente elevada [34].

O 2,4-DCP é incolor, sólido cristalino que possui a fórmula empírica  $C_6H_4Cl_2O$  (conforme se pode verificar na Figura 1 a sua estrutura) e o peso molecular relativo é de 163. O seu ponto de fusão é  $45^\circ C$  e de ebulição é  $210^\circ C$  a 760 mm Hg.



**Figura 1.1** – Estrutura tridimensional do 2,4-DCP com fórmula empírica  $C_6H_4Cl_2O$ .

Este composto é ligeiramente solúvel em água com pH neutro e dissolve-se prontamente em benzeno e etanol. O 2,4-DCP comporta-se como um ácido fraco e é muito solúvel em soluções alcalinas, uma vez que forma de imediato o sal alcalino correspondente. A sua constante de dissociação ( $pK_a$ ) é 7,90 a  $25^\circ C$  [10].

Embora presentemente o 2,4-DCP não possua aplicação directa, é utilizado como um importante intermediário químico, e é sintetizado a partir de soluções aquosas diluídas. A sua identificação como intermediário metabólico e de degradação de vários produtos comerciais por plantas, microrganismos e luz solar tem sido bem estabelecida [10].

## 1.6 Método Cromatográfico

A cromatografia constitui um método físico que permite separar, identificar e quantificar os componentes de uma mistura. A cromatografia é o melhor método aplicado na separação de componentes, em que os mesmos são distribuídos entre duas fases: uma estacionária (sólida ou líquida, aderente a um meio suporte sólido poroso) com grande área superficial, e outra móvel (amostra a analisar) que contacta a primeira, em que poderá existir relações de afinidade.

Existe uma classificação, mas de um modo mais simplista, em que apenas atende à natureza física da parte móvel: líquida (cromatografia líquida – LC), gasosa (cromatografia gasosa – GC) – caso em estudo – ou de fluido super crítico (na qual a fase móvel consiste num fluido que se encontra comprimido e a uma pressão superior à crítica, onde também pode ser designada por cromatografia de fluido, gasosa de alta pressão ou gasosa densa) [29].

### 1.6.1 Mecanismo da separação cromatográfica (cromatografia gasosa)

No momento da introdução da amostra, se esta não for já gasosa vai ser vaporizada e depois arrastada pelo gás arrastador através da coluna. Quando atinge a fase estacionária uma parte do vapor é absorvida estabelecendo um equilíbrio entre esta parte e uma outra que permaneceu na fase gasosa. A quantidade que não foi absorvida move-se com o gás de arraste, onde se vai estabelecer um equilíbrio com a fase estacionária. Em simultâneo o gás de arraste puro atinge o ponto da fase estacionária, onde o vapor que inicialmente foi absorvido e estava em equilíbrio faz com que uma parte deste entre novamente na fase gasosa de forma a obter um novo equilíbrio. Assim, o vapor em contínuo deixa a fase estacionária para entrar na fase gasosa, na retaguarda da zona de vapor, sendo removido da fase gasosa na frente da zona. O movimento descrito anteriormente, para dentro e para fora do gás de arraste, é o mecanismo fundamental da cromatografia gasosa que resulta num movimento compacto da amostra através da fase estacionária [12]. Na figura 4 encontra-se representado uma distribuição ideal da amostra entre a fase estacionária e o gás de arraste.

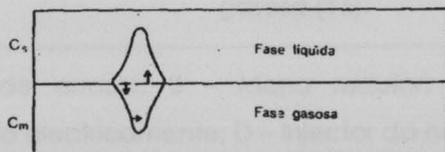


Figura 1.2 – Distribuição do soluto pelas duas fases [12].

A distribuição de vapor entre as duas fases é descrita pela lei de Henry, representada pela seguinte equação (1):

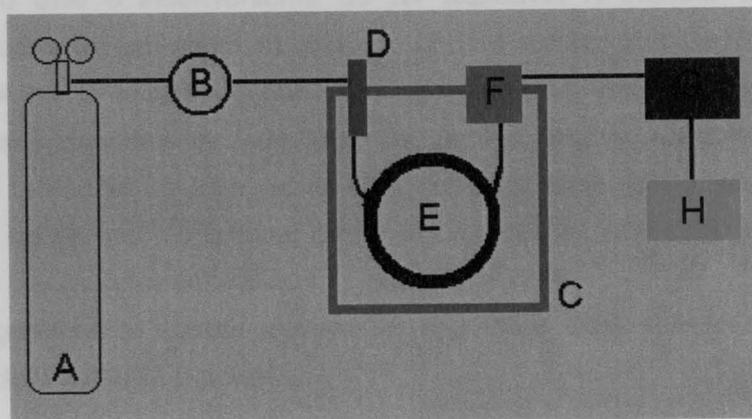
$$k = C_s / C_m \quad (1)$$

em que  $C_m$  é a concentração do componente na fase móvel (gasosa),  $k$  é a razão de partição, e  $C_s$  é a concentração do componente na fase estacionária (líquida).

A razão de partição é uma medida para a distribuição de vapor existente entre as duas fases e é o inverso do coeficiente de partição; o valor desta é determinado pela velocidade com que a zona de vapor passa através da fase estacionária. Sendo assim, os compostos que possuem preferência para serem absorvidos pela fase estacionária e por inferência se movem de uma forma mais lenta através da coluna, possuem uma razão de partição de valor superior do que os compostos que não são imediatamente absorvidos.

### 1.6.2 Instrumentação básica de um cromatógrafo (em fase gasosa)

Na Figura 1.3 encontra-se esquematizado um cromatógrafo de fase gasosa.



**Figura 1.3** – Diagrama esquemático das unidades básicas de um cromatógrafo de fase gasosa [15].

A – Cilindro do gás de arraste; B – Mano redutor; C – Fornalha termostaticada ou compartimento aquecido electricamente; D – Injetor da amostra; E – Coluna; F – Detector; G – Medidor de fluxo; H – Registador.

O gás transportador é geralmente fornecido por um cilindro (A), sendo a sua pressão regulada por um mano redutor (B). Mas, o ponto fulcral de um cromatógrafo é um tubo no qual se encontra a fase estacionária e através do qual é percorrido o gás de arraste. Este tubo que na parte dos casos é enrolado em hélice, para economia de espaço, é onde ocorre os

fenómenos que vão conduzir à separação dos componentes da mistura, sendo designado de coluna. A amostra a analisar é introduzida no fluxo do gás de arraste, através de uma micro-seringa, por um septo que conduz ao injector (D), sendo os componentes daquela separados na coluna (E). A velocidade e eficiência da separação, bem como a sua reprodutibilidade, são dependentes da temperatura, por este motivo as colunas encontram-se montadas num forno de precisão, de temperatura controlada ao décimo de grau, por forma a garantir assim uma boa reprodutibilidade das condições de trabalho (C). À saída das colunas, o gás efluente da amostra é analisado por um detector (F), respondendo aos compostos envolventes ao produzir um sinal de saída que é indicado por um registador (H). A resposta ou respostas do detector, são apresentadas pelo registador, em que constituem o cromatograma. A medição do caudal da fase móvel gasosa pode ser feita à saída da coluna por um fluxímetro (G) .

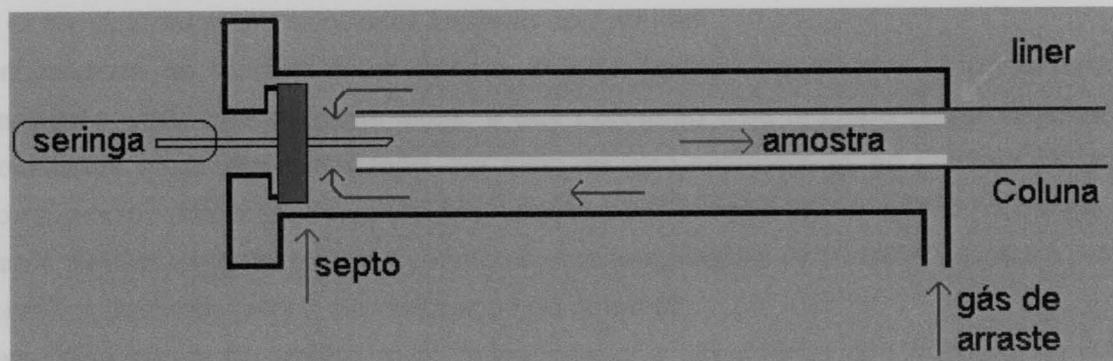
### 1.6.2.1 Gás de arraste e controlador de pressão

O gás de arraste deve ser inerte, de modo que, não reaja nem com a amostra nem com a fase estacionária. Os gases mais utilizados são o hélio, o azoto, anidrido carbónico e o hidrogénio, tendo este o inconveniente de ser explosivo. A escolha do gás de arraste apropriado é importante em todos os tipos de análise cromatográfica. Em alguns casos, a eficiência da coluna, o tempo de análise a alta ou baixa sensibilidade do detector são determinados pelas propriedades do gás de arraste. Alguns factores que devem ser considerados na selecção da fase móvel são: disponibilidade, custo, efeito da separação desejada, efeito no tempo de análise, efeito no sistema de detecção e a segurança da operação [16]. O gás de arraste utilizado foi o azoto a 99,999%.

Os caudais geralmente usados devem ser regulados com válvulas reductoras de alta pressão, ligadas directamente à garrafa.

### 1.6.2.2 Sistema injector da amostra

A amostra – gasosa, líquida ou em solução – é introduzida por uma seringa hipodérmica, através de um septo de borracha, directamente no topo da coluna ou numa câmara de injeção atravessada pelo gás de arraste e aquecida a uma temperatura superior à do ponto de ebulição do componente menos volátil. Deste modo a vaporização é instantânea, em que segue para a coluna o gás resultante (a analisar) e o gás de arraste. O rigor da sua concepção é importante para poder obter cromatogramas de alta qualidade, sendo fundamental que a amostra seja de uma forma rápida e completa evaporada.



**Figura 1.4** – Esquema ilustrativo do sistema injetor da amostra no cromatógrafo [15].

O modo e as condições sob as quais a amostra é introduzida na coluna têm uma pesada influência na qualidade dos resultados. A quantidade de substância injectada deve ser tão pequena quanto o possível (em atenção aos limites de detecção), e deve ser rapidamente introduzida para que a sua evaporação seja instantânea e completa. A temperatura no ponto de injeção deve ser controlável e constante. Uma possível avaria neste sistema pode provocar o aparecimento de picos assimétricos. Este fenómeno pode também ser causado por sujidade ou por uma injeção de grandes quantidades de amostra.

### 1.6.2.3 Colunas

As colunas que são normalmente utilizadas em cromatografia gasosa são tubos, em geral, metálicos (aço, cobre, alumínio) ou de vidro, agrupando-se em dois tipos fundamentais: com enchimento e tubulares abertas (capilares), a utilizada neste estudo.

#### Colunas capilares<sup>[29]</sup>

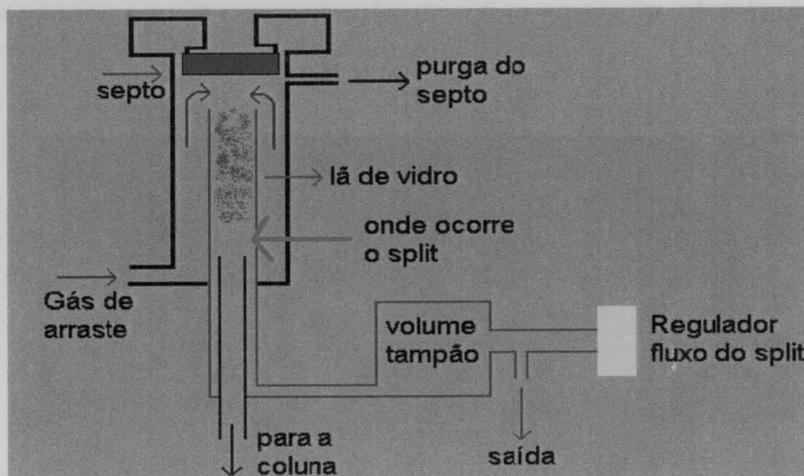
As colunas capilares possuem um diâmetro interno da ordem de 0.25-1 mm, e o seu comprimento varia entre os 5m até valores superiores de 300 m, possui uma forma helicoidal, em vidro, aço inoxidável, nylon ou cobre, não apresentando um suporte sólido como as colunas anteriores; a fase estacionária é constituída por um fino filme (ordem de  $\mu\text{m}$ ) que reveste a parede interior da coluna.

O uso de colunas capilares apresenta as seguintes vantagens relativamente ao uso de colunas convencionais: superior resolução, maior rapidez na análise de baixas temperaturas, ausência de efeitos laterais devidos ao suporte sólido, menor quantidade de fase estacionária (que por vezes, é de custo elevado) e menor perda de pressão.

Como desvantagens, as colunas capilares apresentam:

- necessidade de recorrer a um sistema divisório (*splitter*) da amostra, dada a pequena quantidade desta que a coluna exige, e que apresenta uma reduzida quantidade de fase estacionária. A amostra é injectada, por meio de uma microseringa, na corrente de gás de arraste, em seguida é dividida para que apenas uma fracção seja admitida na coluna. Este sistema divisório é habitualmente aquecido a uma temperatura de 50-100°C superior à máxima da coluna, podendo levar à decomposição da amostra;
- exactidão inferior na análise quantitativa devido a dificuldades que ocorrem no sistema divisório da amostra;
- a fase estacionária tem uma maior dificuldade de preparação;
- custo superior;
- menor tempo de duração e facilidade de obstrução;
- inferior temperatura máxima utilizável.

A figura seguinte ilustra um esquema adaptado de injeção por modo *split*.



**Figura 1.5** – Esquema adaptado de injeção através de um sistema *split* [15].

### 1.6.2.4 Forno

É necessário um controlo rigoroso da temperatura da coluna, quer se trate de mantê-la invariável, quer de obter temperaturas programadas. A temperatura da estufa da coluna deve ser controlada por um sistema sensível a variações de 0.01° e que mantenha um valor constante até 0.1° C.

### 1.6.2.5 Detectores

De um modo geral, a detecção em cromatografia gasosa é mais simples e também mais sensível do que, por exemplo, em cromatografia líquida. Existe uma maior facilidade de ionização de moléculas na fase gasosa e maior sensibilidade da medida de propriedades de iões do que moléculas neutras [29].

Embora seja conhecida uma ampla variedade de detectores de cromatografia gasosa, o detector utilizado foi o de captura electrónica, sendo o alvo de descrição.

#### Detector de Captura Electrónica (DCE)

Este detector, do tipo não destrutivo e dependente da massa, é formado por um emissor  $\beta$  radioactivo ( $^3\text{H}$  ou  $^{63}\text{Ni}$ ) o qual ioniza o gás de arraste produzindo electrões que geram uma corrente eléctrica (entre  $10^{-8}$  e  $10^{-9}$  A) por acção da diferença de potencial aplicada entre os eléctrodos. Quando um componente (soluto) da amostra inicial, com uma afinidade electrónica elevada, penetra na câmara, as suas moléculas capturam electrões no qual resulta uma redução de intensidade de corrente. Dando um sinal para o amplificador, pode-se relacionar a intensidade com a concentração do soluto no eluato, através do cromatograma que se obtém.

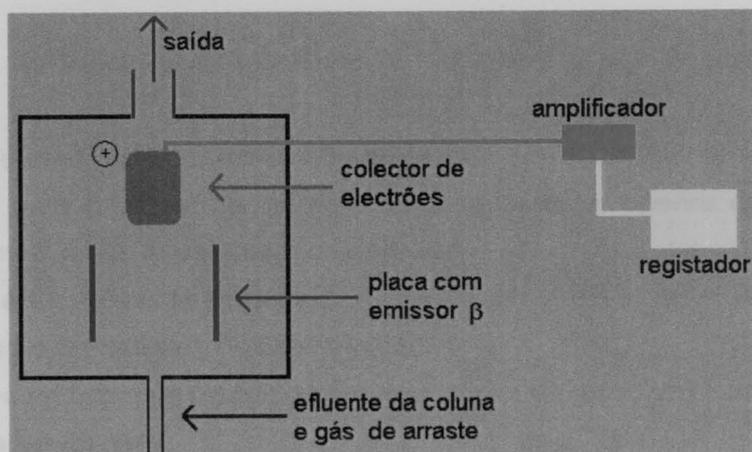


Figura 1.6 – Esquema do Detector de Captura Electrónica [15].

O DCE é utilizado para detectar e analisar compostos (ou seus derivados) que possuem uma elevada afinidade electrónica, nomeadamente, os compostos halogenados (pesticidas, insecticidas e halocarbonetos). Este detector apresenta uma elevada selectividade e alta sensibilidade, sendo o seu limite da ordem de  $10^{-5}$   $\mu\text{g/l}$ , na detecção de vestígios de pesticidas e drogas [25, 29].

Como principal desvantagem do DCE pode ser nomeado a forte dependência da resposta obtida relativamente às condições experimentais (fluxo gasoso, temperatura e parâmetros electrónicos).

### 1.6.3 Análise qualitativa

A identificação da amostra pode ser efectuada ao comparar o tempo ou volume de retenção de um padrão com o da amostra. Se um composto já conhecido possuir o mesmo tempo de retenção que um dado composto da amostra pode-se tratar da mesma substância.

Para efectuar uma análise qualitativa é necessário saber a natureza da amostra e efectuar testes preliminares (como densidade, solubilidade em água, etc.) [16].

### 1.6.4 Análise quantitativa

Ao analisar um determinado cromatograma pode-se determinar a composição quantitativa de todas ou de alguns dos elementos existentes na amostra. Para efectuar a determinação é necessário, segundo a referência bibliográfica [16]:

- não haver contaminações nem perdas da amostra;
- não existir adsorção ou decomposição dos compostos de interesse no cromatógrafo;
- certificação que a amostra irá produzir sinal para o detector, amplificador ou para o sistema de integração;
- a temperatura de injeção está optimizada, de forma a não ocorrer isomerização ou decomposição;
- determinação da área dos picos com muita precisão;
- o pico utilizado para a determinação de uma área deve ser apenas de uma substância, exacto, por este motivo não deve estar mal separado;
- a amostra deve estar sempre homogénea;
- introdução correcta da amostra, durante a injeção;
- a operação deve ser bastante precisa, sem alterar dados de resolução e retenção;
- pesquisa sobre possíveis erros.

Quando se obtém o cromatograma faz-se a integração dos sinais obtidos, o sinal emitido pelo detector vai estarem medida proporcional à quantidade de amostra injectada.

A determinação com exactidão e precisão da área dos picos de interesse pode ser feita pelo método de integração da área dos picos, pela altura do pico ou por outros tipos de integração. Estas medidas obtidas podem ser relacionadas com a concentração de uma substância da amostra pelos métodos de [16]:

- Normalização (onde as substâncias devem estar eluídas e a resposta do detector deve ser igual para todas; compara-se a área obtida no cromatograma com a percentagem de composição da mistura);

- Factor de Resposta (pode ser determinado ao injectar uma mistura de substâncias de que se pretende determinar os factores, de concentração conhecida, de seguida relaciona-se a percentagem desconhecida e a observada para cada composto);
- Padrão Interno (adiciona-se uma amostra de uma substância padrão à análise, e relaciona-se as duas áreas obtidas; a substância utilizada como padrão interno deve ser idealmente parecido com a substância a ser quantificada, ter tempos de concentração parecidos, ser inerte, não fazer parte da amostra e ficar separada das demais substâncias da amostra; é o melhor método para este tipo de análise, mas ao ser o mais trabalhoso e também o menos sensível a erros de injeção);
- Calibração Externa (compara-se a área da substância a ser quantificada com as áreas obtidas desta mesma substância em soluções padrões de concentrações conhecidas; obtém-se um cromatograma para cada uma das concentrações, que vão permitir calcular a concentração da substância na amostra).

### 1.7 Micro-extracção em fase sólida (SPME)

Existem diferentes técnicas de extracção para extrair compostos orgânicos de amostras aquosas, através da sua concentração na fase de extracção [2]. Na tabela seguinte, estão descritos os principais passos de preparação de uma amostra por diferentes técnicas de extracção.

**Tabela 1.4** – Preparação de uma amostra, utilizando diferentes técnicas: extracção líquido-líquido (LLE), extracção em fase sólida (SPE) e microextracção em fase sólida (SPME) [2].

LLE	SPE	SPME
<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕Adição de um solvente orgânico à amostra</li> <li>⊕Agitação num funil de decantação</li> <li>⊕Separação das fases orgânica e aquosa</li> <li>⊕Remoção da fase orgânica</li> <li>⊕Evaporação/concentração da fase orgânica</li> <li>⊕Injecção para a análise</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕Condicionamento das seringas ou membranas</li> <li>⊕Eluição com solvente para remover impurezas e dessorção do analito</li> <li>⊕Evaporação/concentração da fase orgânica</li> <li>⊕Injecção para a análise</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕Exposição da fibra à amostra</li> <li>⊕Dessorção do analito no injector</li> </ul>

As vantagens do método de SPME relativamente aos métodos LLE e SPE são o seu procedimento mais simples e mais rápido, de um modo geral obtém-se extractos mais limpos, não utiliza solventes para a eluição e o volume da amostra para análise é menor. Por outro lado, o analito necessita de ser mais volátil e termicamente estável para ser dessorvido e determinado por Cromatografia Gasosa [31].

A microextração em fase sólida – SPME (Solid-Phase Microextraction) – é uma técnica moderna desenvolvida por Arthur e Pawliszyn [28, 31].

Neste método é utilizada uma fibra de sílica fundida, recoberta com um filme fino de um polímero (por exemplo: polidimetilsiloxano, poliacrilato ou carbowax) ou um adsorvente sólido (por exemplo: carvão activado microparticulado). Esta fibra está contida num suporte apropriado. Quando não está a ser utilizada encontra-se recolhida no interior da seringa, mas quando pretende-se analisar uma amostra, é introduzida num frasco, sendo exposta à sua matriz (líquida ou gasosa) que contém o(s) composto(s) em estudo, durante um período de tempo já pré-determinado. Os compostos que possuem afinidade com a fibra vão ser adsorvidos nesta. De seguida, recolhe-se a fibra no seu dispositivo, para sua protecção, até ser inserida no injector de um cromatógrafo gasoso. Depois de inserir a fibra no cromatógrafo, esta é exposta para ocorrer a dessorção completa dos compostos, este período de tempo é pré-definido. De seguida procede-se à quantificação dos compostos adsorvidos.

Um esquema pormenorizado da seringa e da fibra pode ser visualizado na figura seguinte.

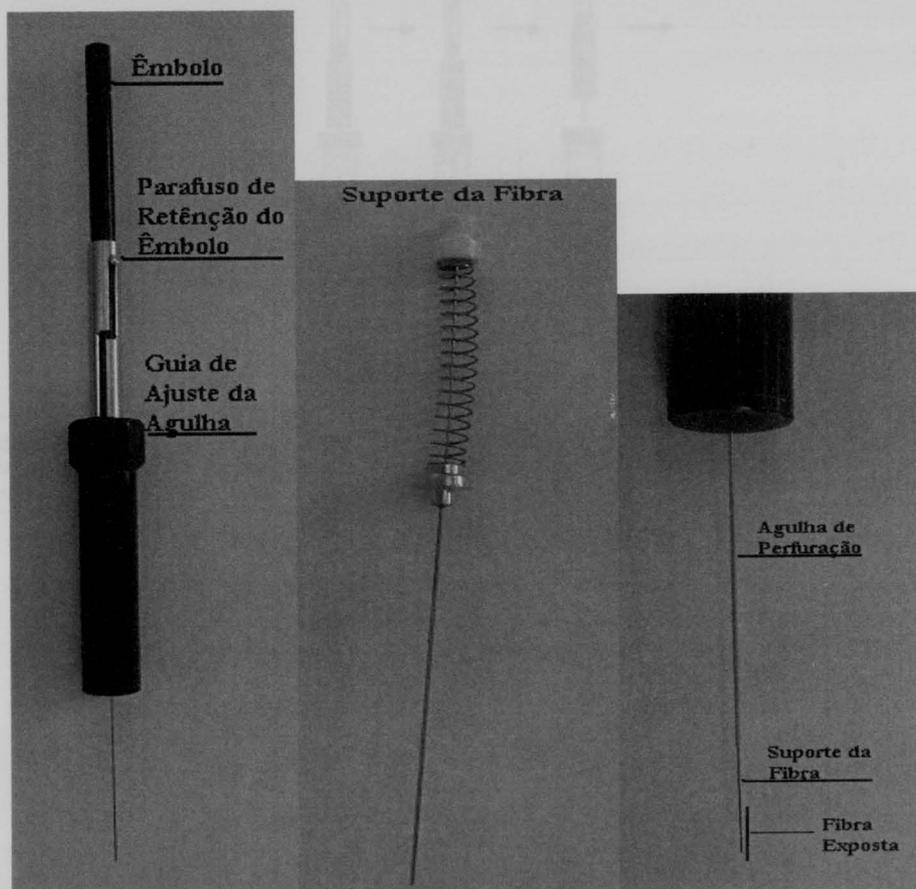


Figura 1.7 – Representação esquemática da seringa, do suporte e da fibra utilizada em SPME.

Resumindo, o método de SPME possui dois passos fulcrais: em primeiro, a extracção do composto através de uma fibra de SPME que é colocada na matriz da amostra; em segundo, a dessorção que ocorre dos compostos que estão no revestimento polimérico da fibra, num injector devidamente aquecido de um cromatógrafo. A quantidade de composto que foi adsorvido pela fibra tem uma relação linear com a sua concentração em solução.

Na figura seguinte encontra-se representado o procedimento de extracção por SPME.

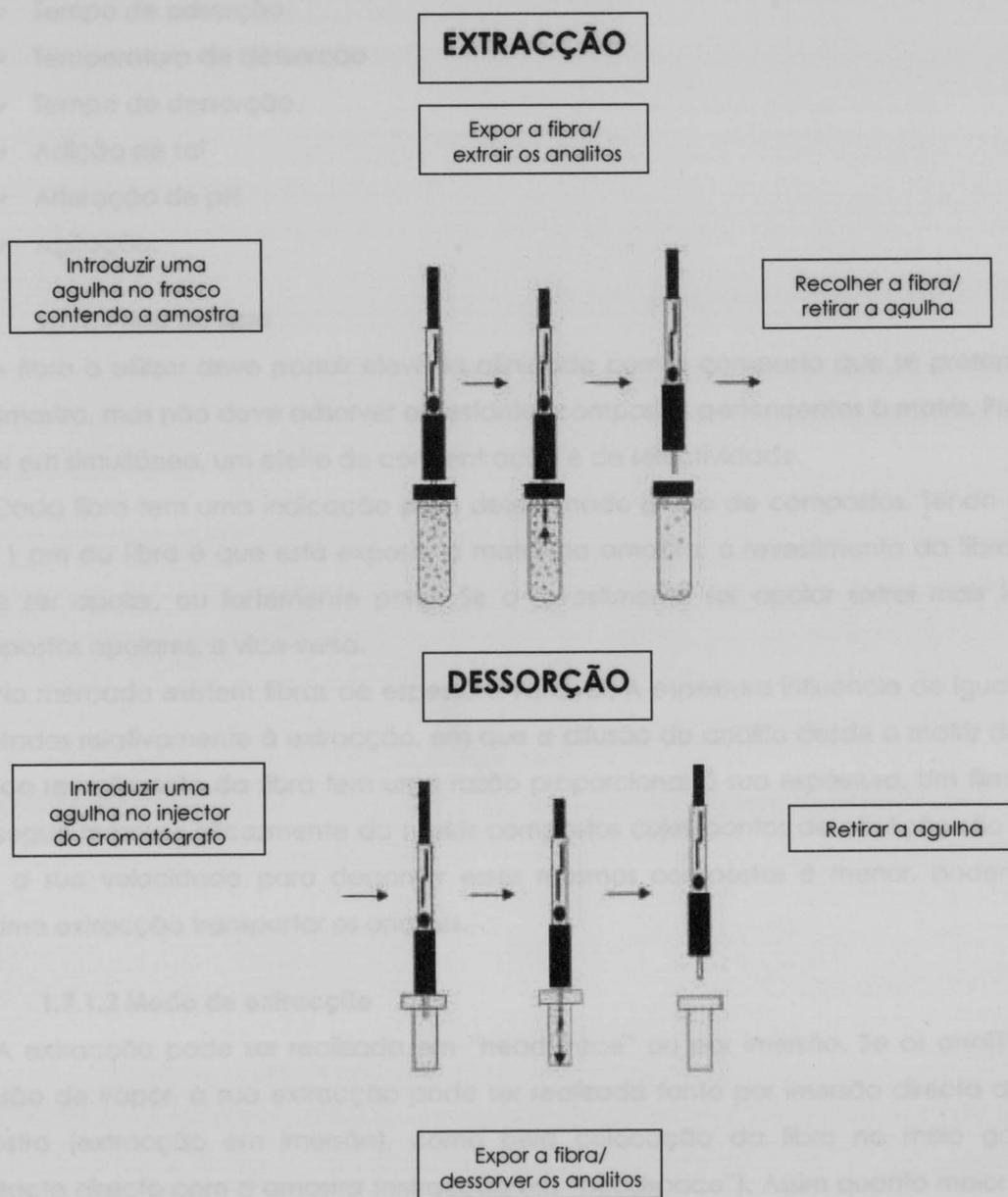


Figura 1.8 – Procedimento de extracção e dessorção numa análise por SPME.

### 1.7.1 Parâmetros que influenciam a eficiência

Existem diversos parâmetros que podem ser otimizados e que influenciam as técnicas de extracção:

- Tipo de Fibra
- Modo de extracção/ adsorção
- Temperatura de adsorção
- Tempo de adsorção
- Temperatura de dessorção
- Tempo de dessorção
- Adição de sal
- Alteração de pH
- Agitação.

#### 1.7.1.1 Tipo de fibra

A fibra a utilizar deve possuir elevada afinidade com o composto que se pretende extrair da amostra, mas não deve adsorver os restantes compostos pertencentes à matriz. Pretende-se obter em simultâneo, um efeito de concentração e de selectividade.

Cada fibra tem uma indicação para determinado grupo de compostos. Tendo em conta que 1 cm da fibra é que está exposto à matriz da amostra, o revestimento da fibra de SPME deve ser apolar, ou fortemente polar. Se o revestimento for apolar extrai mais facilmente compostos apolares, e vice-versa.

No mercado existem fibras de espessura variável. A espessura influencia de igual modo os resultados relativamente à extracção, em que a difusão do analito desde a matriz da amostra até ao revestimento da fibra tem uma razão proporcional à sua espessura. Um filme espesso consegue remover eficazmente da matriz compostos cujos pontos de ebulição são elevados, mas a sua velocidade para dessorver esses mesmos compostos é menor, podendo numa próxima extracção transportar os analitos.

#### 1.7.1.2 Modo de extracção

A extracção pode ser realizada em "headspace" ou por imersão. Se os analitos exibem pressão de vapor, a sua extracção pode ser realizada tanto por imersão directa da fibra na amostra (extracção em imersão), como pela colocação da fibra no meio gasoso sem contacto directo com a amostra (extracção em "headspace"). Assim quanto maior a pressão de vapor do composto que se pretende extrair será aconselhável utilizar em "headspace" (apresenta a vantagem de não entrar em contacto com a amostra), mas se os analitos não exibirem pressão de vapor, devem ser extraídos apenas por imersão da fibra.

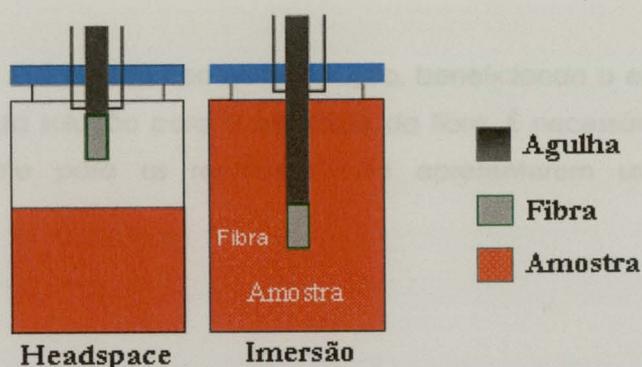


Figura 1.9 – Métodos de amostragem em "headspace" e imersão.

#### 1.7.1.3 Temperatura de adsorção

Quando se aumenta a temperatura de adsorção, a pressão de vapor do composto que se pretende analisar também aumenta, permitindo uma volatilização dos compostos para a região de "headspace". Mas a temperatura não pode ser demasiado elevada porque pode provocar a dessorção do composto na fibra, ou mesmo, alterar a sua estrutura. Através desta simbiose, pode-se definir uma temperatura que permita obter uma eficiência máxima de extracção por SPME.

#### 1.7.1.4 Tempo de adsorção

O tempo de adsorção será um parâmetro de optimização, pois afecta a quantidade de analito na fibra. Inicialmente a adsorção deve ser rápida, tendo de seguida uma fase mais lenta quando a fibra começa a ficar saturada na sua superfície e o equilíbrio é atingido.

#### 1.7.1.5 Temperatura/ tempo de dessorção

A dessorção deve ser realizada com uma temperatura que seja suficientemente elevada e durante um tempo bastante alargado, para que o analito seja completamente removido da fibra para o injector do cromatógrafo. Para testar o tempo de dessorção, a fibra deverá permanecer no injector do cromatógrafo durante períodos crescentes, avaliando as áreas obtidas.

#### 1.7.1.6 Adição de sal/ alteração do pH

A adição de sal à amostra e/ou alteração de pH antes da extracção, pode provocar o aumento da força iónica da matriz, reduzindo a solubilidade de alguns analitos e aumentando a de outros. No caso de reduzir a solubilidade beneficia a partição do analito pela fibra, permitindo a utilização da extracção em "headspace".

### 1.7.1.7 Agitação

A agitação permite reduzir o tempo de extracção, beneficiando a extracção, difundindo os compostos do seio da solução para a superfície da fibra. É necessário ter uma agitação constante e consistente para os resultados não apresentarem uma precisão baixa.

#### 2.1 Materiais

##### 2.1.1 Reagentes

- Oxalato de cálcio de grau p.a. (2,4-OCP) e 2,4,6-Tricloro (2,4,6-TCP).
- Solução de lenol (Merck) a 20 g/l e solução de 2,4-OCP a 4 g/l preparadas com água destilada para os equilíbrios microbiológicos.
- As soluções mãe de 2,4-OCP com concentrações de 500 mg/l e 50 mg/l e 2,4,6-TCP com concentrações de 1,01 g/l e 1,01 mg/l foram preparadas com oxalato (Merck).
- Reagentes para a cultura: ácido clorídrico de grau p.a. (Merck), cloreto de sódio p.a. (Pondal), sulfato de cálcio para microbiologia (Merck), hidrogenossulfo de potássio anidro (Merck), lactose para microbiologia (Merck), sulfato de magnésio hexahidratado p.a. (Merck) e água para laboratório (Merck).
- Reagentes para a determinação de ORO: ácido sulfúrico p.a. (Fuka), dicromato de potássio p.a. (Fuka), solução de lenol 1/4 g/l (Merck), sulfato ferroso amoniacal hexahidratado p.a. (Fuka), ácido de molibdénio p.a. (Fuka), sulfato de pirró p.a. (Fuka).
- Reagentes para DNA: água destilada, ácido sulfúrico p.a. (Fuka) e sulfato de sódio anidro p.a. (Pondal).
- Meio sólido para microbiologia: NB - nutrient broth agitado (Merck).

##### 2.1.2 Método

A seguinte metodologia a ser experimentada foi realizada num laboratório de microbiologia pelo Eng.º Cláudia Heller, sendo a seguinte descrição um breve resumo do seu trabalho.

O inóculo era constituído por uma cultura pura de *Koeleria basiana* DSM 11853 induzida com 250 mg/l de lenol e 25 mg/l de 2,4-OCP. O ensaio de indução consistiu na inoculação de meio de cultura líquido (fluente sintético) cuja concentração de lenol manteve-se constante no valor de 250 mg/L, mas onde se aumentou de forma progressiva a concentração de 2,4-OCP, até este atingir um valor máximo de 30 mg/L. Para se efectuar a inoculação no reactor biológico foi efectuada um scale-up, por forma obter biomassa suficiente. O estado de crescimento microbiano que foi utilizado para efectuar a transferência para o meio físico

## **Capítulo 2. Procedimento Experimental**

Neste capítulo é apresentado uma relação do material necessário para a realização deste trabalho, a descrição da instalação experimental e das diferentes metodologias utilizadas no procedimento experimental, sendo o biorremediação a mais relevante.

### **2.1 Materiais**

#### **2.1.1 Reagentes**

Clorofenóis obtidos da Supelco: 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP) e 2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCP).

Solução de fenol (Merck) a 25 g/l e solução de 2,4-DCP a 4 g/l preparadas com água destilada para as experiências microbiológicas.

As soluções mãe de 2,4-DCP com concentrações de 540 mg/l e 5,40 mg/l e 2,4,6-TCP com concentrações de 1,01 g/l e 5,04 mg/l foram preparadas com 2-propanol (Merck).

Reagentes para o efluente sintético: cloreto de cálcio dihidratado p.a. (Merck), cloreto de sódio p.a. (Pronalab), extracto de carne para microbiologia (Merck), hidrogenofosfato de potássio anidro (Merck), peptona para microbiologia (Merck), sulfato de magnésio hexahidratado p.a. (Riedel de Haën) e ureia para biologia molecular (Merck).

Reagentes para a determinação de CQO: ácido sulfúrico p.a. (Fluka), dicromato de potássio p.a. (Riedel de Haën), solução de ferroína 1/40 mol/l (Merck), sulfato ferroso amoniacal hexahidratado p.a. (Fluka), sulfato de mercúrio p.a. (Fluka), sulfato de prata p.a. (Fluka).

Reagentes para SPME: água destilada, ácido sulfúrico p.a. (Fluka) e sulfato de sódio anidro p.a. (Panreac).

Meio sólido para microbiologia: NB – Nutrient Broth agarizado (Merck).

#### **2.1.2 Inóculo**

A seguinte metodologia a ser apresentada foi realizada num laboratório de microbiologia, pela Eng.<sup>a</sup> Cláudia Heitor, sendo a seguinte descrição um breve resumo do seu trabalho.

O inóculo era constituído por uma cultura pura de *Ralstonia basilensis* DSM 11853 induzida com 250 mg/l de fenol e 25 mg/l de 2,4-DCP. O ensaio de indução consistiu na inoculação de meios de cultura líquidos (efluente sintético) cuja concentração de fenol manteve-se constante no valor de 250 mg/l, mas onde se aumentou de forma progressiva a concentração de 2,4-DCP, até esta atingir um valor máximo de 30 mg/l. Para se efectuar a inoculação no reactor biológico foi efectuado um *scale-up*, por forma obter biomassa suficiente. O critério de crescimento microbiano que foi utilizado para efectuar a transferência para o meio fresco

## 2. Procedimento Experimental

baseou-se na leitura da densidade óptica (DO) do meio. A verificação da pureza das culturas foi realizada recorrendo a estriamento em meio sólido NB.

Todas as culturas em meio líquido foram sujeitas a:

- agitação permanente numa incubadora orbital (Gallenkamp, Reino Unido);
- temperatura de incubação de 30 °C;
- velocidade de agitação de 120 rpm.

Os meios sólidos foram incubados numa estufa (P-Selecta, HotCold-M) a 30 °C.

### 2.2 Instalação experimental

O sistema que se encontra representado na Figura 2.1 consiste num tanque ou recipiente que contém o efluente sintético que vai dar entrada no reactor (A), numa bomba peristáltica (B), num reactor biológico (C) de volume igual a 3 litros com arejamento (0,14 m<sup>3</sup>/h – ar comprimido), num decantador (D) de separação de lamas, numa bomba elevatória que promove a recirculação das lamas através da utilização do ar (E), num tanque ou recipiente para colectar o efluente já tratado (F), num arejador do reactor (G) e num medidor de caudal (H). A instalação experimental apresenta um volume total de 5 litros.

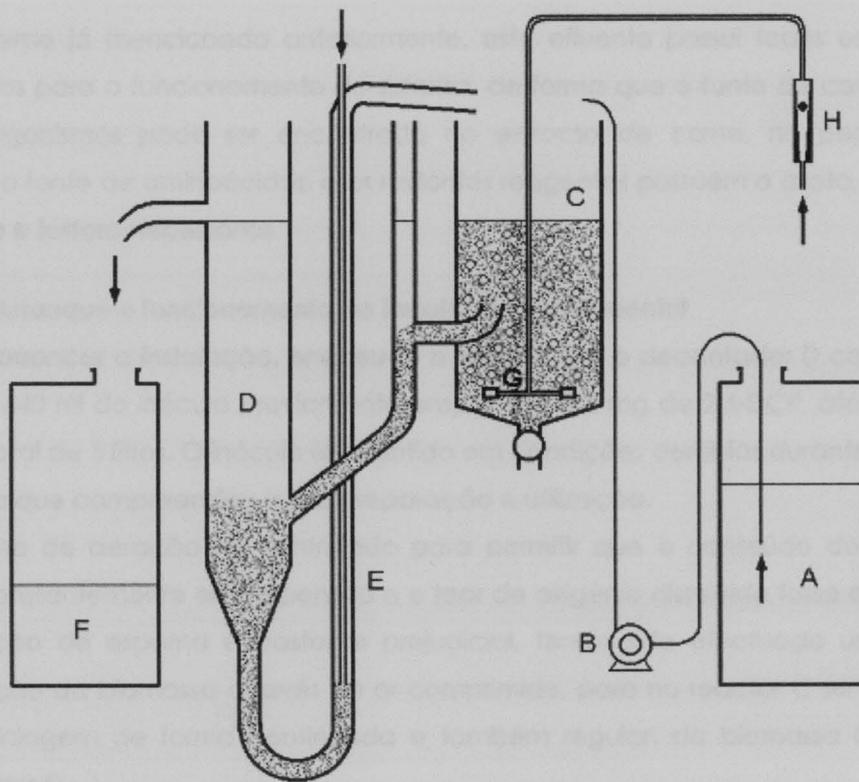
Esta instalação foi alimentada em contínuo, através de uma bomba peristáltica (Ismatec Mini-S 860), com 0,75 l/h (tempo hidráulico de 4 horas) de efluente sintético, que continha todos os nutrientes necessários ao funcionamento do reactor biológico. À bomba foram acoplados tubos de impulsão (Ismatec – Tygon SC0071) e a correspondente tubagem de extensão (Ismatec – Tygon MF0029) com capacidade para efectuar o transporte da solução desde os tubos de impulsão até ao destino pretendido. Esta tubagem tem capacidade para debitar cerca de 0,9 l/h.

Os tanques A e F utilizados eram constituídos por plástico devidamente apropriado, cuja capacidade máxima era de 30 litros.

A solução sintética de entrada no reactor foi reproduzida conforme é sugerida pelo  
norma, contendo num litro de água da torneira:

Tabela 2.1 - Quantidade de reagentes adicionados a um litro de água da torneira para  
preparar a solução sintética o alimento do reactor (norma OCDE - 1981) [33].

Reagente	Peptona	Sulfato de Cálcio	Ureia CONH <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> Cl	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	NaPO <sub>4</sub>
Quantidade (mg)	160	116	30	7	4	2	28



**Figura 2.1** – Representação esquemática da instalação experimental.

**Legenda:**

A – Tanque que contém o efluente sintético de entrada do reactor

B – Bomba peristáltica

C – Reactor biológico

D – Decantador

E – Recirculação de lamas por "air-lift"

F – Tanque de colecta de efluente tratado

G – Arejamento do reactor

H – Medidor de caudal de arejamento

**2.2.1 Efluente sintético**

A solução sintética de entrada no reactor foi preparada conforme é sugerida pela norma, contendo num litro de água da torneira:

**Tabela 2.1** – Quantidade de reagentes adicionados a um litro de água da torneira para preparar a solução sintética a alimentar ao reactor (Norme OCDE – 1981) [35].

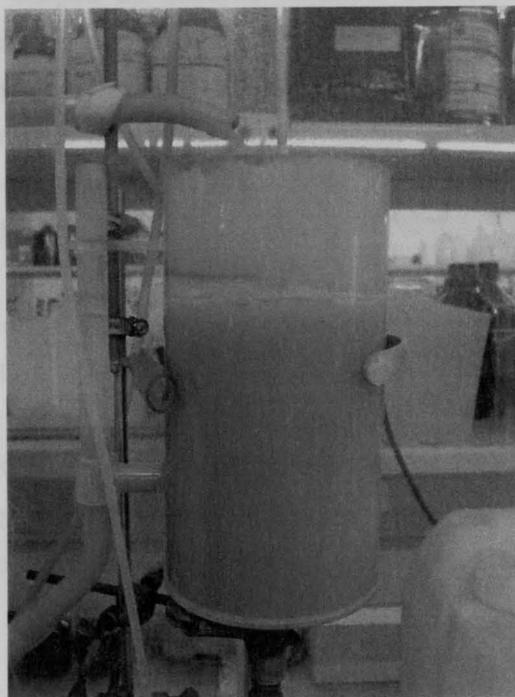
Reagente	Peptona	Extracto de Carne	Ureia CO(NH <sub>2</sub> )	NaCl	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Quantidade (mg)	160	110	30	7	4	2	28

Conforme já mencionado anteriormente, este efluente possui todos os nutrientes necessários para o funcionamento do sistema, de forma que a fonte de carbono para os microrganismos pode ser encontrada no extracto de carne, na peptona está presente a fonte de aminoácidos, e os restantes reagentes possuem o azoto, sal, cálcio, magnésio e fósforo necessários.

### 2.2.2 Arranque e funcionamento da instalação experimental

Para arrancar a instalação, encheu-se o reactor C e o decantador D com efluente sintético, 440 ml de inóculo previamente preparado e 5 mg de 2,4-DCP, até perfazer o volume total de 5 litros. O inóculo foi mantido em condições aeróbias durante o período de tempo que compreendeu a sua preparação e utilização.

O ritmo de aeração foi controlado para permitir que o conteúdo do reactor C ficasse constantemente em suspensão e o teor de oxigénio dissolvido fosse o suficiente. A formação de espuma é bastante prejudicial, tendo sido efectuado um ajuste à recirculação da biomassa através do ar comprimido, para no reactor C ser efectuada uma reciclagem de forma continuada e também regular, da biomassa à saída do decantador D.



**Figura 2.2** – Fotografia do reactor de arejamento utilizado na instalação experimental.

No arranque da instalação experimental, o sistema esteve a funcionar em circuito fechado, apenas com a recirculação da biomassa no decantador. O sistema deveria estar a funcionar assim de 3 a 5 dias teoricamente, para permitir o crescimento das bactérias e por sua vez a estabilização do sistema. Este momento ocorre com fácil visibilidade, pois existe uma turvação substancial no interior do reactor, desde o início até ao referido momento, sendo sinal do crescimento dos microrganismos e possível estabilização do sistema. Convém salientar que no início deste processo (fase de aclimação dos microrganismos ao sistema), enquanto não ocorrem níveis de turvação, ocorre a formação de espuma dentro do reactor C, que desaparece consoante aumenta a turvação e tende o processo de crescimento dos microrganismos a estabilizar.

Para o caso específico implementado, esperou-se aproximadamente 13 dias para a estabilização da biomassa. Neste período foi adicionado diariamente efluente sintético (com a quantidade de nutrientes equivalente para 5 litros, conforme na Tabela 2.1) e pequenas quantidades de 2,4-DCP (para permanecer constante a sua concentração). Ao fim do primeiro dia, a formação de espuma já não era visível, sendo apenas observada aquando da adição de efluente sintético. Como não era observado um aumento de turvação, ao terceiro e décimo terceiro dia (antes do sistema passar a aberto) adicionou-se respectivamente, 5 e 50 ml de cloreto férrico a 5 %, para reagrupar os microrganismos e formar flocos, permitindo uma formação de agregados de biomassa. Devido à cor alaranjada da solução de cloreto férrico, os agregados ficaram facilmente identificados.

Quando o sistema ficou em aberto, treze dias após o seu arranque, começou a ser alimentado a um caudal de valor médio de 1 l/h, de efluente sintético proveniente do tanque A ao reactor C. Em diferentes períodos, foram testadas diferentes concentrações de 2,4-DCP na alimentação: entre os dias 14 e 27, 1000 µg/l; entre os dias 28 e 58, 500 µg/l; e entre os dias 59 e 69, 200 µg/l. Na figura seguinte pode-se observar a instalação experimental a funcionar em sistema aberto.



**Figura 2.3** – Fotografia do sistema de lamas activado implementado, a funcionar em circuito aberto.

### 2.3 Análise e controlo

Para efectuar a análise e quantificação do composto são necessárias técnicas bastante apuradas. Este poluente é vestigiário devido à ordem de concentração estar na gama dos  $\mu\text{g/l}$  e o seu limite, conforme já mencionado, nas águas superficiais ser desta mesma gama. Este facto associado às possíveis interferências englobadas no próprio composto exige a utilização de métodos validados, que permitam devidamente identificar e quantificar a existência do mesmo com graus de incerteza satisfatórios.

A amostra que se pretende analisar precisa de ter uma correcta preservação para obter uma maior exactidão dos resultados. Existem três formas de preservar as amostras que são: congelar à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ , refrigerar a  $4^{\circ}\text{C}$  e ajustar a solução a pH igual a 2. Entre as formas referidas seleccionou-se a refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ , uma vez que

seriam analisadas pouco tempo depois da recolha (não sendo assim necessário efectuar a sua congelação) e a última forma poderia ter eco no rendimento do método de extracção.

### 2.3.1 Densidade óptica (DO)

Para efectuar o controlo da evolução da massa celular, a medição da densidade óptica (DO) da biomassa existente dentro do reactor aeróbio implementado é de bastante relevância, pois permite identificar a situação na qual se encontra o processo biológico (crescimento celular, estabilização do sistema ou morte dos microrganismos).

A DO no início do processo tem um crescimento exponencial, referente à fase de crescimento das células, e de seguida ocorre a fase de estabilização identificada pelo valor constante da DO. Após a ocorrência da estabilização, o seu valor poderá ter oscilações de baixa amplitude consideradas normais, pois o seu valor poderá descer ou subir consoante a alimentação fornecida – efluente sintético.

A medição da densidade óptica foi efectuada num espectrofotómetro (Jasco V-530 UV/Vis) com comprimento de onda de 610 nm e um percurso óptico de 1 cm. Como referência de absorvância nula foi utilizado um branco de água destilada. As amostras foram diluídas de modo a que a absorvância (DO) estivesse sempre compreendida entre 0 e 1.

Enquanto o sistema permaneceu em circuito fechado, a medição da DO foi efectuada diariamente, instantes após a recolha das amostras do reactor (por forma a não existir uma sedimentação). As medições efectuadas permitiram analisar o sistema para indicar se este estava estabilizado, e se as condições eram as indicadas de modo a iniciar o circuito em aberto. Quando a instalação começou a trabalhar em contínuo, treze dias após arranque, procedeu-se à sua leitura diária apenas até ao décimo oitavo dia. A partir deste dia, efectuava-se três dias durante a semana, e não se recolhia ao fim de semana. Este procedimento deveu-se à considerada estabilização do sistema, o que permite ter em conta a existência de pequenas oscilações logo após a mesma.

O valor da DO obtido na leitura efectuada é apenas uma medida qualitativa do teor de turvação causado pelas células, não podendo ser convertido em termos de concentração ou de biomassa existente.

### 2.3.2 Carência química em oxigénio (CQO)

#### 2.3.2.1 Princípio do método

A carência química em oxigénio (CQO) é uma propriedade química que permite quantificar a matéria orgânica existente numa dada amostra de água, com relativa rapidez.

O método de determinação da CQO consiste na oxidação da matéria orgânica por uma mistura de ácido crómico e sulfúrico em ebulição. A amostra é refluxada, numa solução extremamente ácida, com o dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) em excesso conhecido. Após a digestão, o  $K_2Cr_2O_7$  excedente é titulado com sulfato ferroso amoniacal (solução FAS), para se poder determinar a quantidade de  $K_2Cr_2O_7$  que foi consumido, sendo a matéria orgânica oxidável determinada em termos de oxigénio equivalente [36].

Porém na teoria, o valor da CQO apenas se refere à matéria orgânica existente, mas subsistem outros compostos inorgânicos, que podem influenciar este valor em excesso por serem oxidáveis. Adversamente, existe matéria orgânica que não é oxidável quimicamente, e que não sendo esta quantificada conduz a um valor inferior ao real. Conclui-se que o valor obtido não representa exactamente a quantidade de matéria orgânica, transgredindo por excesso principalmente no caso de águas residuais provenientes das indústrias, sendo a matéria inorgânica, os poluentes maioritários [35].

#### 2.3.2.2 Condições experimentais

Enquanto o sistema permaneceu em circuito fechado, as amostras foram recolhidas diariamente do reactor, até ao dia 13 inclusive.

Quando o sistema foi colocado em circuito aberto, inicialmente a recolha era diária das amostras à entrada do reactor e à saída do decantador. Como na DO, a partir do dia 18, efectuou-se a recolha em três dias da semana já destinados e não se recolhia ao fim de semana. As amostras para análise de CQO foram conservadas a pH igual ou inferior a 2 por adição de ácido sulfúrico, e foram refrigeradas a 4 °C.

A matéria orgânica foi determinada através da medição da CQO pelo método titrimétrico de refluxo fechado (*Standard Methods*). O método de refluxo fechado quando comparado com o de refluxo aberto apresenta como principal vantagem os volumes de reagentes serem bastante menores. Duplicados das amostras e do branco foram refluxadas num reactor de CQO (Hach Company – modelo 45600), conforme se pode observar na Figura 2.4, a 150 °C durante 2 horas com um excesso de dicromato de potássio [13]. Após a digestão, o dicromato de potássio residual foi titulado com

## 2. Procedimento Experimental

sulfato ferroso amoniacal hexahidratado. Uma solução de ferroína foi usada como indicador.



**Figura 2.4** – Bloco digestor utilizado na determinação da CQO.

A preparação dos reagentes necessários e a execução do método, foram seguidas conforme as indicações do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*.

Reagentes necessários:

- Solução de digestão standard de dicromato de potássio 0,0167 M

Adicionar a cerca de 500 ml de água destilada: 4,913 g de padrão primário de  $K_2Cr_2O_7$  (previamente seco a  $103^\circ C$ , durante 2 horas), 167 ml de  $H_2SO_4$  concentrado e 33,3 g de sulfato de mercúrio ( $HgSO_4$ ).

Dissolver, deixar a arrefecer até à temperatura ambiente e diluir a 1000 ml.

- Reagente de ácido sulfúrico

Adicionar sulfato de prata ( $Ag_2SO_4$ ) a ácido sulfúrico concentrado com uma razão de 5,5 g  $Ag_2SO_4$ / kg  $H_2SO_4$ .

Deixar a dissolver durante 1 a 2 dias.

- Solução indicadora de ferroína

A solução quando adquirida já está devidamente preparada.

## 2. Procedimento Experimental

• Sulfato ferroso amoniacal (FAS) aproximadamente 0,10 M

Dissolver 39,2 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em água destilada. Adicionar 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, deixar arrefecer e diluir até perfazer os 1000 ml. Aferir o título da solução diariamente com solução de digestão padrão de dicromato de potássio, da seguinte forma: num tubo de digestão adicionar reagentes conforme indicação na Tabela 2.2. Para se efectuar o título desta solução, o tubo de digestão deve ter 2,5 ml de água destilada em vez de amostra, para ser este o branco. Deve-se deixar arrefecer o tubo à temperatura ambiental, adicionar 1 a 2 gotas da solução de ferroína (indicador), e titular com a solução de FAS.

O cálculo da molaridade da solução é efectuado pelo uso da seguinte expressão:

$$M = \frac{\text{Volume } \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 (0,0167\text{M}) \text{ titulada, ml}}{\text{Volume FAS, ml}} \times 0,10$$

**Tabela 2.2** – Quantidades de amostra e reagentes necessárias para digestões [36].

Amostra (ml)	Solução de digestão (ml)	Reagente de ácido sulfúrico (ml)	Volume final (ml)
2,5	1,5	3,5	7,5

### Procedimento:

Com uma solução de ácido sulfúrico a 20 %, lava-se inicialmente os tubos de cultura e as respectivas tampas, antes de uma primeira utilização, de forma a impedir contaminações. A Tabela anterior indica quais os volumes de reagentes que devem ser colocados e respectiva ordem, no tubo de cultura onde se processará a digestão. Quando se adiciona o ácido sulfúrico deve-se ter cuidado de segurar sempre o tubo pela rosca, pois a reacção é altamente exotérmica e após a adição deste reagente existe um aumento de temperatura bastante significativo (risco de queimaduras graves se colocar as mãos directamente no vidro). Por este motivo é conveniente a utilização de luvas devido à natureza corrosiva da solução de ácido sulfúrico. Quando se adicionarem todos os reagentes, rosca-se os tubos e inverte-se diversas vezes para misturar completamente a solução.

O bloco digestor deve estar pré-aquecido a 150° C quando se colocam os tubos, de seguida promove-se o refluxo fechado durante 2 horas. Quando terminar a digestão (após as 2 horas), os tubos devem permanecer no bloco digestor (desligado) durante

## 2. Procedimento Experimental

um período de tempo de 15 minutos, de forma a temperatura baixar até 120° C. Esta é a primeira fase de arrefecimento, seguindo-se a segunda após retirar os tubos, de forma a impulsionar o arrefecimento natural até à temperatura ambiente.

Quando termina a etapa de digestão das amostras, estas são analisadas recorrendo a uma titulação com a solução FAS. As soluções existentes nos tubos são transferidas para goblés ou matrizes mais largos, a fim de facilitar o processo de titulação. Quando se efectua a transferência com auxílio de água destilada (não tem interferências) coloca-se uma barra magnética para impulsionar a agitação. Adiciona-se de seguida, 1 a 2 gotas de solução indicadora. Durante a titulação das soluções com FAS promove-se a contínua agitação através de uma placa de agitação. Identifica-se o ponto de viragem de cor azul-esverdeado, passando por incolor até obter uma cor castanho-avermelhado. De igual modo ao descrito, efectua-se um ensaio em branco (digestão e titulação), com os reagentes e um volume de água destilada igual ao de amostra.

É de relevância frisar que é sempre em duplicado, tanto o branco como as amostras.

### Cálculo:

O valor da CQO, em mg O<sub>2</sub>/l é calculado pela seguinte expressão:

$$CQO = \frac{(A - B) \times M \times 8000}{ml(amostra)}$$

em que:

A – ml de FAS utilizado para titular o branco (água destilada)

B – ml de FAS utilizado para titular as amostras

C – molaridade da solução de FAS.

Tabela 2.1 – Condições óptimas para maximizar a extração do 2,4-DCP por SPME D2.

Modo de extração	Temperatura de extração	Tempo de extração	pH	Ação de ml (NaOH)
Imerso	40°C	60 min	2	7,7 g/ 30 ml amostra

### 2.3.3 Extracção e pré-concentração por SPME

Na micro-extracção em fase sólida (SPME) existem diversos parâmetros que devem ser otimizados, conforme se pode verificar no princípio do método descrito na introdução. A metodologia da análise foi desenvolvida por *Ribeiro et al* para uma larga amostra de poluentes prioritários, no qual se encontra o 2,4-diclorofenol.

As amostras foram sempre recolhidas em simultâneo com as respectivas para análise da CQO, e foram conservadas em refrigeração a 4° C.

Os padrões e as amostras foram extraídos e pré-concentrados por SPME, antes da análise cromatográfica. O sistema de SPME consiste numa fibra de SPME (Supelco), com um revestimento de 85 µm em poliacrilato e montada num suporte para fibras manual (Supelco) – conforme se pode verificar na Figura 1.7 (Introdução). A extracção foi efectuada em vials foscos roscados (Supelco) de 4 ml de capacidade e agitação de 750 rpm promovida por uma barra magnética (10 × 3 mm PTFE – Supelco) numa placa de aquecimento e agitação (Corning - modelo PC-240). Os septos dos frascos utilizados eram de PTFE/Silicone (Supelco). Na Figura 2.5 pode-se observar os vials e septos utilizados.



Figura 2.5 – Fotografia dos vials e septos utilizados.

As condições óptimas desenvolvidas por *Ribeiro et al* nas quais se deve influir de modo a obter uma extracção máxima do 2,4-DCP (clorofenol em estudo) encontram-se descritas na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Condições óptimas para maximizar a extracção do 2,4-DCP por SPME [32].

Modo de extracção	Temperatura de extracção	Tempo de extracção	pH	Adição de sal (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
imersão	40° C	60 min	2	7,7 g/ 30 ml amostra

De referir que o pH igual a 2 foi ajustado com ácido sulfúrico a 1 M. Importante também expor que se optou por um tempo de extracção de 15 minutos, para que o método de análise fosse mais rápido.

A dessorção foi feita no injectador do cromatógrafo a 280 °C durante 3 minutos.

### 2.3.4 Análise cromatográfica com detector de captura de electrões (GC-DCE)

O método utilizado para quantificar o 2,4-DCP adsorvido na fibra após extracção por SPME, foi fundamentado na cromatografia gasosa (GC) com detector de captura electrónica (DCE). As condições operacionais e o equipamento utilizado foram:

- cromatógrafo gasoso Finnigan 9001, com sistema de injeção split-splitless e detector de captura electrónica,  $^{63}\text{Ni}$
- sistema computadorizado de aquisição de dados de software BORWIN
- coluna capilar DB-5MS  
(30 m de comprimento  $\times$  0.32 mm de diâmetro interno  $\times$  1  $\mu\text{m}$  de filme)
- gás de arraste e auxiliar compostos por azoto (99,999%)
- caudais utilizados: gás de arraste, 3 ml/min; make-up, 20 ml/min; gás de purga do detector, 50 ml/min
- temperatura do injectador split-splitless de 280° C
- temperatura do detector de 350° C
- programa de temperaturas:
  - temperatura inicial do forno 150°C durante 1 minuto,
  - rampa de 10° C/min até 280° C,
  - patamar a 280° C durante 1,5 minutos.

A quantificação do 2,4-DCP foi efectuada pelo método do padrão interno: a todos os padrões e amostras adicionou-se 5,41  $\mu\text{g/l}$  de 2,4,6-TCP. A resposta do detector foi ajustada diariamente através de um padrão de controlo diário com 50  $\mu\text{g/l}$  de 2,4-DCP e 5  $\mu\text{g/l}$  de 2,4,6-TCP. Efectuaram-se as diluições consideradas necessárias de modo a que a concentração de 2,4-DCP se situasse dentro da gama da curva de calibração.

A Figura 2.7 ilustra o sistema de SPME para efectuar a extracção do 2,4-DCP, bem como o cromatógrafo gasoso com detector de captura electrónica (GC-DCE) utilizado para quantificação do mesmo.



**Figura 2.7** – Fotografia do cromatógrafo gasoso Finnigan 9001 e do sistema de SPME utilizados.

## **Capítulo 3. Resultados e Discussão**

Os resultados experimentais e a sua discussão vão ser expostos neste capítulo. Conforme no capítulo anterior, os resultados obtidos vão estar desfasados em circuito fechado e aberto. Este último apresentará uma maior relevância, sendo o mais focado.

### **3.1 Validação do procedimento analítico**

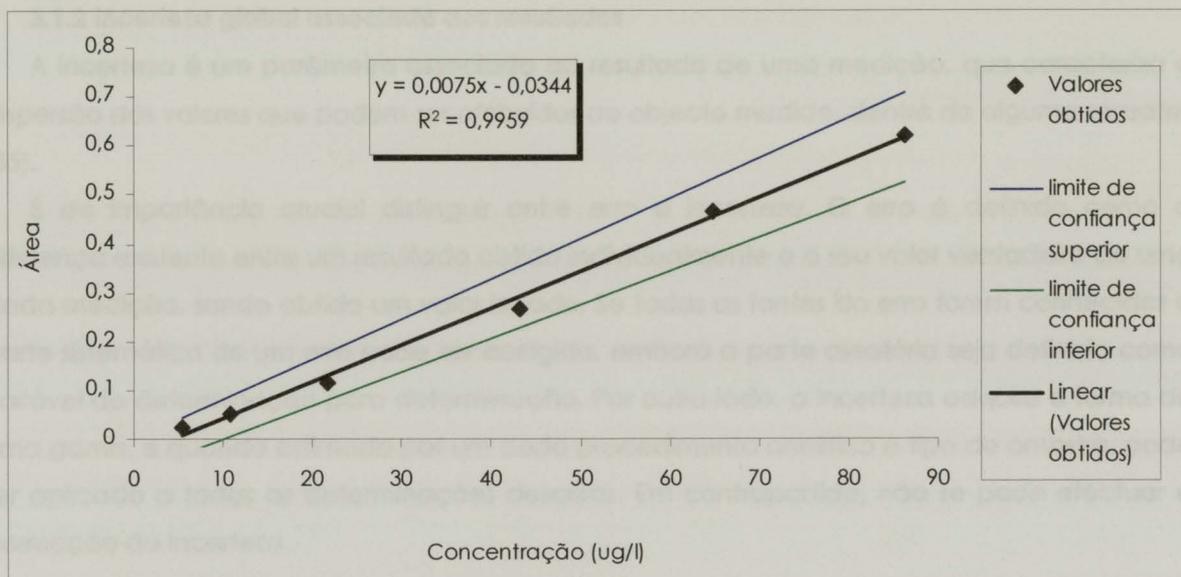
#### **3.1.1 Estudo da linearidade de resposta do detector de GC-DCE**

A análise da linearidade de resposta do detector DCE do cromatógrafo gasoso é bastante relevante, pois permite avaliar acerca da sensibilidade e linearidade da resposta do DCE a concentrações volúveis do poluente prioritário a analisar, e também concluir qual o nível máximo de concentração que o detector deixa de responder de forma linear.

A linearidade foi estudada através da obtenção de uma recta de calibração para o 2,4-DCP, que relaciona o sinal obtido do detector em função da concentração conhecida. Foi utilizado o método do padrão interno, em que se adicionou uma amostra de uma substância padrão à análise (neste caso o 2,4,6-TCP), e relacionou-se as duas áreas obtidas. Foram preparados 6 padrões com concentrações entre 5,40 e 86,4 µg/l de 2,4-DCP, na qual o padrão interno (2,4,6-TCP) manteve a concentração de 5 µg/l, sendo injectados no cromatógrafo no mesmo dia. Para cada concentração foram efectuadas três injeções, sendo o valor considerado para a recta da calibração a média pesada da razão das áreas obtidas.

A Figura 3.1 apresenta a recta de calibração obtida para o 2,4-DCP, e também os respectivos limites, superior e inferior, de confiança associados. Os resultados apresentados apresentam um nível de confiança de 95 %. No Anexo A apresentam-se os cálculos e respectivos resultados que serviram de apoio para obter a recta de calibração.

### 3. Resultados e Discussão



**Figura 3.1** – Recta de calibração e limites de confiança respectivos.

Para efectuar a validação dos resultados numa recta de calibração deve-se verificar as seguintes condições:

$$S_b/b < 5 \%$$

$$a - S_a < 0 < a + S_a$$

A recta de calibração de acordo com os resultados obtidos para o 2,4-DCP, não cumpre uma das duas condições admitidas. O erro do declive é de 3,2 % sendo inferior ao admitido de 5 %, mas o intervalo de confiança para a ordenada na origem não inclui a própria origem. Este último facto implica uma maior incerteza associada à análise do composto.

Relativamente ao limite de detecção do método, este foi calculado segundo a seguinte expressão:

$$LD = a + 3 \times s_a$$

O exemplo de cálculo está em anexo, tendo em conta outros parâmetros necessários para o cálculo. O limite de detecção obtido, em termos de concentração, foi de 4,68  $\mu\text{g/l}$ . Uma vez que todas as amostras foram diluídas pelo menos 50%, o limite de detecção nas amostras foi de 9,36  $\mu\text{g/l}$ .

#### 3.1.2 Incerteza global associada aos resultados

A incerteza é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos ao objecto medido, dentro de alguma sensatez [35].

É de importância crucial distinguir entre erro e incerteza. O erro é definido como a diferença existente entre um resultado obtido individualmente e o seu valor verdadeiro de uma dada medição, sendo obtido um valor isolado. Se todas as fontes do erro forem conhecidas a parte sistemática de um erro pode ser corrigida, embora a parte aleatória seja definida como variável de determinação para determinação. Por outro lado, a incerteza adquire a forma de uma gama, e quando estimada por um dado procedimento analítico e tipo de amostra, pode ser aplicado a todas as determinações descritas. Em contrapartida, não se pode efectuar a correcção da incerteza.

As fontes de incerteza que contribuem para a incerteza global são:

- incerteza relativa associada à concentração obtida pela recta de calibração,  $U_{rc}$
- incerteza relativa associada à preparação dos padrões,  $U_{pad}$
- incerteza relativa associada à precisão do método,  $U_p$
- incerteza relativa associada à exactidão do método,  $U_{ex}$

Foram avaliadas as incertezas da metodologia analítica, sendo a incerteza associada à recta de calibração calculada segundo *Miller et al.*.

As incertezas associadas à preparação dos padrões foram calculadas a partir da precisão do material utilizado (balança, balões volumétricos e micropipetas) [11].

A incerteza da precisão foi avaliada pela precisão intralaboratorial. Esta foi determinada pela análise de duas amostras reais com concentrações de 10 e 50  $\mu\text{g/l}$  aproximadamente, em 6 dias diferentes.

A incerteza associada à recuperação (exactidão) foi avaliada pelo do método da adição de padrão, em 6 dias diferentes, utilizando a adição de padrão a amostras de modo a conterem aproximadamente 20 e 50  $\mu\text{g/l}$ . A recuperação foi então calculada a partir da razão entre o aumento de concentração observado e a quantidade da padrão adicionado, tendo-se obtido uma recuperação média de 31.9%.

Com os valores das incertezas relativas calculados, pode-se determinar a incerteza global do método. No Anexo B encontram-se as expressões referentes a cada incerteza relativa e os exemplos de cálculos para os resultados obtidos.

### 3. Resultados e Discussão

A incerteza combinada ( $U_c$ ) pode ser obtida pela seguinte expressão:

$$U_c = (U_{rc}^2 + U_{pad}^2 + U_p^2 + U_{ex}^2)^{1/2}$$

Os resultados de incerteza global do método são apresentados na Tabela 3.1, tendo sido calculados a partir das componentes da incerteza: calibração, preparação dos padrões, precisão e exactidão.

**Tabela 3.1** – Incertezas associadas às concentrações dos padrões.

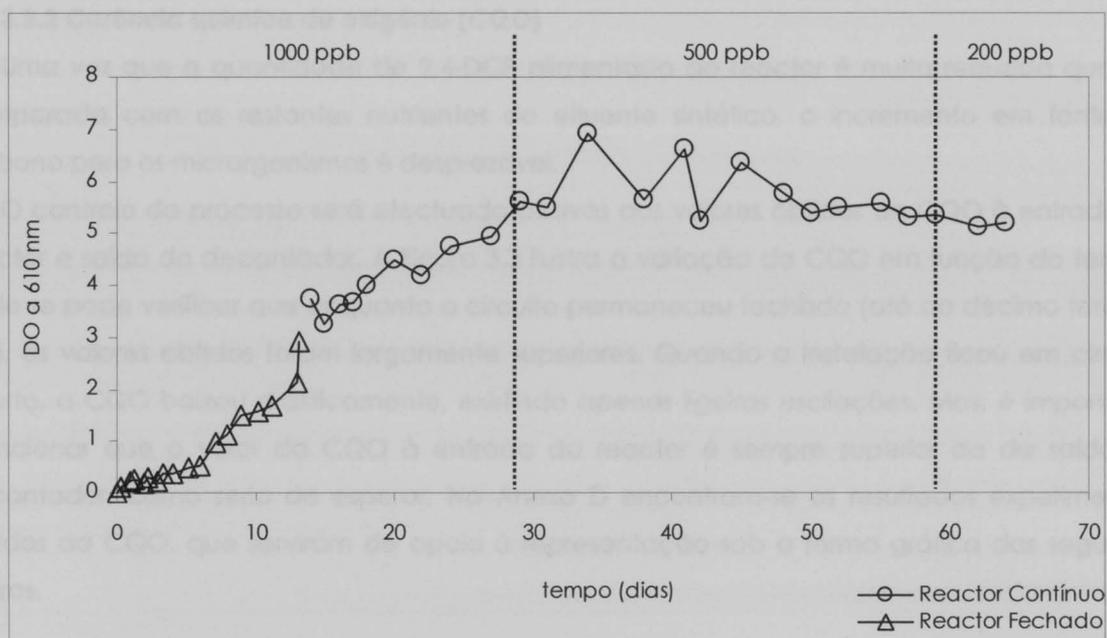
Concentração 2,4-DCP ( $\mu\text{g/l}$ )	$U_{rc}$ (%)	$U_{pad}$ (%)	$U_p$ (%)	$U_{ex}$ (%)	$U_c$ (%)
5,4	35,4	1,2	11,8	31,9	49,1
10,8	17,1	1,2	11,8	31,9	38,1
21,6	8,0	1,2	11,8	31,9	34,9
43,2	3,8	1,2	11,8	31,9	34,2
64,8	2,9	1,2	11,8	31,9	34,1
86,4	2,6	1,2	11,8	31,9	34,1

### 3.2 Controlo de parâmetros relacionados com adições do poluente

#### 3.2.1 Crescimento da biomassa

Através da medição da DO foi estudada a evolução da biomassa no interior do reactor biológico.

Na Figura 3.2 encontra-se representada graficamente a evolução da DO em função do tempo, em circuito fechado e aberto. A listagem dos valores de densidade óptica medidos para a biomassa do reactor encontra-se em Anexo C.



**Figura 3.2** – Representação gráfica da densidade óptica da biomassa no reactor em função do tempo.

Por análise da figura anterior a densidade óptica no reactor parece ter estabilizado ao fim de 31 dias. Inicialmente ocorre uma fase de adaptação dos microrganismos até cerca de 9 dias, o que está de acordo com a norma portuguesa NP-2296 [26], segundo a qual o período inicial de adaptação para sistemas de tratamento biológico deve ser inferior a 10 dias.

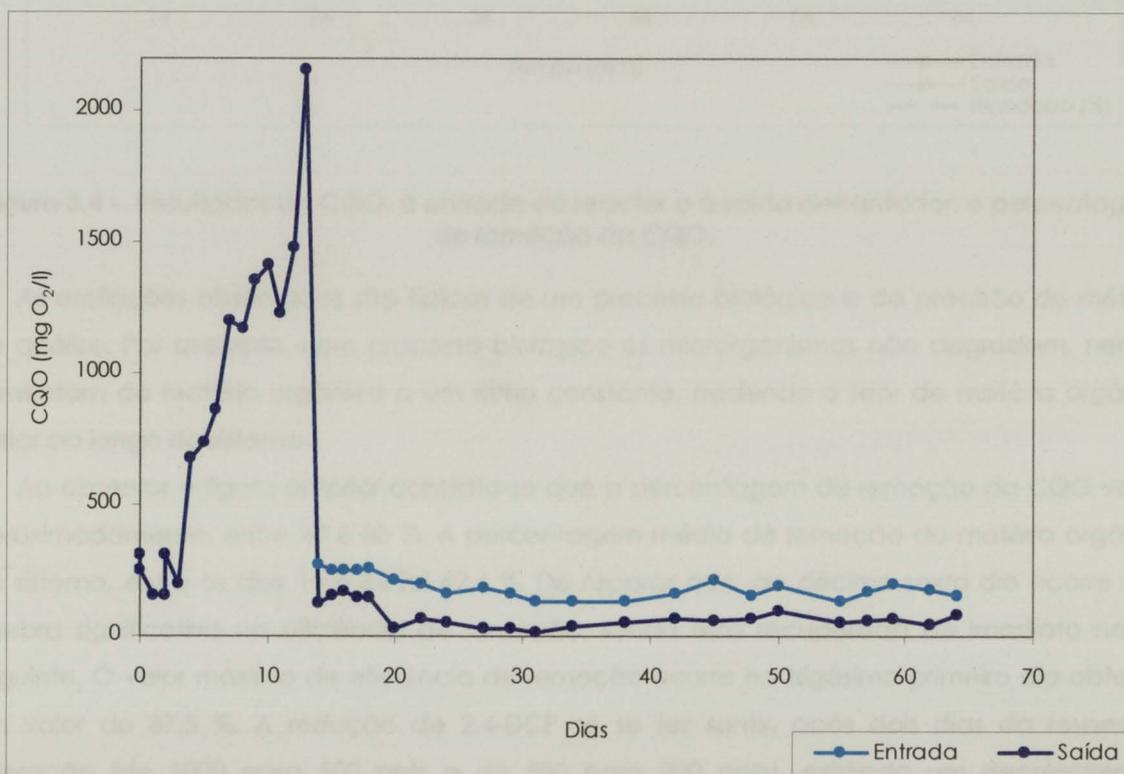
No período correspondente entre os 30 e os 50 dias encontra-se em estado estacionário. As oscilações devem-se principalmente à dificuldade de homogeneização da biomassa no reactor e ao respectivo processo de amostragem. As oscilações podem também ser devidas ao facto de algumas células, em determinadas alturas, poderem estar activas mas não serem capazes de biodegradar o poluente.

Para concentrações extremamente reduzidas de nutriente, a velocidade de crescimento das células é reduzida, provavelmente porque o nutriente não é transportado para o interior das células à velocidade pretendida, de modo a satisfazer o seu metabolismo.

#### 3.2.2 Carência química de oxigénio (CQO)

Uma vez que a quantidade de 2,4-DCP alimentada ao reactor é muita reduzida quando comparada com os restantes nutrientes do efluente sintético, o incremento em fonte de carbono para os microrganismos é desprezável.

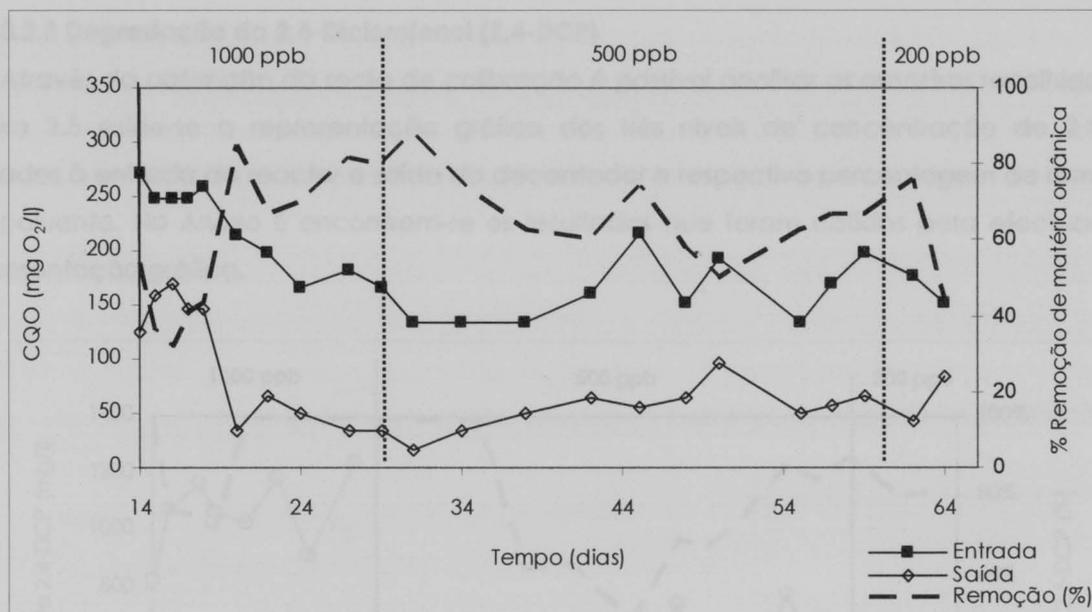
O controlo do processo será efectuado através dos valores obtidos da CQO à entrada do reactor e saída do decantador. A Figura 3.3 ilustra a variação da CQO em função do tempo, onde se pode verificar que enquanto o circuito permaneceu fechado (até ao décimo terceiro dia), os valores obtidos foram largamente superiores. Quando a instalação ficou em circuito aberto, a CQO baixou drasticamente, existindo apenas ligeiras oscilações. Mas, é importante mencionar que o valor da CQO à entrada do reactor é sempre superior ao da saída do decantador, como seria de esperar. No Anexo D encontram-se os resultados experimentais obtidos da CQO, que serviram de apoio à representação sob a forma gráfica das seguintes figuras.



**Figura 3.3** – Representação gráfica da variação da CQO à entrada do reactor e saída do decantador (em circuito fechado e aberto) em função do tempo, em dias.

### 3. Resultados e Discussão

Na Figura 3.4 pode-se visualizar a variação da CQO, apenas em circuito aberto, em função do tempo, bem como a evolução da percentagem de remoção, tendo como base na média dos valores da CQO à entrada do reactor.



**Figura 3.4** - Resultados da CQO, à entrada do reactor e à saída decantador, e percentagem de remoção da CQO.

As oscilações observadas são típicas de um processo biológico e da precisão do método de análise. Por exemplo, num processo biológico os microrganismos não degradam, nem se alimentam de matéria orgânica a um ritmo constante, podendo o teor de matéria orgânica variar ao longo do sistema.

Ao observar a figura anterior constata-se que a percentagem de remoção da CQO variou aproximadamente, entre 40 e 80 %. A percentagem média de remoção da matéria orgânica do sistema, entre os dias 14 e 64 foi 62,4 %. De reparar que, ao décimo sexto dia ocorre uma quebra significativa na eficiência de remoção, sendo esta recuperada de imediato no dia seguinte. O valor máximo de eficiência de remoção ocorre no trigésimo primeiro dia obtendo um valor de 87,5 %. A redução de 2,4-DCP só se fez sentir, após dois dias da respectiva alteração (de 1000 para 500 ppb e de 500 para 200 ppb), existindo um decréscimo na percentagem de remoção.

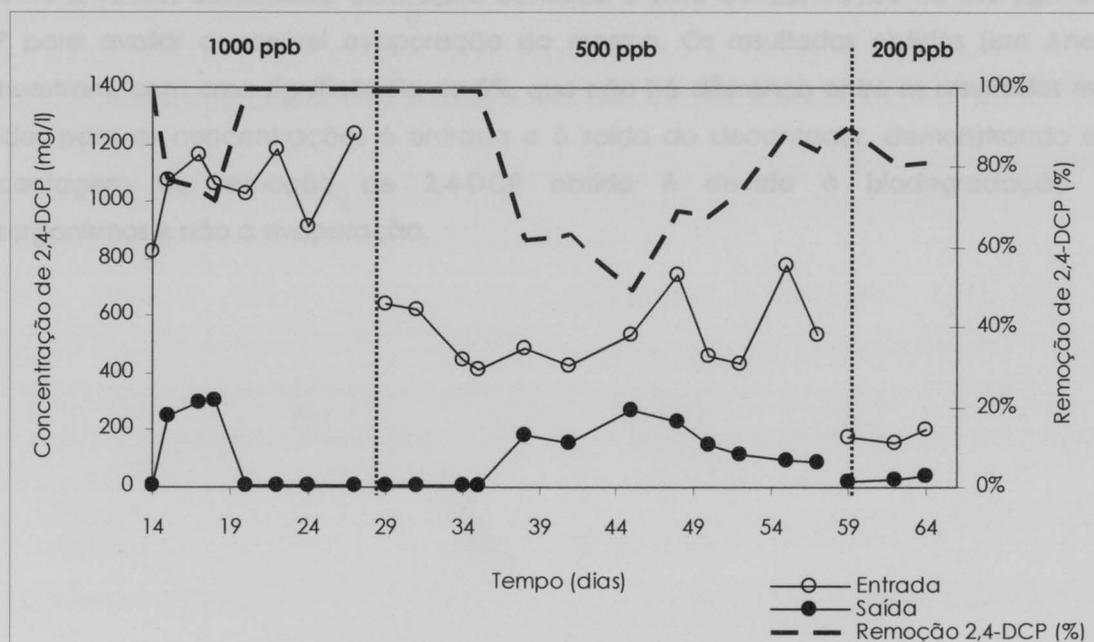
Os resultados obtidos da CQO confirmam os resultados da DO. Inicialmente, em circuito fechado existiu um crescimento exponencial das células comprovado com os valores de matéria orgânica a atingirem valores superiores a 500 mg O<sub>2</sub>/l. Quando em circuito aberto, a DO e a CQO tiveram tendência a estabilizar, em simultâneo, a partir do dia 30.

### 3. Resultados e Discussão

A remoção de CQO adquirida é inferior à alcançada por *Atuanya et al.* (82,3%). No entanto foram obtidas numa instalação com um tempo hidráulico de retenção de 26,4 h, consideravelmente superior ao das actuais condições experimentais (4 h).

#### 3.2.3 Degradação do 2,4-Diclorofenol (2,4-DCP)

Através da obtenção da recta de calibração é possível analisar as amostras recolhidas. Na Figura 3.5 exhibe-se a representação gráfica dos três níveis de concentração de 2,4-DCP testados à entrada do reactor e saída do decantador e respectiva percentagem de remoção do poluente. No Anexo E encontram-se os resultados que foram obtidos para efectuar esta representação gráfica.



**Figura 3.5** - Representação gráfica dos três níveis de concentração de 2,4-DCP testados à entrada do reactor e saída do decantador e respectiva percentagem de remoção do clorofenol.

Ao analisar a figura anterior verifica-se que a concentração do 2,4-DCP à entrada do reactor é sempre superior à saída do decantador, o que está de acordo com o que seria de esperar. Num período inicial do circuito aberto, até ao décimo nono dia, a remoção de 2,4-DCP manteve-se sempre crescente e elevada. Entre os 20 e 35 o reactor biológico removeu o poluente até ao seu limite de detecção analítico (>98 %).

Após 6 dias da alteração da concentração à entrada do reactor de 1000  $\mu\text{g/l}$  para 500  $\mu\text{g/l}$  (dia 35) a remoção de 2,4-DCP baixou para um valor médio de 69,7% durante o período dos dias 35 a 58.

### 3. Resultados e Discussão

---

De um modo geral, a percentagem de remoção de 2,4-DCP varia entre 50 e 100 %, não sendo este último valor atingido devido ao limite de detecção.

Comparando estes resultados com os estudos efectuados por *Atuanya et al.* (remoção de 78% com uma alimentação de 100 mg/l), os resultados obtidos foram superiores no período de alimentação de 1000 µg/l. No entanto, no período de alimentação de 500 µg/l houve um decréscimo na eficiência de remoção. Este facto pode dever-se à crescente competitividade de outra fontes de carbono presentes, à medida que se diminui a concentração de poluente adicionado.

Foi realizado um ensaio em que se arrancou a instalação, sem adição de inóculo e de efluente sintético, alimentada com água destilada e uma concentração de 500 µg/l de 2,4-DCP para avaliar a possível evaporação do mesmo. Os resultados obtidos (em Anexo F) demonstram, com uma significância de 5%, que não há diferença entre os resultados médios obtidos para as concentrações à entrada e à saída do decantador, demonstrando que a percentagem de remoção de 2,4-DCP obtida é devida à biodegradação pelos microrganismos e não à evaporação.

### **Capítulo 4. Conclusão**

O sistema de tratamento biológico implementado apresentou uma percentagem de degradação de aproximadamente 80 %, permitindo obter uma percentagem de remoção de matéria orgânica de 62,4 %, para as condições descritas de alimentação ao reactor. Quando se diminuiu a concentração de 2,4-DCP adicionada, a percentagem de remoção teve tendência a decrescer. De realçar que a instalação teve uma remoção máxima entre os dias 20 e 35.

Em relação aos resultados da CQO e da DO, embora em alguns pontos não estejam concordantes com o esperado, pode-se estar perante um comportamento típico comparativamente ao sistema biológico.

A instalação experimental original tinha um tratamento de afinação após o tratamento biológico, que consistia na adsorção com casca de pinheiro. Devido à morte das células não foi possível efectuar o tratamento terciário, o que se propõe como trabalho futuro para confirmação dos resultados anteriores e resposta ao tratamento de afinação.

Relativamente à morte dos microrganismos existem diversas hipóteses formuladas para o sucedido desde: o efluente sintético ter sido adulterado, a água da torneira utilizada na alimentação estar contaminada, problemas no *air-lift* que por vezes ocorreram, e mesmo, algum problema associado à manutenção da instalação.

A empresa Alquímica pode futuramente testar os resultados obtidos, no tratamento de efluentes provenientes de águas industriais que contenham clorofenóis.

[9] Diário da República N.º 271 de 20/11/1998; Decreto-Lei n.º 334/99, I Série-A; pp. 6273-6275; 1999.

[10] EPA; "Ambient Water Quality Criteria for 2,4-Dichlorophenol"; 40, 5-60-042; 1989.

[11] Buschem; "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement"; 1.ª Edição; 1998.

[12] Gonçalves, M. L.; "Métodos Instrumentais para Análise de Águas"; Fundação Calouste de Gulbenkian; 3.ª Edição; 1996.

[13] Hoch Currency; Manual do Reactor de CQO Modelo 4500 (HACH); 1998.

[14] Herber, Guido A.; "Biomediação"; 2001; Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry.

[15] <http://chemed.chem.purdue.edu/analyticalreview/chronology/gc.htm>; e último acesso em 04/2003.

[16] <http://www.analisinstrumentsd.hugig.com.br>; último acesso em 11/2003.

## Bibliografia

- [1] Aksu, Zümriye; Yener, J.; **2001**; "A comparative adsorption/ biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents"; Waste Management; **21**: 695-702.
- [2] Alpendurada, Maria de F.; **2000**; "Solid-Phase Microextraction: a Promising Technique for Sample Preparation in Environmental Analysis"; Journal of Chromatography; **889**: 3-14.
- [3] Atuanya, E. I.; Purohit, H. J.; Chakrabarti, T.; **2000**; "Anaerobic and Aerobic Biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactors"; World Journal of Microbiology & Biotechnology **16**:95-98.
- [4] Brás, Isabel Paula Lopes; "Tratamento Terciário de Efluentes – Fixação de pesticidas organoclorados através de resíduos vegetais – tese de mestrado", FEUP; **1996**.
- [5] Brás, I. P.; Santos, L.; Alves, A.; **1998** ; "Organochloride Pesticides Removal by Pinus Bark Sorption", Environmental Science and Technology; **33**(4): 631-634.
- [6] Cassady, M. B.; Mullineers, H.; Trevors, J. T.; **1997**; "Mineralization of Pentachlorophenol in a Contaminated Soil by Pseudomonas sp UG30 Cells Encapsulated in k-carrageenan"; Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology; **19**: 43-48.
- [7] Dearden, J. C.; Calow, P.; Watts, C.; "Chemistry in Britain", **1994**.
- [8] Desmurs, J. R.; Ratton, S., "Chlorophenols"; **2000**; Kirk-Otmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- [9] Diário da República; Nº271 de 20/11/1999; Decreto-lei nº 506/99, I Série-A; pp. 8273-8275; **1999**.
- [10] EPA; "Ambient Water Quality Criteria for 2,4-Dichlorophenol"; 440, 5-80-042; **1980**.
- [11] Eurachem, "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement"; 1ª Edição; **1995**.
- [12] Gonçalves, M. L.; "Métodos Instrumentais para Análise de Soluções"; Fundação Calouste de Gulbenkian; 3ª Edição; **1996**.
- [13] Hach Company; *Manual do Reactor de CQO Modelo 45600 (HACH)*; **1995**.
- [14] Henke, Gustav A.; "Bioremediation"; **2001**; Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- [15] <http://chemed.chem.purdue.edu/analyticalreview/chromatography/gc.htm>; o último acesso em 04/ **2003**.
- [16] <http://www.analiseinstrumental.hpg.ig.com.br> ; último acesso em 11/ **2002**.

- [17] <http://www.sbg.org.br>; último acesso em 11/ **2002**.
- [18] Hugül, M.; Apak, R.; Demerci, S.; **2000**; "Modeling the Kinetics of UV/hydrogen Peroxide Oxidation of Some Mono-, Di-, and Trichlorophenols"; *Journal of Hazardous Materials*; **B77**: 193-208.
- [19] Kao, P. C.; Tzeng, J. H.; Huang, T. L.; **2000**; "Removal of Chlorophenols from Aqueous Solution by Fly Ash"; *Journal of Hazardous Materials*; **76**: 237-249.
- [20] Laine, M. M.; Jorgensen, K. S.; **1996**; "Straw Compost and Bioremediated Soil Inocula for the Bioremediation of Chlorophenol -contaminated Soil"; *Applied and Environmental Microbiology*"; **62**(5): 171-180.
- [21] Melin, E. S.; Puhakka, J. A.; Fergunson, J. F.; **1998**; "Enrichment and Operation Strategies for Polychlorophenol Degrading Microbial Cultures in an Aerobic Fluidized-bed Reactor"; *Water Environment Research*; **70**(2): 171-180.
- [22] Miller, J.C. e Miller, J.N.; "Statistics for Analytical Chemistry", Ellis Herwood Series in Analytical Chemistry; 2ª Edição; pp.44-48.
- [23] Muller, F; Caillard, L.; "Chlorophenols"; **2001**; *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- [24] Neto, Nuno Miguel Ratola; "Adsorção de Micropoluentes por Casca de Pinheiro – Estudo da interferência de metais pesados no processo de adsorção de pesticidas organoclorados - tese de mestrado", FEUP; **1998**.
- [25] Neves, H. J. ; Freitas, A. M. Costa; "Introdução à Cromatografia Gás-Líquido de Alta Resolução"; Dias de Sousa, Lda; 1ª Edição; **1996**.
- [26] Norma Portuguesa NP-2296; "Produtos Tensoactivos Aniónicos \_ Determinação da Biodegradabilidade – Ensaio de Confirmação"; **1988**.
- [27] Norme OCDE 303A; "Essai de Simulation – Traitement Aérobie des Eaux Usée: Essai d'Unités Couplés"; 12 de Maio de **1981**.
- [28] Pawliszyn, J.; "Solid Phase Microextraction – Theory and Practice", Wiley-VHC, **1997**.
- [29] Pombeiro, Armando J.; "Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial"; Fundação Calouste Gulbenkian; 2ª Edição; **1991**.
- [30] Prince, Roger C.; "Bioremediation"; **2000**; *Kirk-Otmer Encyclopedia of Chemical Technology*.

- [31] Queiroz, Sónia C. N.; Collins, Carol H.; Jardim, Isabel C. S. F.; **2001**; "Métodos de Extração e/ou Comparação de Compostos Encontrados em Fluidos Biológicos para Posterior Determinação Cromatográfica"; Química Nova; **24**(1): 68-76.
- [32] Ribeiro, António Manuel; "Poluentes Orgânicos em Lixiviados de Aterros Sanitários – tese de mestrado", FEUP; **2001**.
- [33] Sawyer, Clair N.; McCarthy, Perry L.; Parkin, Gene F.; "Chemistry for Environmental Engineering"; McGraw-Hill International Editions, Civil Engineering Series; 4ª Edição; **1994**.
- [34] "Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens-Vol.I"; 4ª Edição; pp. 826-828; **2002**.
- [35] Sousa, Sérgio Ricardo; "Implementação de uma Instalação Piloto para Tratamento de Águas Contaminadas com Pesticidas – tese de mestrado", FEUP; **1998**.
- [36] "Standards Methods for The Examination of Water and Wastewater"; 18ª Edição; Vol.1, pp.2-53 a 2-56 e 5-57 a 5-9; **1992**.
- [37] Steinle, P.; Stucki, G.; Stettler, R.; Hanselmann, K. W.; **1998**; "Aerobic Mineralization of "2,6-Dichlorophenol by *Ralstonia* sp. Strain RK1"; Applied and Environmental Microbiology; **64**(7): 2566-2571.
- [38] Svitel, Juraj; Miertus, Stanislav; **1998**; "Development of Tyrosinase – Based Biosensor and Its Application for monitoring of Biorremediation of Phenol and Phenolic Compounds", Environmental Science and Technology; **32**(6): 828-832.
- [39] Rosatto, S. S.; Freire, R. S.; Durán, Nelson; Kubota, L. T.; **2001**; "Biossensores Amperométricos para Determinação de Compostos Fenólicos de Amostras de Interesse Ambiental"; Química Nova; **24**(1): 77-86.
- [40] Valenzuela, J.; Bumann, U.; Céspedes, R.; Padilla, L.; González, B.; **1997**; "Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes uetrophus* JMP134 (pJP4) in Bleached Kraft Mill Effluent"; Applied and Environmental Microbiology, **63**(1): 227-232.

Anexo

## Anexo A - Regia de calibração

Neste Anexo vai ser apresentado o modo de preparação das soluções mãe e das soluções que foram utilizadas para a calibração, e também os resultados obtidos experimentalmente que serviram de base para o cálculo da relação de remoção.

### A.1 Preparação das soluções mãe e padrões

As soluções mãe utilizadas foram preparadas de seguinte modo:

→ Solução mãe de 100 mg/l (para) contendo 100 µl de 2,4-DCP: pesou-se 10,0 mg de 2,4-DCP e diluiu-se em propileno, num bulbo volumétrico de 25 ml.

$$M_1 = \frac{10,0 \text{ mg (2,4-DCP)}}{0,025 \text{ l (propileno)}} = 400 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

→ Solução mãe de 5 mg/l (para) contendo 50 µl de 2,4-DCP: retirou-se da solução mãe  $M_1$  de 2,4-DCP um volume de 0,250 ml e diluiu-se em propileno, num bulbo volumétrico de 25 ml.

# ANEXOS

→ Solução mãe de 1000 mg/l (para) contendo 1000 µl de 2,4,6-TCP: pesou-se 25,2 mg de 2,4,6-TCP e diluiu-se em propileno, num bulbo volumétrico de 25 ml.

$$M_1 = \frac{25,2 \text{ mg (2,4,6-TCP)}}{0,025 \text{ l (propileno)}} = 1008 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

→ Solução mãe de 5 mg/l (para) contendo 50 µl de 2,4,6-TCP: retirou-se da solução mãe  $M_1$  de 2,4,6-TCP um volume de 0,250 ml e diluiu-se em propileno, num bulbo volumétrico de 25 ml.

$$M_2 = \frac{0,100 \text{ l } (M_1) \times 1008 \frac{\text{mg}}{\text{l}} (M_1)}{0,025 \text{ l (propileno)}} = 5,04 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$



## Anexo A - Recta de calibração

Neste Anexo vai ser apresentado o modo de preparação das soluções mãe e dos padrões que foram utilizados para o cálculo da recta de calibração, e também os resultados obtidos experimentalmente que serviram de base para o cálculo da referida recta.

### A.1 Preparação das soluções mãe e padrões

As soluções mãe utilizadas foram preparadas do seguinte modo:

➤ Solução mãe de 500 mg/l (ppm) aproximadamente (**M<sub>1</sub>**) de 2,4-DCP: pesou-se 13,5 mg de 2,4-DCP e diluiu-se em isopropanol, num balão volumétrico de 25 ml.

$$M_1 = \frac{13,5\text{mg}(2,4 \cdot \text{DCP})}{0,025\text{l}(\text{Isopropanol})} = 540 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

➤ Solução mãe de 5 mg/l (ppm) aproximadamente (**M<sub>2</sub>**) de 2,4-DCP: retirou-se da solução mãe M<sub>1</sub> de 2,4-DCP, um volume de 0,250 ml e diluiu-se em isopropanol, num balão volumétrico de 25 ml.

$$M_2 = \frac{0,250\text{ml}(M_1) \times 540 \frac{\text{mg}}{\text{l}} (M_1)}{0,025\text{l}(\text{Isopropanol})} = 5,40 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

➤ Solução mãe de 1000 mg/l (ppm) aproximadamente (**M<sub>1</sub>'**) de 2,4,6-TCP: pesou-se 25,2 mg de 2,4,6-TCP e diluiu-se em isopropanol, num balão volumétrico de 25 ml.

$$M_1' = \frac{25,22\text{mg}(2,4,6 \cdot \text{TCP})}{0,025\text{l}(\text{Isopropanol})} = 1008 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

➤ Solução mãe de 5 mg/l (ppm) aproximadamente (**M<sub>2</sub>'**) de 2,4,6-TCP: retirou-se da solução mãe M<sub>1</sub> de 2,4,6-TCP, um volume de 0,250 ml e diluiu-se em isopropanol, num balão volumétrico de 25 ml.

$$M_2' = \frac{0,100\mu\text{l}(M_1) \times 1008 \frac{\text{mg}}{\text{l}} (M_1)}{0,020\text{l}(\text{Isopropanol})} = 5,04 \frac{\text{mg}}{\text{l}}$$

A partir das soluções mãe  $M_2$  e  $M_2'$ , foram preparados os padrões em água destilada, em balões volumétricos de capacidade de 25 ml, para extracção por SPME. Na Tabela A.1 encontram-se os volumes utilizados das soluções mãe  $M_2$  e  $M_2'$  para a preparação dos padrões. Foi utilizado o método de padrão interno, sendo este o 2,4,6-TCP, no qual a sua concentração é sempre igual a 5 ppb, por este motivo o volume a retirar da solução mãe respectiva é sempre igual.

**TABELA A.1** – Volumes utilizados na preparação dos padrões de 2,4-DCP.

Concentração do padrão (ppb)	Concentração real ( $\mu\text{g/l}$ )	Volume a retirar da solução mãe $M_2$ ( $\mu\text{l}$ )	Volume a retirar da solução mãe $M_2'$ ( $\mu\text{l}$ )
5	5,4	25	25
10	10,8	50	25
20	21,6	100	25
40	43,2	200	25
60	64,8	300	25
80	86,4	400	25

Transferiu-se o conteúdo do balão volumétrico respectivo para um frasco de vidro escuro de capacidade de 30 ml, adicionando de seguida 1 ml de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado e 6,42 g de sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). De seguida, a solução foi agitada devidamente num vortex, de modo a não existir cristalização e também, originar uma boa homogeneização da mesma. Procedeu-se de igual maneira para todos os padrões.

## **A.2 Resultados obtidos na quantificação dos padrões de 2,4-DCP**

Na Tabela A.2 apresentam-se os resultados obtidos na quantificação dos padrões de 2,4-DCP, efectuados por cromatografia gasosa. Os valores apresentados das extracções correspondem à razão das áreas entre o 2,4-DCP e o 2,4,6-TCP, respectivamente.

**Tabela A.2** – Valores das razões das áreas obtidas na quantificação dos padrões de 2,4-DCP, utilizando o método de padrão interno (2,4,6-TCP) e coeficientes de variação correspondentes.

Padrão (ppb)	Razão das áreas			Média	Desvio Padrão	CV (%)
	Extracção 1	Extracção 2	Extracção 3			
5	0,0225	0,0224	0,0228	0,0225	0,0002	0,89
10	0,0469	0,0497	0,0571	0,0512	0,0053	10,28
20	0,1102	0,1238	0,1129	0,1156	0,0072	6,21
40	0,2754	0,3016	0,2256	0,2675	0,0386	14,44
60	0,5618	0,3669	0,4728	0,4671	0,0976	20,89
80	0,8232	0,5911	0,4530	0,6224	0,1871	30,05

A recta de calibração obtida foi:

$$Y = 0,0075X - 0,0344 \quad (\text{eq.A1})$$

onde o **Y** representa a razão das áreas e **X** a concentração de 2,4-DCP.

Para o estudo da linearidade foram calculados diversos parâmetros, segundo Miller:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{\text{calc}})^2}{N - 2}} \quad (\text{eq.A2})$$

sendo  $S_{y/x}$  o parâmetro estatístico;  $y_i$  os valores da razão das áreas obtidos experimentalmente;  $y_{\text{calc}}$  os valores da razão das áreas calculados, para cada valor de  $x$ , tendo como base o ajuste linear efectuado; e, **N** o número de pontos experimentais.

Os valores a seguir apresentados na Tabela A.3 foram determinados pelas equações (eq.A3) e (eq.A4):

$$y_{\text{calc}} = 0,0075x_i - 0,0344 \quad (\text{eq.A3})$$

$$s_{x0} = \frac{S_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - y_{\text{medio}})^2}{b^2 \times \sum_{i=1}^N (x_i - x_{\text{medio}})^2}} \quad (\text{eq.A4})$$

onde **b** é o declive da recta de calibração e **n** o número de ensaios efectuados para cada padrão preparado.

**Tabela A.3** – Parâmetros determinados para o estudo da linearidade da resposta do detector ECD do GC.

Padrão (ppb)	$x_i$	$x_i^2$	$y_i$	$y_{calc}$	$(y_i - y_{calc})^2$	$(x_i - x_{médio})^2$	$S_{x0}$
5	5,40	29,20	0,0225	0,0064	2,62E-04	1108,9	1,9
10	10,80	116,6	0,0512	0,0471	1,70E-05	778,4	1,8
20	21,60	466,6	0,1156	0,1287	1,70E-04	292,4	1,7
40	43,20	1866,2	0,2675	0,2917	5,86E-04	20,3	1,6
60	64,80	4199	0,4671	0,4548	1,52E-04	681,2	1,9
80	86,40	7465	0,6224	0,6179	2,09E-05	2275	2,2

O desvio padrão para o declive (**b**) é determinado do seguinte modo:

$$s_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - x_{médio})^2}} \quad (\text{eq.A5})$$

sendo  $x_i$  o valor de concentração do padrão; e,  $x_{médio}$  o valor médio da concentração.

O valor do desvio padrão da ordenada na origem (**a**) é calculado através:

$$s_a = \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{N \times \sum_i (x_i - x_{médio})^2}} \quad (\text{eq.A6})$$

Para o cálculo dos parâmetros descritos pelas (eq.A2), (eq.A5) e (eq.A6), utilizou-se um nível de confiança de 95 %. Os resultados obtidos encontram-se na seguinte tabela.

**Tabela A.4** – Parâmetros de estudo da linearidade, calculados para um nível de confiança de 95%.

N	$t_{student}$	$S_{y/x}$	$S_b$	$S_a$
6	2,776	0,0174	0,0002	0,0118

Os intervalos de confiança foram baseados nas seguintes equações:

$$IC_b = t_{student} \times S_b \quad (\text{eq.A7})$$

$$IC_a = t_{student} \times S_a \quad (\text{eq.A8})$$

sendo  $IC_b$  o intervalo de confiança do declive (**b**) e  $IC_a$  o intervalo de confiança da ordenada na origem (**a**). Na Tabela A.5 encontram-se os intervalos de confiança respectivos, ao declive e à ordenada na origem, com o nível de confiança de 95 %.

**Tabela A.5** – Intervalos de confiança relativos ao declive e à ordenada na origem, com um nível de confiança de 95%.

Parâmetro	Inferior	Valor determinado	Superior
Declive (b)	0,0069	0,0075	0,0082
Ordenada na origem (a)	-0,0670	-0,0344	-0,0018

O limite de detecção do método, após substituição dos respectivos parâmetros na equação respectiva apresentada anteriormente no Capítulo 2, foi de:

$$LD = 4,669 \text{ ppb.}$$

## **Anexo B - Incerteza global do método**

Expõe-se neste anexo, as expressões e os resultados obtidos para cálculo das incertezas relativas, e por consequência a incerteza global do método.

### **B.1 Incerteza relativa associada à concentração obtida pela recta de calibração ( $U_{rc}$ )**

Para determinar esta incerteza, utiliza-se a seguinte equação (eq.B1):

$$U_{rc} = \left( \frac{s_{x0}}{x_0} \right) \quad (\text{eq.B1})$$

na qual  $U_{rc}$  é a incerteza associada à concentração obtida através da recta de calibração,  $s_{x0}$  é o desvio padrão da concentração e é calculado pela equação (eq.A4), e  $x_0$  a concentração calculada através da recta de calibração.

Na Tabela B.1 apresentam-se os valores obtidos para a incerteza relativa associada à concentração dos padrões utilizados e ao desvio padrão da concentração calculado, ambos a partir da recta de calibração.

**Tabela B.1** – Resultados obtidos do cálculo da incerteza relativa à concentração obtida pela recta de calibração.

<b>Padrão (ppb)</b>	<b><math>s_{x0}</math></b>	<b><math>U_{rc}</math></b>
5	1,9	0,354
10	1,8	0,171
20	1,7	0,080
40	1,6	0,038
60	1,9	0,029
80	2,2	0,026

**B.2 Incerteza relativa associada à preparação dos padrões ( $U_{pad}$ )**

Para poder calcular esta incerteza recorreu-se à seguinte equação:

$$U_{pad} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\Delta m_i}{m_i}\right)^2} \quad (\text{eq.B2})$$

sendo  $U_{pad}$  a incerteza relativa associada à preparação dos padrões,  $\Delta m_i$  o erro associado à medição de um determinado parâmetro e  $m_i$  o valor medido de um determinado parâmetro. Os parâmetros utilizados foram: a balança, as micropipetas e os balões volumétricos.

Os erros associados à preparação das soluções mãe do 2,4-DCP encontram-se na Tabela B.2.

**Tabela B.2** – Erros associados à preparação das soluções mãe do 2,4-DCP.

Solução mãe $M_1$	Balança		Balão volumétrico		Concentração (mg/l)	Incerteza
	Massa (g)	Incerteza	Volume (ml)	Incerteza		
	13,5	0,1	25	0,04		
Solução mãe $M_2$	Micropipeta		Balão volumétrico		Concentração (mg/l)	Incerteza
	Volume de $M_1$ ( $\mu$ l)	Incerteza	Volume (ml)	Incerteza		
	250	0,06667	25	0,04		

De referir que para o cálculo da incerteza da solução mãe  $M_2$ , a incerteza da solução mãe  $M_1$  também foi contabilizada, visto ter sido feita uma diluição a partir da mesma.

Na Tabela B.3 apresentam-se os erros associados aos padrões efectuados para a determinação da recta de calibração.

**Tabela B.3** – Erros associados à preparação dos padrões para a recta de calibração.

Padrões (ppb)	Solução mãe M2 (mg/ l)		Volume retirado de M2 ( $\mu$ l)		Balão volumétrico (ml)		Concentração real ( $\mu$ g/ l)	Incerteza
	Concentração	Incerteza	Volume	Incerteza	Volume	Incerteza		
5	5,40	0,1022	100	0,0070	100	0,10	5,4	0,01243
10	5,40	0,1022	100	0,0070	50	0,06	10,8	0,01244
20	5,40	0,1022	100	0,0070	25	0,04	21,6	0,01249
40	5,40	0,1022	200	0,0068	25	0,04	43,2	0,01237
60	5,40	0,1022	300	0,0066	25	0,04	64,8	0,01225
80	5,40	0,1022	400	0,0063	25	0,04	86,4	0,01213

A incerteza de preparação de todos os padrões considerou-se igual a 0,012, porque o desvio é insignificante.

### B.3 Incerteza relativa associada à precisão do método ( $U_p$ )

A incerteza associada à precisão foi calculada através dos resultados obtidos relativamente à reprodutibilidade. Foram analisados em seis dias diferentes, duas concentrações de 50 e 10 ppb, os resultados obtidos encontram-se a seguir tabelados.

**Tabela B.4** – Erros associados às incertezas relativas à precisão.

Concentração	50 ppb	10 ppb
Dia 1	59,72	22,46*
Dia 2	57,52	11,06
Dia 3	41,49	7,67
Dia 4	37,44	7,28
Dia 5	34,79	5,78
Dia 6	42,18	5,05
Concentração média	45,52	7,37
s	10,52	2,32
$U_p$	4,29	1,04
$U_p$	0,094	0,141
$U_p$ média (%)	11,8	

A incerteza associada à precisão ( $U_p$ ) é definida, segundo a *Eurochem*, pelas seguintes equações:

$$U_p = \left( \frac{u_p}{x_0} \right) \quad (\text{eqB.3})$$

em que:

$$u_p = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (\text{eqB.4})$$

sendo  $x_0$  o valor médio dos dados experimentais,  $s$  o desvio padrão, e  $N$  o número de dados experimentais.

Relativamente à chamada de atenção na Tabela B.4 com um \*, refere-se que para o cálculo da precisão este resultado obtido não foi validado devido à enorme discrepância dos restantes. Sendo assim são 5, o número de dados experimentais para a concentração de 10 ppb.

#### B.4 Incerteza relativa associada à exactidão do método ( $U_{ex}$ )

A incerteza associada à exactidão ( $U_{ex}$ ), segundo a *Eurochem*, é calculada através da seguinte equação:

$$U_{ex} = u_{ex} = \frac{[Max(\eta) - Min(\eta)]}{\sqrt{N} \times Média(\eta)} \quad (\text{eqB.5})$$

sendo  $\eta$  a eficiência do valor experimental obtido relativamente ao seu valor real.

A exactidão é um parâmetro bastante importante para analisar os resultados obtidos, sendo definida como a capacidade de recuperar um dado composto existente em solução, obtendo-se um resultado em termos de aproximação entre a média dos valores obtidos e o valor exacto.

A exactidão foi estimada através de ensaios de recuperação de padrões de 2,4-DCP com concentração conhecida e para obtenção dos valores experimentais, através do método de adição de padrão. As concentrações foram de 50 ppb e 10 ppb, utilizando spiked a 50 ppb e a 20 ppb (amostra + padrão).

$$\eta = \frac{\text{concentração}(\text{padrão} + \text{amostra})\text{obtida}}{\text{concentração}(\text{esperada})} \quad (\text{eqB.6})$$

Na Tabela B.5 encontram-se representados os valores obtidos para a Recuperação.

**Tabela B.5** – Valores obtidos da recuperação para as concentrações de 50 e 10 ppb.

Amostra	Recuperação obtida (%)	
	50 ppb	10 ppb
Dia 1	81,82	104,05
Dia 2	145,67	187,33
Dia 3	110,56	124,79
Dia 4	178,50	217,12
Dia 5	98,14	190,03
Dia 6	102,75	<b>298,26*</b>

\*Este valor obtido não entrou no cálculo da incerteza relativa à exactidão.

Na tabela B.6 apresentam-se os resultados calculados para os erros associados à exactidão.

**Tabela B.6** – Cálculo da incerteza relativa associada à recuperação (exactidão).

Concentração	50 ppb	10 ppb
Recuperação média (%)	119,58	164,66
s	35,79	47,89
U <sub>ex</sub>	0,330	0,307
U <sub>ex</sub> médio	0,319	

A incerteza média associada à exactidão é de 31,9%, para a determinação do 2,4-DCP.

### B.5 Incerteza global do método (U<sub>c</sub>)

A incerteza global pode ser calculada depois de determinadas as incertezas relativas. A incerteza combinada é estabelecida pela seguinte equação:

$$U_c = \sqrt{U_{rc}^2 + U_{pad}^2 + U_p^2 + U_{ex}^2} \quad (\text{eqB.7})$$

Na tabela B.7 encontram-se as incertezas relativas calculadas anteriormente e a respectiva incerteza combinada.

**Tabela B.7 – Incerteza global e relativas associadas à concentração (em %).**

<b>Concentração 2,4-DCP (µg/l)</b>	<b>U<sub>rc</sub> (%)</b>	<b>U<sub>pad</sub> (%)</b>	<b>U<sub>p</sub> (%)</b>	<b>U<sub>ex</sub> (%)</b>	<b>U<sub>c</sub> (%)</b>
5,4	35,4	1,2	11,8	31,9	<b>49,1</b>
10,8	17,1	1,2	11,8	31,9	<b>38,1</b>
21,6	8,0	1,2	11,8	31,9	<b>34,9</b>
43,2	3,8	1,2	11,8	31,9	<b>34,2</b>
64,8	2,9	1,2	11,8	31,9	<b>34,1</b>
86,4	2,6	1,2	11,8	31,9	<b>34,1</b>

## Anexo C – Densidade óptica

Neste anexo apresentam-se os valores medidos da densidade óptica (DO) a 610 nm, em absorvância, da biomassa existente no reactor biológico, em circuito fechado e aberto.

**Tabela C.1** – Valores medidos da DO (em absorvância) a 610nm, da biomassa existente no reactor biológico, em circuito fechado.

Reactor	Data	Dia	Hora	Tempo desde o início do processo (dias)	Densidade Óptica (Abs)
<b>Adição de 1000 ppb de 2,4-DCP</b>					
<b>Circuito Fechado</b>	19-Nov-02	0	12:00	0,00	0,008
	19-Nov-02	0	19:30	0,31	0,103
	20-Nov-02	1	11:30	0,98	0,216
	20-Nov-02	1	18:00	1,25	0,274
	21-Nov-02	2	10:50	1,95	0,189
	21-Nov-02	2	17:30	2,23	0,313
	22-Nov-02	3	9:30	2,90	0,241
	22-Nov-02	3	19:00	3,29	0,374
	23-Nov-02	4	14:15	4,09	0,383
	24-Nov-02	5	17:00	5,21	0,474
	25-Nov-02	6	11:00	5,96	0,519
	26-Nov-02	7	15:45	7,16	0,984
	27-Nov-02	8	12:00	8,00	1,113
	28-Nov-02	9	10:30	8,94	1,512
	29-Nov-02	10	16:15	10,18	1,558
	30-Nov-02	11	17:00	11,21	1,698
	02-Dez-02	13	11:00	12,96	2,140
	02-Dez-02	13	16:45	13,20	2,920

Na Tabela C.1 foram apresentados os valores da DO medidos em circuito fechado, na tabela seguinte apresentam-se os valores em circuito aberto. Em ambas as tabelas também se efectua uma relação entre data e hora com o tempo desde o início do processo.

**Tabela C.2** – Valores medidos da DO (em absorvância) a 610nm, da biomassa existente no reactor biológico, em circuito aberto.

Reactor	Data	Dia	Hora	Tempo desde o início do processo (dias)	Densidade Óptica (Abs)
	03-Dez-02	14	16:30	14,19	3,732
	04-Dez-02	15	19:00	15,29	3,270
	05-Dez-02	16	13:00	16,04	3,630
	06-Dez-02	17	10:15	16,93	3,660
	07-Dez-02	18	13:50	18,08	4,000
	09-Dez-02	20	13:10	20,05	4,490
	11-Dez-02	22	10:15	21,93	4,170
	13-Dez-02	24	11:45	23,99	4,750
	16-Dez-02	27	10:15	26,93	4,920
<b>Adição de 500 ppb de 2,4-DCP</b>					
Circuito Aberto	18-Dez-02	29	15:40	29,15	5,600
	20-Dez-02	31	11:00	30,96	5,500
	23-Dez-02	34	11:00	33,96	6,900
	27-Dez-02	38	11:30	37,98	5,640
	30-Dez-02	41	12:20	41,01	6,620
	31-Dez-02	42	10:30	41,94	5,250
	03-Jan-03	45	16:00	45,17	6,370
	06-Jan-03	48	15:30	48,15	5,760
	08-Jan-03	50	12:00	50,00	5,370
	10-Jan-03	52	15:30	52,15	5,480
	13-Jan-03	55	18:45	55,28	5,580
	15-Jan-03	57	10:00	56,92	5,310
	<b>Adição de 200 ppb de 2,4-DCP</b>				
	17-Jan-03	59	15:30	59,15	5,340
	20-Jan-03	62	15:10	62,13	5,130
	22-Jan-03	64	11:40	63,99	5,200

## Anexo D – Carência química em oxigénio

Apresentam-se os resultados obtidos, neste anexo, dos ensaios executados para determinar a CQO. Quando a instalação permaneceu em circuito fechado, apenas se recolheram as amostras à saída do decantador. Em circuito aberto, as amostras foram recolhidas à entrada do reactor e à saída do decantador.

**Tabela D.1** – Valores da CQO obtidos em circuito fechado à saída do decantador, nos respectivos dias após arranque da instalação.

Amostra Dia	CQO (mg O <sub>2</sub> /l) Saída
<b>Adição de 1000 ppb de 2,4-DCP</b>	
0	309,15
0	252,20
1	154,58
2	154,58
2	309,15
3	195,25
4	676,92
5	738,46
6	861,54
7	1200,0
8	1169,2
9	1353,8
10	1415,4
11	1230,8
12	1476,9
13	2153,8

**Tabela D.2** – Valores da CQO obtidos em circuito aberto, à entrada do reactor e à saída do decantador, e respectiva percentagem de remoção.

Amostra Dia	CQO (mg O <sub>2</sub> /l)		Remoção (%)
	Entrada	Saída	
14	271,06	124,24	54,17
15	248,47	158,12	36,36
16	248,47	169,41	31,82
17	248,47	146,82	40,91
18	259,76	146,82	43,48
20	215,17	33,10	84,62
22	198,62	66,21	66,67
24	165,52	49,66	70,00
27	182,07	33,10	81,82
<b>Adição de 500 ppb de 2,4-DCP</b>			
29	165,52	33,10	80,00
31	134,74	16,84	87,50
34	134,74	33,68	75,00
38	134,74	50,53	62,50
42	160,00	64,00	60,00
45	216,00	56,00	74,07
48	152,00	64,00	57,89
50	192,00	96,00	50,00
55	134,74	50,53	62,50
57	169,41	56,47	66,67
<b>Adição de 200 ppb de 2,4-DCP</b>			
59	197,65	65,88	66,67
62	176,84	42,11	76,19
64	151,58	84,21	44,44

**Anexo E – Remoção do 2,4-DCP**

Neste anexo ostentam-se os resultados obtidos da remoção do 2,4-DCP.

**Tabela E.1 –** Datas de recolha e análise das respectivas amostras.

<b>Amostra Dia</b>	<b>Data de recolha</b>	<b>Data de análise</b>
14	03-Dez-02	24-Dez-02
15	04-Dez-02	23-Dez-02
17	06-Dez-02	14-Mar-03
18	07-Dez-02	14-Mar-03
20	09-Dez-02	13-Mar-03
22	11-Dez-02	29-Jan-03
24	13-Dez-02	03-Fev-03
27	16-Dez-02	07-Fev-03
29	18-Dez-02	30-Dez-02
31	20-Dez-02	30-Dez-02
34	23-Dez-02	03-Jan-03
35	24-Dez-02	03-Jan-03
38	27-Dez-02	06-Jan-03
41	30-Dez-02	06-Jan-03
45	03-Jan-03	09-Jan-03
48	06-Jan-03	14-Jan-03
50	08-Jan-03	14-Jan-03
52	10-Jan-03	14-Jan-03
55	13-Jan-03	16-Jan-03
57	15-Jan-03	23-Jan-03
59	17-Jan-03	23-Jan-03
62	20-Jan-03	23-Jan-03
64	22-Jan-03	24-Fev-03

Na Tabela E.1 exibem-se as datas em que se efectuaram as recolhas e as respectivas datas de análise das amostras, com a instalação a funcionar em circuito aberto. Na tabela seguinte apresentam-se os valores das concentrações, à entrada do reactor e saída do decantador, e as correspondentes percentagens de remoção do 2,4-DCP.

**Tabela E.2** – Valores das concentrações que foram adicionadas e das analisadas, à entrada do reactor e à saída do decantador, e respectiva percentagem de remoção do 2,4-DCP.

Amostra dia	Concentração adicionada (ppb)	Factor de diluição	Concentração analisada (ppb)	Factor de diluição	Concentração analisada (ppb)	Remoção (%)
		Entrada do reactor		Saída do decantador		
14	1000	10%	823,90	10%	4,67	99,43%
15	1000	1%	1078,00	1%	247,56	77,04%
17	1000	10%	1164,31	1%	295,54	74,62%
18	1000	10%	1062,35	50%	302,64	71,51%
20	1000	10%	1026,84	50%	4,67	99,55%
22	1000	2%	1186,84	50%	4,67	99,61%
24	1000	2%	913,01	50%	4,67	99,49%
27	1000	2%	1237,58	50%	4,67	99,62%
29	500	10%	641,77	10%	4,67	99,27%
31	500	10%	624,03	10%	4,67	99,25%
34	500	10%	446,14	10%	4,67	98,95%
35	500	10%	412,82	10%	4,67	98,87%
38	500	10%	486,52	50%	184,55	62,07%
41	500	10%	425,68	50%	155,33	63,51%
45	500	10%	536,30	50%	273,64	48,98%
48	500	10%	745,10	50%	229,17	69,24%
50	500	10%	457,23	50%	147,93	67,65%
52	500	10%	434,32	50%	113,61	73,84%
55	500	10%	778,51	50%	91,92	88,19%
57	500	10%	533,97	50%	84,62	84,15%
59	200	10%	173,23	50%	17,21	90,07%
62	200	10%	156,24	50%	30,11	80,73%
64	200	10%	205,92	50%	38,32	81,39%

## Anexo F – Ensaio de evaporação

Foi efectuado um ensaio para avaliar a possível evaporação do 2,4-DCP. Na Tabela F.1 encontram-se os resultados obtidos à entrada do reactor e à saída do decantador, e também a respectiva média e desvio padrão. Os valores apresentados são as razões das áreas entre o 2,4-DCP e o 2,4,6-TCP.

**Tabela F.1** – Resultados obtidos nos ensaios de evaporação, à entrada do reactor e à saída do decantador.

Amostra	Razão das áreas			Média	s
Entrada do reactor	0,244	0,263	0,318	0,275	0,0384
Saída do decantador	0,244	0,256	0,240	0,247	0,0091

Para decidir se as amostras têm uma diferença significativa efectua-se o teste de hipóteses à diferença entre valores esperados, em que,  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ . Segundo Miller calcula-se o teste t através da seguinte equação:

$$t = \frac{(\text{média}(x_1) - \text{média}(x_2))}{s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad (\text{eqF.1})$$

onde  $x_1$  e  $x_2$  são as amostras,  $s$  é o desvio padrão, e,  $N_1$  e  $N_2$  são o número de pontos experimentais respectivos.

Para o cálculo de  $s$  utiliza-se a equação (eqF.2) que traduz a estimativa comum das variâncias:

$$s^2 = \frac{(N_1 - 1) \times s_1^2 + (N_2 - 1) \times s_2^2}{(N_1 + N_2 - 2)} \quad (\text{eqF.2})$$

em que o denominador da equação anterior indica os graus de liberdade.

Efectuando o respectivo cálculo, primeiro calcula-se  $s^2$  pela equação (eqF.2), obtendo-se de seguida o respectivo  $s$ :

Anexos

---

$$s^2 = \frac{(3-1) \times 0,0384^2 + (3-1) \times 0,0091^2}{(3+3-2)} = 0,0008$$

em que  $s$  é igual a 0,0279. Através da equação (eqF.1) calcula-se  $t$ , após substituição do  $s$ :

$$t = \frac{(0,275 - 0,247)}{0,0279 \times \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{3}}} = 1,22$$

Para 4 graus de liberdade, o valor de  $t$  crítico é igual a 2,78. Como o módulo do valor de  $t$  obtido experimentalmente é menor que o crítico ( $1,22 < 2,78$ ) a diferença entre as médias não é significativa! Assim sendo a hipótese é validade com uma significância de 5 %.

É conveniente para um conceito não sempre para a seguir, mas para que nos ajuda.

(Atividade 1)

Não é suficiente saber que a hipótese é válida, mas é suficiente saber que a hipótese é válida.

Atividade

*É conveniente pedir um conselho; nem sempre para o seguir, mas para que nos ilumine.*

*(M.me Swetchine)*

*Não é suficiente saber: deve-se também aplicar. Não é suficiente querer: deve-se também fazer.*

*(Goethe)*



EDUCAÇÃO  
**prodepIII**

*Mais Educação*



UNIÃO EUROPEIA  
Fundo Social Europeu

**Nome:** Ana Maria Fernandes Pereira Polidoro

**Curso:** Eng. Química

**Datas:** 9/1/2002 a 2/28/2003

**Tema:** Remoção de compostos prioritários e efluentes

**Empresa:** Alquímica - Química Industrial, Lda

**Concurso:** 306/012-03 – PRODEPII – Medida 3/Ação 3.2 - Estágios



FACULDADE DE ENGENHARIA  
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000088389