



Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP



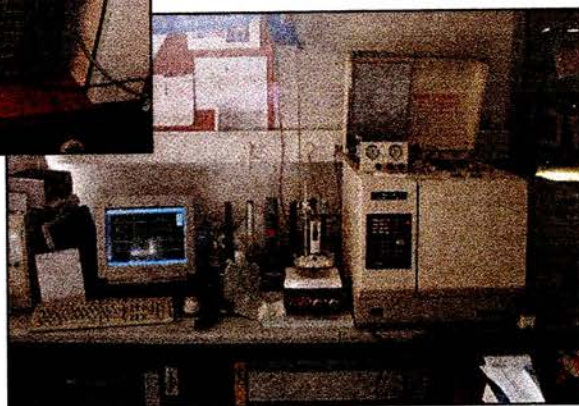
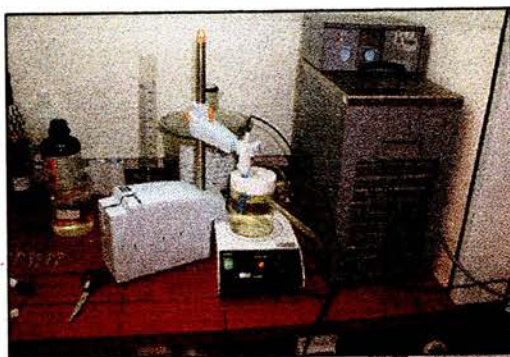
AlQuímica
Tecnologia Química e Ambiental



Relatório de Estágio PRODEP III
2003/2004

Degradação de clorofenóis

Oxidação com reagente de Fenton



Rodolfo Ulisses Ribeiro de Oliveira
sob orientação da Doutora Lúcia Santos (DEQ-FEUP)
e da Eng.^a Maria João Archer (Alquímica)

Porto, Março de 04

66(047.3)
LEQ 2003/OLIr





Universidade do Porto
Faculdade de Engenharia
FEUP



Relatório de Estágio PRODEP III
2003/2004

Degradação de clorofenóis

Oxidação com reagente de Fenton



Rodolfo Ulisses Ribeiro de Oliveira
sob orientação da Doutora Lúcia Santos (DEQ-FEUP)
e da Eng.^a Maria João Archer (Alquímica)

Porto, Março de 04



66(247.3)/Lt 9 2003/0152

Universidade do Porto	
Faculdade de Engenharia	
Biblioteca 1	
Nº	91309
CDU	66(247.3)
Data	22/08/2007

Agradecimentos

No término deste projecto gostaria de agradecer à Dra. Lúcia Santos e ao Prof. Luís Madeira pelo apoio, amizade e disponibilidade que demonstraram, no sentido de realizar o trabalho da melhor forma possível.

Ao Helder Ribeiro e à Isabel Martins, companheiros de trabalho, sem os quais a realização do projecto não seria possível.

Aos meus colegas de laboratório, José Luís Moreira e Nuno Ratola pelo incentivo, apoio e auxílio prestado ao longo de todo o projecto.

A todos que me ensinaram e auxiliaram nas mais diversas formas, o meu sincero obrigado.

Resumo

O trabalho desenvolvido teve como objectivo o estudo da degradação de clorofenóis, nomeadamente o 2,4-diclorofenol (2,4-DCP), que são considerados poluentes prioritários devido à sua elevada toxicidade, propriedades mutagénicas e carcinogénicas. Devido à sua persistência no meio ambiente, mesmo a baixas concentrações, o impacto causado pelo clorofenóis é considerável surgindo por isso a necessidade de promover sistemas que reduzam e/ou eliminem estes pesticidas com eficiência.

O processo com reagente de Fenton consiste em tratar uma solução do poluente a analisar com uma mistura de Ferro e peróxido de oxigénio. A oxidação reduz frequentemente a toxicidade aos níveis aceitáveis. Para obter resultados satisfatórios é necessário ter em conta diversos factores, tais como pH, temperatura e quantidades relativas de reagentes a utilizar, nomeadamente do catalizador (ferro) e de oxidante (peróxido). Foi delineado um planeamento de experiências recorrendo a um *software* apropriado, de modo a obter as condições óptimas para degradação do 2,4-DCP. Consistiu em cerca de 13 ensaios com diferentes valores de temperatura, concentrações de ferro e peróxido. Os resultados obtidos foram ajustados a um modelo polinomial, podendo concluir-se da influência de cada parâmetro durante as experiências.

Os ensaios realizados decorreram a pH 3,5, temperaturas entre 20 °C e 40 °C com razões molares de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$ 50:1 a 100:1 (mol/mol). A concentração inicial do poluente foi mantida constante em todos os ensaios. Nas condições óptimas obteve-se cerca de 99% de remoção do clorofenol em apenas 20 minutos. O limite legal imposto de 20 µg/l foi atingido durante o tempo em que as experiências decorreram (≈3 horas), excepto em dois ensaios. Através do ajuste polinomial pode-se concluir que, na gama estudada, a degradação aumenta com a quantidade de catalisador introduzida no sistema, e que para o oxidante e para a temperatura existe um valor óptimo que permite melhorar a eficácia do sistema.

Os resultados obtidos nestas experiências são promissores no sentido de utilizar este sistema, em escala industrial, na descontaminação de efluentes reais contendo diversos poluentes, podendo estender-se a outros compostos com interesse ambiental, nomeadamente o PCP (Pentaclorofenol).

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Objectivos	2
3. ALQUÍMICA – Química Industrial Lda	3
4. Introdução teórica	4
4.1. Os clorofenóis	4
4.1.1. Propriedades físicas	5
4.1.2. Efeitos na saúde e no ambiente	6
4.1.3. Limites legais	7
4.1.4. 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)	7
4.2. Oxidação com reagente de Fenton	8
4.2.1 Efeito da dosagem do ferro	8
4.2.2. Efeito da dosagem de H ₂ O ₂	9
4.2.3 Efeito da temperatura	9
4.2.4. Efeito do pH	10
4.2.5. Efeito do tempo de reacção:	11
4.2.6. Vantagens e desvantagens do método	11
4.3. Análise de clorofenóis	11
4.3.1. Técnicas de preparação das amostras	12
4.3.1.1. Descrição da técnica de SPME	12
4.3.1.1.1. Selecção do tipo de fibra	13
4.3.1.1.2. Modo de extracção	14
4.3.1.1.3. Tempo e temperatura de extracção	15
4.3.1.1.4. Tempo e temperatura de dessorção	15
4.3.1.1.5. Adição de sal e/ou alteração do pH	15
4.3.1.1.6. Agitação da amostra	15
4.3.1.1.7. Análise cromatográfica	16
4.4. Planeamento estatístico de experiências	18
5. Procedimento experimental	19
5.1. Oxidação com reagente Fenton	19
5.1.1. Padrões e Reagentes	19
5.1.2. Instalação	19

5.1.3. Procedimento	21
5.2. Quantificação do 2,4-DCP	22
5.2.1. Extracção e pré-concentração por SPME	23
5.2.2. Análise por GC-ECD	24
5.3. Ensaaios de validação do método	25
5.3.1. Linearidade	25
5.3.2. Precisão	26
5.3.3. Exactidão	26
6. Resultados e discussão	27
6.1. Ensaaios preliminares	27
6.2. Validação do método analítico	27
6.2.1. Linearidade	27
6.2.2. Precisão	28
6.2.3. Exactidão	29
6.2.4. Incerteza global	29
6.3. Oxidação com reagente Fenton	31
6.3.1. Ensaaios preliminares	31
6.3.2. Design of experiments (DOE)	32
7. Conclusões	37
8. Sugestões futuras	38
9. Bibliografia	39
Anexo A – Ensaaios Preliminares – Determinação do pH óptimo	42
ANEXO B – Fundamento teórico e cálculos intermédios referentes ao estudo estatístico da linearidade	44
ANEXO C – Fundamento teórico e cálculos intermédios na determinação da incerteza global do método	48
Anexo D – Oxidação com reagente de Fenton – Exemplo de Cálculo	52

1. Abreviaturas

2,4-DCP	Diclorofenol
CP's	Clorofenóis
CQO	Carência química de oxigénio
DOE	<i>Design of Experiments</i>
ECD	Detector de captura de electrões
EDP	Electricidade de Portugal
GC	Cromatógrafo Gasoso
GPE	Extracção em fase gasosa
HRGC	Cromatografia gasosa de alta resolução
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
LLE	Extracção líquido-líquido
PCP	Pentaclorofenol
SPME	Micro extracção em fase sólida
UE	União Europeia
US-EPA	Agência de Protecção Ambiental dos EUA

2. Objectivos

Este projecto apresentou como objectivos testar e implementar um sistema de degradação por oxidação com reagente de Fenton, analisando o seu efeito sobre o 2,4-DCP. Optimizar o processo em termos de condições operatórias (pH e temperatura), e em termos de concentrações dos reagentes a utilizar, nomeadamente FeSO_4 e H_2O_2 , fazendo uso de um *software* apropriado (*JMP, The Statistical Discovery Software*) [29] para o planeamento de experiências. Analisar a importância das diferentes variáveis envolvidas no processo e traduzir os resultados obtidos através de um modelo polinomial, permitindo analisar a degradação do poluente em função da temperatura e/ou da quantidade de reagentes.

3. ALQUÍMICA – Química Industrial Lda ^[1]

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

A ALQUÍMICA possui um quadro de técnicos com qualificações superiores em engenharia química e do ambiente, em ciências químicas, em informática e em engenharia e gestão da qualidade industrial; e uma rede de consultores em diversos ramos da engenharia, em economia e em direito industrial e ambiental.

ALQUÍMICA é representante exclusivo em Portugal da empresa italiana CTIDA, especializada no fabrico de instalações compactas e automatizadas para o tratamento de pequenos e médios caudais de águas residuais altamente contaminadas, através de um processo físico-químico monoestádio, patenteado, que utiliza produtos de acção desemulsionante-adsorvente, em pó, de base bentonítica. Com um grande número de unidades instaladas em Itália e noutros países europeus, a CTIDA atingiu já um nível de excelência na qualidade dos modelos que fabrica (trata-se de uma empresa certificada pela norma ISO 9001).

A CTIDA está integrada no grupo de empresas da ENEL (equivalente à EDP, Electricidade de Portugal) formando a Enel.Hydro. A Enel.Hydro, líder do mercado da água em Itália, cobre todo o ciclo da água nesse país, desde a captação, passando à adução, potabilização, distribuição e finalmente ao tratamento de águas residuais. Assim, a CTIDA possui um conjunto diverso de técnicos, capazes de responder às mais diversas solicitações no que concerne à problemática da água.



Figura 1. Alquímica - Instalações

4. Introdução teórica

A qualidade ambiental é uma das principais preocupações da humanidade. À medida que a população do nosso planeta continua a crescer a velocidades alarmantes assiste-se a um aumento da contaminação do meio ambiente e a uma crescente degradação de grande parte dos seus recursos naturais. Efectivamente as indústrias químicas colocam anualmente no mercado cerca de mil novos produtos, ignorando, na grande maioria das vezes, a toxicidade dos mesmos. 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 elevada toxicidade. Podem estar presentes nas actividades de produção de: herbicidas, insecticidas, fungicidas, retardadores de chama, plásticos, corantes, tintas, antioxidantes, polímeros sintéticos, resinas, pesticidas, desinfectantes, óleos e principalmente no fabrico de papel e celulose [2,26]. É neste contexto essencial o estudo, desenvolvimento e implantação de técnicas de remoção e/ou degradação destes compostos, não só tendo em vista a qualidade ambiental como também o inevitável (e necessário) progresso industrial.

4.1. Os clorofenóis

Os clorofenóis são uma classe de compostos orgânicos semi-voláteis produzidos geralmente por síntese química. A sua fórmula estrutural, representada esquematicamente na Figura 2 é composta por um anel benzénico ligado a um grupo hidroxilo (fenol) com um número variável de um a cinco átomos de cloro, situados entre as posições 2 a 6.

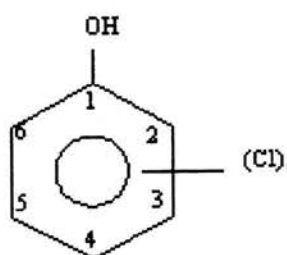


Figura 2. Fórmula estrutural genérica de um clorofenol

A estabilidade destes compostos é conseguida pelo anel clorado enquanto o grupo hidróxilo favorece a sua degradação biológica [25].

4.1.1. Propriedades físicas

Nas tabelas 1 e 2 apresentam-se importantes propriedades físicas e químicas dos clorofenóis. Todos os CP's possuem um odor característico forte [19,32] e concedem um gosto fortemente desagradável à água. São sólidos à temperatura ambiente, excepto o 2-CP, ligeiramente solúveis em água mas altamente solúveis em álcoois [9,19] e possuem a particularidade de não se decomporem quando aquecidos até ao seu ponto de ebulição [25].

Tabela 1. Propriedades físicas dos clorofenóis [9,19].

Composto	Fórmula	MM (g/mol)	p.f. (°C)	p.e. (°C)	pKa	
					água ^a	metanol/água ^b
2-CP	C ₆ H ₅ ClO	128,56	8,7	174,5	8,52	9,13
3-CP	C ₆ H ₅ ClO	128,56	32,8	216	8,97	9,53
4-CP	C ₆ H ₅ ClO	128,56	42,8	217	9,37	9,70
2,3-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	58	206	7,71	8,52
2,4-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	45	210	7,90	8,51
2,5-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	59	210	7,51	7,69
2,6-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	66	220	6,78	7,15
3,4-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	65	253	8,62	8,87
3,5-DCP	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	68	233	8,25	8,54
2,3,5-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	62	248-249	6,43 ^c	6,62
2,4,5-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	68	245-246	6,72	7,20
2,4,6-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	68	246	5,99	6,51
2,3,4-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	83,5	sublima	6,97	7,34
3,4,5-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	101	275	7,55	7,57
2,3,6-TCP	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	101	272	5,80	6,10
2,3,5,6-TeCP	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231,89	115	sublima	5,03	5,76
2,3,4,6-TeCP	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231,89	69-70	164 (3 kPa)	5,22	5,53
2,3,4,5-TeCP	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231,89	116-117	sublima	5,64	5,92
PCP	C ₆ HCl ₅ O	266,34	190	309-310	4,74	4,93

^a à temperatura de 25 °C

^b 60% CH₃OH/40% H₂O a 20 °C

^c referência [9]

Tabela 2. Propriedades físicas dos clorofenóis mais importantes [19].

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 ⁻¹ K ⁻¹	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 (<i>closed cup</i>), °C	121	84	113			

4.1.2. Efeitos na saúde e no ambiente

Devido à sua toxicidade os clorofenóis têm tendência a acumular-se nos sedimentos bem como nos organismos presentes em meios aquáticos, vítimas directas da contaminação das águas, permanecendo assim ao longo da cadeia alimentar [36].

Nos animais, os principais sintomas dos CP's, em doses letais, são efeitos ao nível do sistema nervoso bem como irritação da pele e olhos. A longo prazo, elevadas concentrações de CP's produzem efeitos adversos ao nível de fígado e rins [13].

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 [13].

Actualmente, a sua utilização e fabrico tende a ser cada vez mais restrito uma vez que são compostos muito tóxicos e têm elevado potencial cancerígeno para o organismo humano.

4.1.3. Limites legais

Devido à sua elevada toxicidade, propriedades mutagénicas e cancerígenas [3], os clorofenóis são considerados poluentes prioritários tanto pela União Europeia (UE) como pela Agência de Protecção Ambiental dos EUA (US-EPA). Em Portugal o limite máximo situa-se em 20 µg/l para o 2,4-DCP [8].

4.1.4. 2,4-diclorofenol (2,4-DCP)

O 2,4-DCP é um fenol substituído cuja estrutura se apresenta na Figura 3.

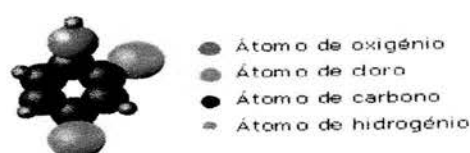


Figura 3. Estrutura molecular do 2,4-DCP.

Este composto é ligeiramente solúvel em água a pH neutro mas muito solúvel em soluções alcalinas dissolvendo-se rapidamente em benzeno e etanol [33].

O 2,4-DCP é utilizado globalmente no fabrico de produtos industriais e agrícolas. Como um intermediário na indústria química, o 2,4-DCP está presente em larga escala como matéria-prima na produção do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (herbicida) e seus derivados, pentaclorofenol (conservante da madeira) e em determinados compostos de metilo utilizados como anti-sépticos e desinfectantes de sementes [33,34] .

O 2,4-DCP pode ser libertado para o ambiente na forma de efluentes contaminados pelo seu processo de fabrico e uso como intermediários químicos ou por processos de coloração no tratamento de águas. A libertação deste composto para o meio ambiente pode ainda ocorrer através de vários processos de incineração ou através do metabolismo de diversos pesticidas no solo. Quando libertado para a atmosfera pode sofrer fotodecomposição e a sua remoção física da atmosfera pode ocorrer por intermédio de pluviosidade. No solo, a sua remoção é possível por recurso a lixiviação moderada a lenta. Diversos estudos sobre biodegradação demonstraram que o 2,4-DCP sofre biodegradação em condições aeróbias e anaeróbias tanto no solo como em meio aquoso [34].

Sendo o 2,4-DCP um composto nocivo para a saúde humana, o seu manuseamento laboratorial e industrial, deve ser acompanhado de precauções especiais. Deste modo, deve-se trabalhar sempre em *Hotte* com ventilação, usar-se óculos e luvas de protecção bem como vestuário apropriado (quando justificado). Se, por acidente, entrar em contacto com a pele ou os olhos, deve lavar-se abundantemente com água tépida.

4.2. Oxidação com reagente de Fenton

A oxidação química com peróxido de hidrogénio uma tecnologia em estudo para a remoção de muitos dos poluentes prioritários em águas residuais. A oxidação parcial reduz frequentemente a toxicidade aos níveis aceitáveis, e remove significativamente os compostos em questão.

No início de 1890, Fenton descobriu que o peróxido de hidrogénio, quando misturado com o sulfato ferroso, reagia com compostos orgânicos. Os investigadores subsequentes descobriram que se tratava de uma reacção radical-livre complexa. No caso do reagente de Fenton, o radical livre inicial é $\text{HO}^\bullet$ [15,22,30,31,35], altamente oxidante e capaz de reagir com praticamente todas as classes de compostos orgânicos e inorgânicos:



Sendo o Fe(II) o catalisador da reacção, é importante que este exista em quantidade suficiente no meio reaccional ou, por outro lado, que vá sendo regenerado a uma velocidade suficiente (o que pode ocorrer por uma série de reacções) [35].

No processo Foto-Fenton ($\text{UV/Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$) produzem-se radicais hidroxilo na presença de radiação segundo a equação (2) em simultâneo com os produzidos segundo a equação (1) [12,14,17,28,30].



A fotólise necessita de baixos comprimentos de onda de UV, de elevada intensidade e de oxidantes químicos como o ozono e o H_2O_2 para que o tratamento seja eficaz [7].

4.2.1 Efeito da dosagem do ferro

De um modo geral o catalisador apresenta-se sobre a forma de FeSO_4 . Na degradação de 4-CP e 2,4-DCP com reagente de Fenton a taxa de deterioração destes

compostos aumenta geralmente com a concentração inicial de ferro [6,22,35]. No entanto um excesso de ferro pode igualmente consumir os radicais hidroxilo, prejudicando o processo. Existe assim uma gama óptima para a quantidade de catalisador a utilizar, que coloca em contraponto a eficiência do método e o custo do reagente. Essa quantidade está geralmente relacionada com a dosagem de peróxido. Pera-Titus [22] trabalha com razões H_2O_2/Fe^{2+} de 3:1 a 750:1 e 2,4-DCP/ H_2O_2 de aproximadamente 0,1:1 (mol/mol) para a degradação de clorofenóis. Para a US Peroxide [35] razões típicas H_2O_2/Fe^{2+} situam-se entre 8:1 e 40:1 (mol/mol). No entanto estes valores não são independentes do tipo de poluente a tratar e valores óptimos são específicos de cada composto.

4.2.2. Efeito da dosagem de H_2O_2

A concentração de H_2O_2 em solução é igualmente importante uma vez que é esta espécie que fornece iões hidroxilo à solução. É necessário atingir uma concentração de H_2O_2 elevada para que haja um decréscimo acentuado da toxicidade das águas residuais.

Numa aplicação típica, a seguinte série de reacções pode ocorrer:



Cada transformação tem a sua própria velocidade, sendo que pode ocorrer a formação de um intermediário não desejável que requerem adições de peróxido suficientes para que a reacção avance para além desse ponto. Como consequência, adicionando peróxido continuamente ao sistema, a carência química de oxigénio (CQO) diminui mas os níveis de toxicidade podem permanecer inalterados ou com alterações mínimas, até que com sucessivas adições novo intermediário se obtenha [35]. Quando a concentração inicial de peróxido aumenta, a degradação de clorofenóis também aumenta, porque a quantidade de oxidante presente no sistema é maior que a concentração inicial de poluente e ferro. No entanto, um excesso de reagente pode igualmente ser prejudicial, pois pode dar origem a reacções parasitas de consumo de radicais hidroxilo, responsáveis pela oxidação. Quando a reacção evolui e o peróxido deixa de estar em excesso, a decomposição do clorofenol diminui [22].

4.2.3 Efeito da temperatura

A velocidade da reacção com reagente de Fenton aumenta com o aumento da temperatura, com o efeito pronunciado em temperaturas abaixo dos 20 °C. No entanto ,

quando as temperaturas aumentam acima de 40-50 °C, a eficiência da utilização de H_2O_2 é reduzida [22,35]. Isto é devido à decomposição acelerada do peróxido em oxigénio e água. Podemos afirmar que, na prática, a maioria de aplicações comerciais do reagente de Fenton ocorrem a temperaturas entre 20-40 °C.

As experiências com este método podem requerer adições controladas ou sequenciais de H_2O_2 para moderar a ascensão na temperatura que ocorre enquanto a reacção prossegue. Isto deve esperar-se quando os doses de peróxido excedem a gama 10-20 g/l. Moderar a temperatura é importante não somente para razões económicas, mas para razões de segurança também [35].

4.2.4. Efeito do pH

O pH óptimo situa-se entre 3 e 6. A queda de eficiência quando se opera em meio alcalinos é atribuída à influência negativa do ião ferro. Para pH superior a 6 o ferro catalisa a decomposição do peróxido em água e oxigénio, não ocorrendo a formação de radicais hidroxilo [22]. Para pH inferior a 3 o método perde consistência mas de forma menos dramática. Se iniciarmos a experiência a pH 6, o comportamento do sistema tem sensivelmente o aspecto que a Figura 4 exemplifica:

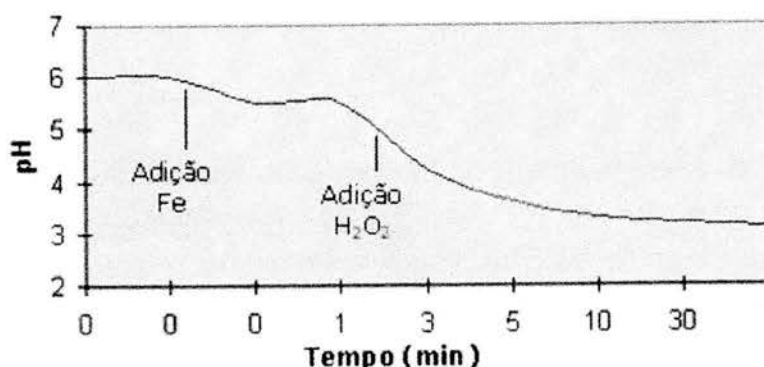


Figura 4. Evolução tipo do pH durante um ensaio com reagente Fenton

A primeira inflexão no gráfico deve-se à adição de F_2SO_4 , que tipicamente apresenta vestígios de ácido sulfúrico. A segunda, e mais pronunciada está relacionada com o momento em que o peróxido é introduzido no sistema. A ténue mas contínua descida seguinte é atribuída à fragmentação da matéria orgânica a ácidos orgânicos. A ausência deste comportamento pode indiciar a inibição da reacção e consequente acumulação de peróxido no sistema [35].

4.2.5. Efeito do tempo de reacção:

O tempo necessário para completar a reacção depende de várias variáveis, entre elas a razão $\text{Fe}/\text{H}_2\text{O}_2$ e a toxicidade da água residual. Para uma oxidação simples (concentração do fenol menor que 250 mg/l (ppm)) a reacção geralmente leva 30 a 60 minutos. Para experiências mais complexas o processo pode levar horas, tornando-se usual optar-se por uma oxidação por partes, em prol de aumentar consideravelmente as concentrações de reagentes. Esta última hipótese traduz um aumento dos custos e um risco superior em termos de segurança.

4.2.6. Vantagens e desvantagens do método

Em comparação com outros processos que são não-destrutivos, tais como osmose reversa, coagulação ou micro-filtração, a grande vantagem deste processo está no facto de o peróxido não sobrecarregar o sistema e ser decomposto em substâncias inofensivas [20]. O equipamento necessário é de baixo custo e fácil de manusear. No entanto a oxidação por reagente de Fenton não possui uma acção prolongada, cessando assim que o peróxido se tenha decomposto (em *batch*). Este facto pode levar à formação de muitos intermediários que podem persistir no meio. Além disso o processo requer condições de pH e temperatura específicas para que o tratamento seja eficiente.

4.3. Análise de clorofenóis

Uma vez que os CP's encontram-se no meio ambiente em concentrações extremamente baixas (na ordem dos $\mu\text{g/l}$) torna-se indispensável o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar níveis vestigiais destes compostos em amostras de águas e de solos/sedimentos.

As etapas normalmente seguidas num método analítico englobam os seguintes passos:

- amostragem: recolha e armazenamento;
- preparação da amostra (*clean-up*): extracção e concentração;
- análise: separação, identificação e quantificação;
- análise dos resultados.

O método analítico implementado neste estágio conjuga uma técnica eficaz de extracção de CP's, a microextracção em fase sólida (SPME – *Solid-Phase Microextraction*) com uma etapa de análise suficientemente sensível, a cromatografia gasosa com detector de captura de electrões (GC-ECD), daí que se justifique uma abordagem mais detalhada a estas etapas.

4.3.1. Técnicas de preparação das amostras

Um dos problemas para a análise deste tipo de compostos reside no facto da maioria dos equipamentos disponíveis não conseguir lidar directamente com a amostra, o que impõe uma necessidade extrema de um pré-tratamento em que os compostos pretendidos são isolados da matriz em que estão contidos. De salientar que muitas vezes, durante o processo de *clean-up*, ocorrem perdas de analito que afectam a reprodutibilidade e a repetibilidade dos ensaios deste tipo de amostras. A selecção de uma técnica de extracção adequada é de extrema relevância para o sucesso da análise de determinado composto [25].

Atendendo ao facto dos CP's estarem presentes numa amostra normalmente em quantidades vestigiárias, isto é, bastante inferiores aos limites de detecção dos equipamentos – normalmente cromatógrafos – a concentração dos analitos extraídos constitui o passo seguinte à extracção. Actualmente, as técnicas utilizadas englobam simultaneamente a extracção e concentração dos analitos.

Existem várias técnicas que podem recuperar compostos orgânicos de amostras aquosas, através da sua concentração na fase de extracção, nomeadamente a extracção líquido-líquido - *LLE*, a extracção em fase sólida - *SPE* e a extracção em fase gasosa - *GPE*. Contudo estes métodos apresentam algumas desvantagens, como é o facto da eficiência de extracção variar em função do comportamento de partição dos analitos, de necessitarem de volumes de amostra relativamente elevados, de um manuseamento mais elaborado e, muitas vezes, da utilização de solventes orgânicos.

Mais recentemente, a microextracção em fase sólida (*SPME*) tem-se revelado uma técnica bastante expedita que possui vantagem em relação às técnicas de extracção convencionais já que necessita de volumes de amostra relativamente reduzidos, um manuseamento mais simples e um menor consumo de material ou reagentes.

4.3.1.1. Descrição da técnica de SPME

A técnica de *SPME* permite a concentração de compostos voláteis e semi-voláteis, como os CP's, em amostras líquidas e gasosas para posterior análise, usualmente num sistema cromatográfico.

Esta é uma técnica que recorre à utilização de uma fibra associada a um dispositivo portátil, em forma de seringa (Figura 5). A fibra de sílica de pequeno diâmetro é revestida com uma fase estacionária constituída por um líquido polimérico, que extrai selectivamente analitos existentes na matriz de uma amostra. A extracção consegue-se

inserindo a fibra directamente na amostra aquosa (extracção em imersão) ou, no caso de analitos mais voláteis, no meio gasoso existente acima da amostra (extracção em *headspace*). Os compostos que têm afinidade com a fibra adsorvem nesta durante um determinado período de tempo. Atingido o equilíbrio entre a matriz da amostra e a fase de extracção a fibra não acumulará mais analito. De seguida, a fibra é introduzida no injectador de um cromatógrafo, a temperatura elevada, para que ocorra a dessorção dos compostos adsorvidos e se proceda à sua separação, identificação e quantificação [16,21].

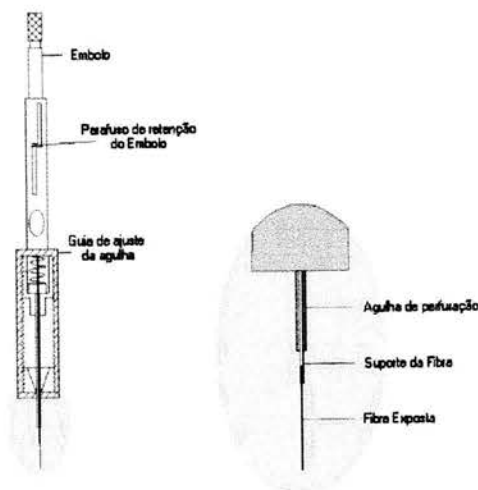


Figura 5. Representação esquemática da seringa e da fibra utilizadas na técnica de SPME.

Em SPME, existe um conjunto de parâmetros que devem ser otimizados de modo a ser conseguida uma extracção o mais eficiente possível [21]:

- o tipo de fibra (polaridade e a espessura);
- modo de extracção (imersão ou *headspace*);
- tempo e temperatura de extracção;
- tempo e temperatura de dessorção da fibra no injectador;
- adição de sal e/ou alteração do pH.

4.3.1.1.1. Selecção do tipo de fibra

Um parâmetro bastante importante nas extracções em SPME é a polaridade da fibra. A fibra a utilizar deverá ser escolhida de modo a que tenha elevada afinidade com o composto que se pretende extrair e simultaneamente não adsorva os restantes compostos existentes na amostra a analisar. Atendendo ao facto de apenas 1 cm da fibra estar exposto à matriz da amostra, o revestimento de uma fibra de SPME deve ser

apolar, ou então fortemente polar. Dois tipos de revestimentos, com diversas espessuras, têm sido os mais utilizados e capazes: uma apolar, o polidimetilsiloxano (PDMS) mais indicado para compostos como BTEX, PAHs e PCBs, e outro polar, o poliacrilato (PA) mais eficaz para fenóis, pesticidas organofosforados e herbicidas azotados [24].

A espessura da fibra influencia igualmente os resultados da extracção, visto a difusão do analito desde a matriz da amostra até ao revestimento da fibra de SPME ser proporcional à espessura deste. Um filme mais espesso retém compostos voláteis e transfere-os até aos locais de injeção do cromatógrafo gasoso sem perdas. Pelo contrário, em compostos com pontos de ebulição mais elevados, um filme pouco espesso assegura uma mais rápida difusão e libertação do analito durante a dessorção térmica no cromatógrafo gasoso. Um filme espesso remove eficazmente da matriz compostos com ponto de ebulição elevados, no entanto, a velocidade de dessorção será menor, correndo-se o risco de transportar os analitos até à próxima extracção.

4.3.1.1.2. Modo de extracção

A escolha do modo de extracção (imersão ou *headspace*) assume igualmente especial relevância. Analitos que exibem pressão de vapor podem ser extraídos através da imersão directa da fibra na amostra (extracção em imersão), bem como através da colocação da fibra no meio gasoso acima da amostra (extracção em *headspace*) (Figura 6) [21]. Pelo contrário, analitos que não exibem pressão de vapor devem obrigatoriamente ser extraídos por imersão da fibra.

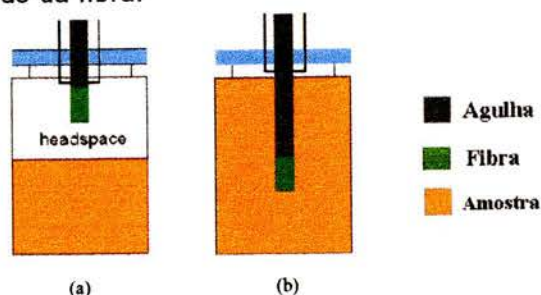


Figura 6. Modo de extracção de analitos de uma amostra
(a) *headspace* e (b) imersão.

A extracção em *headspace* apresenta a vantagem de proteger o revestimento da fibra de moléculas com maior peso molecular e outras interferências não-voláteis presentes na matriz da amostra. O modo de *headspace* permite ainda modificações na matriz, tais como mudanças no valor do pH, sem danificar a fibra. Em relação à quantidade extraída, comparando o modo de *headspace* e imersão, esta é a mesma no equilíbrio, desde que os volumes de amostra e gás sejam os mesmos [21].

4.3.1.1.3. Tempo e temperatura de extracção

Relativamente ao tempo de extracção, este afecta directamente quantidade de analito sorvido na fibra. A adsorção deve ser inicialmente rápida, seguindo-se uma fase de adsorção mais lenta à medida que a superfície da fibra começa a ficar saturada e o equilíbrio é atingido. Logo, apesar de um tempo de extracção mais elevado melhorar a recuperação, a partir de um certo tempo, o ganho adicional em sensibilidade não justifica o aumento do tempo de extracção.

A temperatura de extracção deve ser suficientemente elevada para volatilizar os compostos a analisar para a região acima da amostra líquida (*headspace*). Porém, este parâmetro mas não deve ser tão elevado ao ponto que de provocar a dessorção do composto da fibra ou até a alteração da estrutura do mesmo.

4.3.1.1.4. Tempo e temperatura de dessorção

O tempo e a temperatura de dessorção do(s) composto(s) absorvido(s) na fibra devem ser suficientemente elevados de modo a ocorrer a total dessorção do(s) analito(s) da fibra para o injectador do cromatógrafo.

4.3.1.1.5. Adição de sal e/ou alteração do pH

No que diz respeito à adição de sal à amostra e/ou à alteração do pH desta antes da extracção, estas podem em alguns casos provocar um aumento da força iónica da matriz, reduzindo a solubilidade de alguns analitos, beneficiando como tal a partição do analito pela superfície da fibra. Por outro lado, tais medidas podem provocar um aumento na solubilidade de certos analitos.

4.3.1.1.6. Agitação da amostra

A agitação beneficia a extracção, reduzindo o tempo de extracção, sobretudo no caso de analitos com pesos moleculares mais elevados e coeficientes de difusão também elevados. No entanto, é necessária uma agitação consistente, sob risco de serem obtidos resultados com baixa precisão.

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

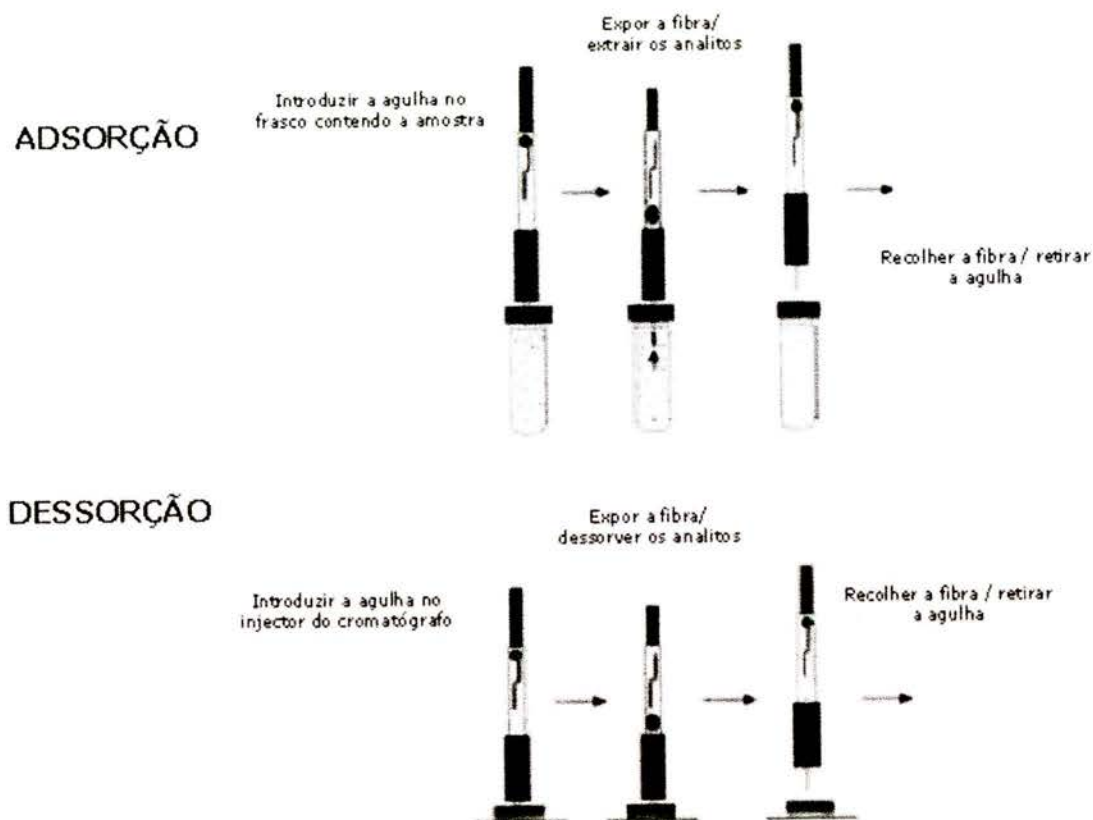


Figura 7. Procedimento de extracção e dessorção numa análise por SPME.

A SPME tira vantagem do equilíbrio de extracção e dessorção selectiva na fibra, reduz as perdas de analito bem como o tempo de análise, não utiliza solventes e apresenta elevada sensibilidade facilitando a análise de compostos vestigiários, como os clorofenóis. Além disso, uma única fibra de SPME pode ser reutilizada inúmeras vezes (até cerca de 150 vezes) o que se torna económico face ao custo elevado de cada fibra. No entanto, estas apresentam algumas limitações como a sua fragilidade, podendo quebrar-se facilmente além de um tempo de utilização limitado pois tendem a degradar-se com o uso. Existe ainda a necessidade de realizar um condicionamento, a uma determinada temperatura e período de tempo especificados por cada fabricante, sempre que se utiliza uma fibra nova ou esta não é utilizada durante um longo período de tempo.

4.3.1.1.7. Análise cromatográfica

Esta é a etapa que envolve a separação, identificação e quantificação dos poluentes. A técnica mais utilizada é, sem dúvida, a cromatografia de alta resolução, seja ela gasosa (HRGC) ou líquida (HPLC), consoante a estrutura do contaminante em causa e a sensibilidade requerida. A sensibilidade ao nível da alta resolução provoca facilmente a contaminação das amostras através dos recipientes ou ar ambiente em contacto com as mesmas. Adicionalmente, a sensibilidade condiciona o tipo de detector a utilizar.

Os detectores mais frequentemente usados na análise quantitativa de clorofenóis, acoplados a cromatógrafos gasosos, são o detector de captura de electrões (ECD), detector de ionização de chama (FID) e o detector de espectrometria de massa (MS).

Na cromatografia gasosa, a amostra é injectada na cabeça da coluna cromatográfica sendo vaporizada instantaneamente. A eluição é realizada através de um fluxo de uma fase móvel gasosa inerte. Esta não interage com o analito, tendo como única função o transporte do mesmo ao longo da coluna. Embora existam dois tipos de cromatografia, a gás-sólido e a gás-líquido, esta última é a predominante pelo que se generaliza aplicando o termo "cromatografia gasosa". É baseada na partição de um analito entre a fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida, presente na superfície de um sólido inerte [24].

A Figura 8 representa os principais elementos de um cromatógrafo gasoso [27]

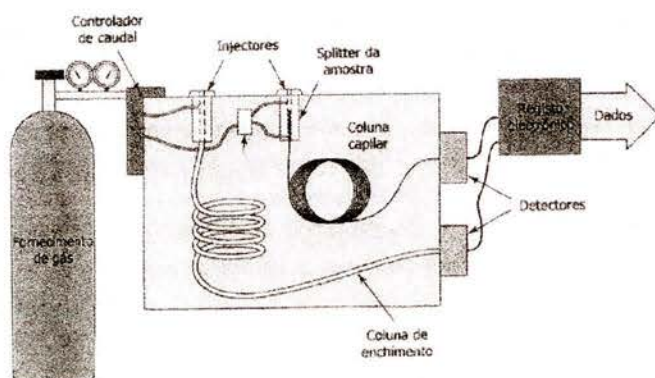


Figura 8. Principais elementos de um cromatógrafo gasoso

O gás de arraste, armazenado numa botija de alta pressão, é ligado ao sistema através de um regulador próprio, que concede uma pressão constante ao gás fornecido ao controlador do aparelho. A amostra é introduzida no injetor, que normalmente está aquecido, passando posteriormente para a coluna cromatográfica. No final da coluna encontra-se o detector, que não é mais do que um transdutor que responde à presença

dos analitos. Os sinais por ele emitidos são amplificados e registados, obtendo-se a sua quantificação.

A escolha do gás de arraste para o uso com o ECD está limitada ao hidrogénio, aos gases nobres e ao azoto. O árgon puro e o hélio não são aconselháveis porque formam rapidamente iões metastáveis que podem transferir a sua energia de excitação por colisão com vapores do soluto, resultando daí efeitos de ionização indesejáveis.

Deste modo, os gases mais utilizados como *make-up* para o ECD são o árgon-metano (95/5) e o azoto isento de oxigénio. Como gás de arraste, é conveniente a utilização de hélio ou hidrogénio, de modo a maximizar a eficiência das colunas tubulares abertas e minimizar o tempo de análise.

4.4. Planeamento estatístico de experiências

O planeamento estatístico de experiências é uma ferramenta importante na obtenção de modelos significativos de um fenómeno recorrendo a um número mínimo de ensaios pré determinados. Informação relevante sobre a importância de cada factor no processo (e sobre as interacções entre eles) pode assim ser obtida, com um conjunto de experiências cuidadosamente escolhidas. Usando esta técnica, é possível atingir as condições com as quais o fenómeno é mais eficiente [23]. Este método estatístico foi anteriormente utilizado, por exemplo, no tratamento de lixiviados por reagente de Fenton [23], e também na preparação de carvão activado para uso no tratamento de águas residuais [4]. O *software* utilizado foi o *JMP, The Statistical Discovery Software* [29], que permite não só determinar as experiências a realizar, como também aplicar o modelo polinomial aos resultados obtidos. A Figura 9 mostra uma captura de ecrã retirada durante a utilização do programa.

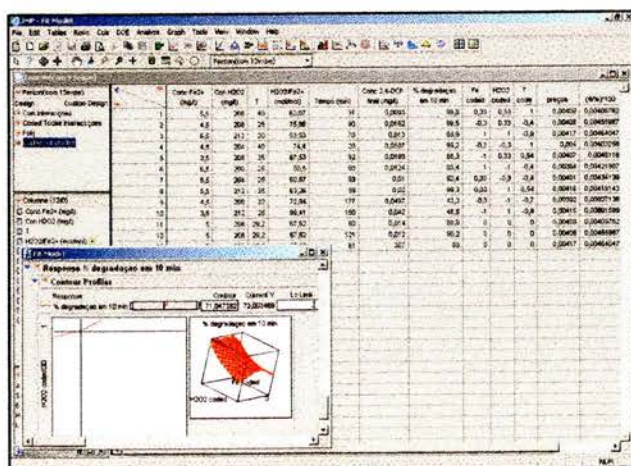


Figura 9. JMP, The Statistical Discovery Software

5. Procedimento experimental

Nesta secção apresenta-se uma relação de todo o material utilizado na execução das experiências, bem como a descrição das metodologias em que a mesma se baseou.

5.1. Oxidação com reagente Fenton

5.1.1. Padrões e Reagentes

O 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP) foram adquiridos à Supelco. Para o método analítico, as soluções mãe de 2,4-DCP com concentrações de 516 mg/l e 5,16 mg/l e 2,4,6-TCP com concentrações de 1,01 g/l e 5,06 mg/l foram preparadas com 2-propanol (Merck).

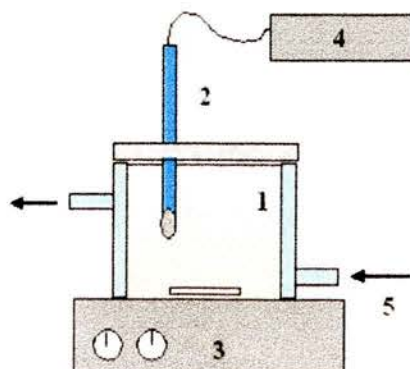
Os reagentes usados na experiência foram:

- Sulfito de Sódio p.a. (Merck)
- Sulfato de Ferro (II) heptahidratado p.a. (Merck)
- Péroxido Hidrogénio (30%) p.a. (Merck)

Nas análises que envolveram SPME, o pH das amostras foi ajustado com uma solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4) p.a. da Fluka a 1M. Esta solução, em combinação com a solução de NaOH 1M, preparada a partir de NaOH p.a. da Sigma, foi utilizada para regular o pH no reactor durante as experiências.

5.1.2. Instalação

A instalação experimental usada era composta por um medidor pH/temperatura, um reactor de 260 ml de capacidade com camisa, um agitador magnético, e um banho termostático, como está representado na Figura 10:



- Legenda:
- 1 - Reactor
 - 2 - Sensor pH/temperatura
 - 3 - Agitador magnético
 - 4 - Detector pH/temperatura
 - 5 - Entrada água aquecimento

Figura 10. Esquema da instalação experimental

O detector utilizado é um *inoLab* da WTW, que permite simultaneamente controlar o pH, a temperatura e o potencial duma solução.

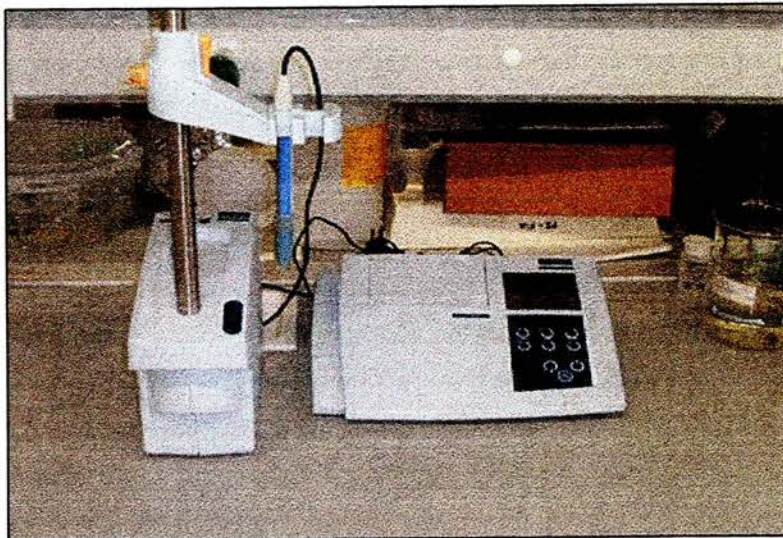


Figura 11. Medidor pH/temperatura

Foi montada a instalação representada esquematicamente na Figura 10. O aspecto final é apresentado na figura seguinte.



Figura 12. Fotografia da instalação experimental usada

5.1.3. Procedimento

Foi preparada uma solução 2,4-DCP 3 g/l, diluindo 1,5 g de 2,4-DCP em 500 ml de água destilada. Como este valor encontrava-se próximo do limite de solubilidade deste composto (4,5 g/l) a diluição total foi conseguida emergindo a solução num banho a cerca de 30 °C. Esta solução foi previamente analisada por GC-SPME para garantir que a concentração pretendida era adicionada ao reactor.

No presente trabalho pretendeu-se estudar as quatro variáveis fundamentais no processo. No entanto um planeamento estatístico a quatro factores é bastante penoso em termos de ensaios a efectuar [18]. Sendo assim procedeu-se a quatro experiências preliminares (a pH 3;3,5;4 e 5) de modo a determinar o pH óptimo, aplicando-se de seguida o planeamento às três restantes variáveis, nomeadamente temperatura e concentrações de ferro e peróxido.

Nas experiências preliminares a temperatura foi de 30 °C e partiu-se de um valor inicial de 100 mg/l de 2,4-DCP e razões $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$; 2,4-DCP/ H_2O_2 adequadas, de modo a obter resultados num espaço de tempo considerável que permitisse uma melhor interpretação dos resultados. Conclui-se que os valores dessas razões seriam 131:1 e 0,1:1 (mol/mol) respectivamente [20,22]. Os volumes a retirar das soluções mãe foram calculados com base nessas razões e são apresentadas na tabela 3. Um exemplo de cálculo é apresentado no anexo D.

Tabela 3. Volume a retirar das soluções mãe e concentração inicial no reactor

	Conc. Soluções Mãe		Vol. (ou massa) adicionado ao reactor		Conc. no reactor	
[2,4-DCP]	3,00	g/l	8,67	ml	100,00	mg/l
[H_2O_2]	339,00	g/l	0,15	ml	200,00	mg/l
[$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$]	-	-	3,24	mg	12,40	mg/l
H_2O	-	-	251,12	ml		

Após a montagem da instalação colocou-se o volume de água destilada necessário (tabela 3), guardando uma porção do volume para ajudar a transpor o sulfato de ferro do vidro de relógio para o reactor. De seguida adicionou-se o volume de 2,4-DCP indicado e corrigiu-se o pH (para o valor a estudar) e a temperatura para 30 °C. O pH corrigiu-se fazendo uso das soluções de H_2SO_4 e/ou NaOH e a temperatura foi regulada no banho termostático. Nesta altura retirou-se uma amostra para comprovação posterior da

concentração de clorofenol introduzido no sistema. Finalmente acrescentou-se o peróxido de hidrogénio e iniciou-se a contagem do tempo com um cronómetro.

Recolheram-se amostras de 1 ml para *ependorfs* onde foi previamente colocada a massa necessária de sulfito de sódio para reagir com o péroxido, em condições estequiométricas 1:1 (eq.3), de modo a evitar a formação dos radicais OH[•], e consequentemente parar a reacção. Este procedimento é bastante importante pois sem o sulfito a reacção continuaria a dar-se nos *ependorfs*, e a análise obtida não corresponderia ao tempo em que foi recolhida a amostra. Estas foram conservadas a temperaturas baixas em *ependorfs* devidamente identificados e selados com *parafilm*.



O planeamento estatístico foi realizado no *software* JMP [29], utilizando 4 valores para cada factor: temperaturas de 20, 25, 35, 40 °C; concentrações de ião ferro, [Fe²⁺], de 3,5, 4,5, 5,5 e 6,5 mg/L; e concentrações de peróxido de hidrogénio, [H₂O₂], de 200, 204, 208, 212 mg/L. A pequena gama usada para o peróxido (6%) é resultado de um estudo prévio: ensaios preliminares revelaram que uma pequena variação na concentração de peróxido permitia obter resultados significativos, podendo-se concluir do efeito deste parâmetro sem necessidade de recorrer a um intervalo de concentrações mais elevado. Nestas condições, 10 ensaios são necessários de modo a aplicar um modelo polinomial aos resultados. No entanto, foram realizadas mais 3 experiências nas condições dos pontos centrais dos parâmetros, de modo a minimizar os erros.

5.2. Quantificação do 2,4-DCP

A quantificação dos clorofenóis requer a utilização de técnicas de análise muito apuradas, na medida em que estes são poluentes vestigiários, existindo como tal, em concentrações na ordem dos µg/l. Este facto associado à problemática de por diversas vezes tais compostos surgirem associados a interferências, torna necessária a utilização de métodos convenientemente validados que permitam identificar e quantificar a existência de pesticidas com graus de incerteza satisfatórios.

Deste modo, a quantificação do 2,4-DCP foi realizada por recurso a uma técnica eficaz de extracção, a microextracção em fase sólida (SPME) conjugada com uma etapa de análise suficientemente sensível, a cromatografia gasosa com detector de captura de electrões (GC-ECD).

Quanto ao procedimento, a quantificação do 2,4-DCP foi efectuada pelo método do padrão interno usando o 2,4,6-TCP como padrão interno a uma concentração de 5 µg/l. A resposta do detector foi ajustada diariamente através de um padrão de controlo

diário com 40 $\mu\text{g/l}$ 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.

5.2.1. Extracção e pré-concentração por SPME

Os padrões e as amostras recolhidas da instalação foram extraídos e pré-concentrados por SPME, antes da análise cromatográfica. O sistema de SPME consiste numa fibra com um revestimento de 85 μm em poliacrilato (PA) e num suporte para fibras manual, adquiridos à Supelco. Uma placa de aquecimento/agitação (Corning - modelo PC-240) à qual se acoplou um termómetro e um banho, controlou a agitação a 750 rpm, promovida por uma barra magnética (10 $\times$ 3 mm PTFE da Supelco), e temperatura das amostras a extrair. As amostras estavam contidas em frascos (*vials*) foscos de 4 ml (referência 27006) de tampa roscada com septo de PTFE/Silicone, da Supelco (Figura 13).

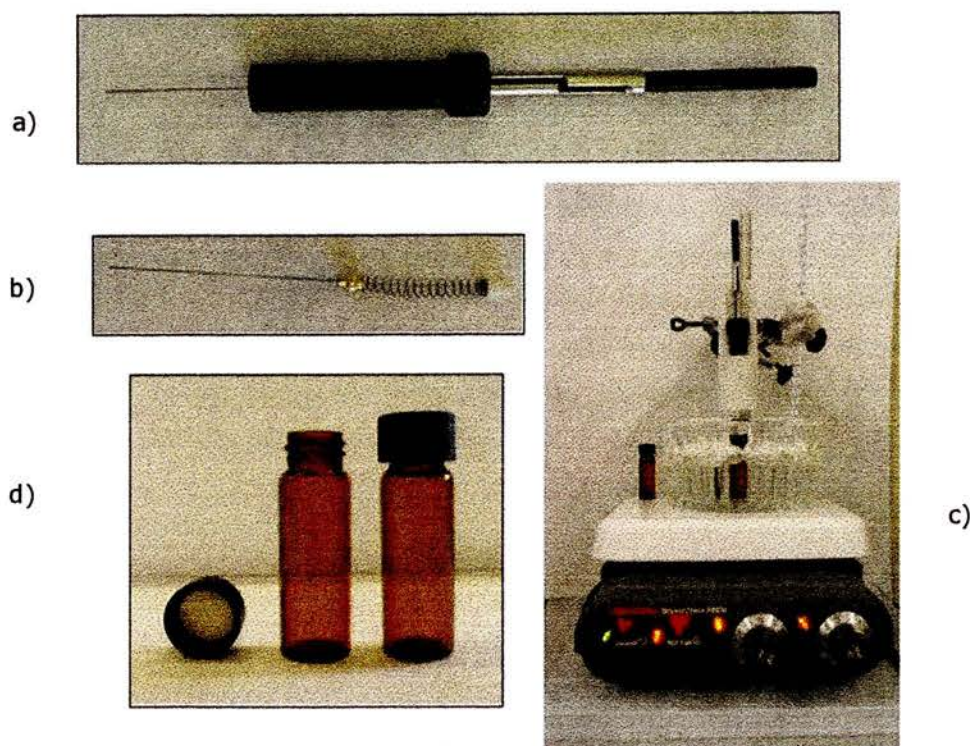


Figura 13. a) Suporte e fibra de SPME, (b) Fibra de 85 μm em poliacrilato (PA), (c) Placa de aquecimento/agitação e (d) *Vials* foscos de 4 ml e tampa roscada com septo.

Em SPME, existe um conjunto de parâmetros (mencionados na Introdução Teórica) que devem ser otimizados de modo a ser conseguida uma extracção o mais eficiente possível. Não foi necessário realizar ensaios de modo a otimizar os parâmetros referidos,

uma vez que na Dissertação de Mestrado de António Ribeiro [25], são apresentadas as condições óptimas em que deve ser efectuada a extracção por SPME para um vasto conjunto de poluentes orgânicos, do qual faz parte o 2,4-DCP. Os resultados experimentais retirados da referida Dissertação encontram-se apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Condições óptimas que maximizam a extracção do 2,4-DCP por SPME.

Modo de Extracção	Temperatura da extracção	Tempo de extracção	pH	Adição de sal	Agitação
Imersão	40 °C	60 min	2	7,7 g de Na ₂ SO ₄ anidro por cada 30 ml de amostra	750 rpm

Uma vez que se pretende que o método de análise seja suficientemente rápido, não prejudicando contudo os resultados da análise, optou-se por um tempo de extracção de apenas 15 min. O pH foi ajustado a 2 por adição de 1 ml de ácido sulfúrico 1 M por cada 25 ml de amostra. No entanto notou-se que a fibra tornava-se frágil por acção do sal, e partia com bastante facilidade. Devido ao elevado custo de cada fibra preferiu-se, a partir de certo momento, não adicionar sal na extracção.

Em cada análise os *vials* foram preenchidos com 4 ml de amostra e colocados na placa de aquecimento/agitação. Após a extracção, retirou-se a fibra da amostra e passou-se por água ultrapura de modo a retirar possíveis quantidades de sal retidas na mesma (este procedimento tornou-se obviamente desnecessário a partir do momento em que se deixou de usar sal). A fibra foi inserida no injector do GC através do septo, exposta e mantida em dessorção por 3 minutos após o início de cada corrida. Antes da extracção das amostras foram efectuadas corridas em branco à fibra (sem extracção) com o intuito de verificar possíveis contaminações.

5.2.2. Análise por GC-ECD

As condições de operação, bem como as características GC-ECD utilizado são descritas de seguida.

- Cromatógrafo gasoso Finnigan 9001, com sistema de injeção *split-splitless* e detector por captura de electrões (ECD) de ⁶³Ni (Figura 14);
- Sistema de aquisição de dados informático com *software BORWIN*;
- Coluna: J&W Scientific DB-5 MS (30 m de comprimento × 0,32 mm de diâmetro interno × 1 µm de filme);
- Gás de arraste e auxiliar: azoto, adquirido à Praxair.
- Caudais fixados: gás de arraste 3 ml/min, *make-up* 20 ml/min e gás de purga do detector 50 ml/min.

- Temperatura do injector *split/splitless*: 280°C;
- Temperatura do detector: 350°C;
- Programa de temperaturas: temperatura inicial do forno 150 °C durante 1 minuto, rampa de 10 °C/min até 280 °C e patamar a 280 °C durante 1,5 minutos para um tempo total de análise de 15,5 minutos.

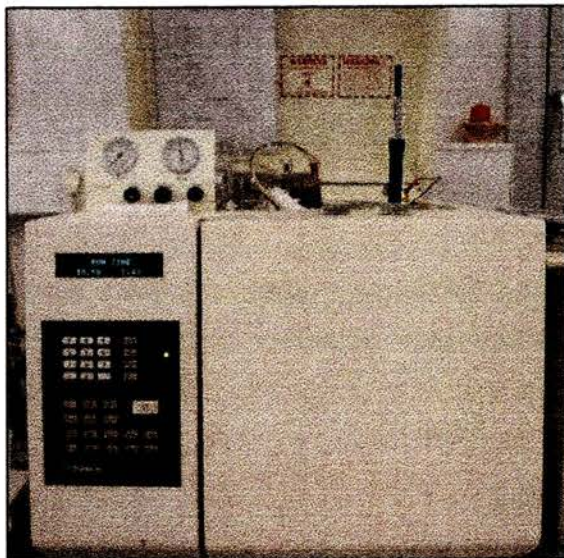


Figura 14. Fotografia do cromatógrafo gasoso com detector por captura de electrões (GC-ECD).

5.3. Ensaios de validação do método

Nesta secção faz-se referência à metodologia seguida para avaliar alguns dos parâmetros que constituem a validação de um método analítico. Deste modo, foi realizado um conjunto de ensaios, descritos pelo EURACHEM/CITAC Guide [11]:

- linearidade, através de calibrações e obtenção dos respectivos intervalos de confiança e limites de detecção;
- precisão, com ensaios de precisão intermédia (ensaios com a mesma concentração em dias diferentes);
- exactidão, com a obtenção da recuperação pelo método da adição de padrão.

5.3.1. Linearidade

Efectuaram-se os ensaios necessários para a obtenção de uma recta de calibração para o 2,4-DCP que relaciona o sinal do detector em função da concentração. A

quantificação do 2,4-DCP foi efectuada pelo método do padrão interno usando o 2,4,6-TCP como padrão interno. A linearidade da resposta foi avaliada para uma gama de concentrações compreendida entre 5 e 90 $\mu\text{g/l}$ de 2,4-DCP. Assim, procedeu-se à preparação de padrões de concentração 5, 10, 20, 40, 60 e 90 $\mu\text{g/l}$ de 2,4-DCP aos quais foram adicionados o padrão interno a uma concentração de 5 $\mu\text{g/l}$. Os referidos padrões foram injectados no GC no próprio dia da preparação sendo efectuadas, para cada padrão, três a quatro injeções. O valor considerado para a recta de calibração é a média dos valores obtidos (em termos de razão das áreas de DCP e TCP).

A avaliação da linearidade é então efectuada com base na representação gráfica que relaciona o sinal do equipamento com a concentração de pesticida e através do cálculo e análise do coeficiente de correlação.

5.3.2. Precisão

Nesta experiência, a precisão do método foi avaliada através da precisão intermédia. Para tal foram efectuadas extracções consecutivas de um padrão 40 $\mu\text{g/l}$ de 2,4-DCP, em cinco dias diferentes.

5.3.3. Exactidão

O procedimento para o cálculo da exactidão, pelo método da adição de padrão, consistiu na extracção de:

- um branco;
- padrão de concentração 40 $\mu\text{g/l}$ de 2,4-DCP e 5 $\mu\text{g/l}$ de 2,4,6-TCP;
- uma amostra que continha 50% do padrão a 40 $\mu\text{g/l}$ de 2,4-DCP, ou seja para um volume de 10 ml, colocaram-se 5 ml de padrão de concentração 40 $\mu\text{g/l}$. A recuperação é calculada com base no valor teórico previsto e no valor que foi realmente obtido.

6. Resultados e discussão

6.1. Ensaios preliminares

Antes de se proceder à validação do método analítico e à análise das amostras recolhidas foram realizados alguns ensaios preliminares com o intuito de verificar a resposta do detector ECD utilizado à concentração de 2,4-DCP. A observação dos resultados obtidos levou a concluir que a resposta do detector apresentava variações de resposta significativas, tanto na injeção de um mesmo padrão com 2,4-DCP num determinado dia como na análise desse padrão em dias diferentes.

A elevada variabilidade verificada com coeficientes de variação bastante superiores a 10% (valor considerado aceitável), conduziram à necessidade de aferir a resposta do detector. Para tal recorreu-se à introdução de um padrão interno (2,4,6-TCP) a todos os padrões e amostras recolhidas da instalação experimental e analisou-se diariamente um padrão de controlo com concentração de 40 µg/l de 2,4-DCP e 5 µg/l de 2,4,6-TCP. Deste modo, o valor a considerar da resposta do detector na análise das amostras recolhidas da instalação experimental foi:

$$[DCP]_{amostra} = \frac{\left(\frac{Área_{DCP}}{Área_{TCP}} \right)_{amostra}}{\left(\frac{Área_{DCP}}{Área_{TCP}} \right)_{padrão\ controlo}} \cdot [DCP]_{padrão\ controlo} \quad (4)$$

Quando houve necessidade de diluir as amostras então a concentração de 2,4-DCP nessa amostra vem dada pela equação anterior mas dividindo pelo factor de diluição. Os resultados obtidos indicaram que os valores dos coeficientes de variação são, regra geral, substancialmente inferiores ao valor obtido sem a correcção do padrão interno e padrão de controlo, sendo portanto necessário aferir a resposta do detector diariamente.

6.2. Validação do método analítico

6.2.1. Linearidade

A linearidade da resposta foi avaliada para uma gama de concentrações compreendida entre 5 e 90 µg/l de 2,4-DCP. Na Figura 15 apresenta-se a recta de calibração obtida, assim como os respectivos limites de confiança. O fundamento teórico deste tratamento estatístico bem como todos os cálculos intermédios que serviram de base para a obtenção da curva de calibração podem ser consultados no anexo B.

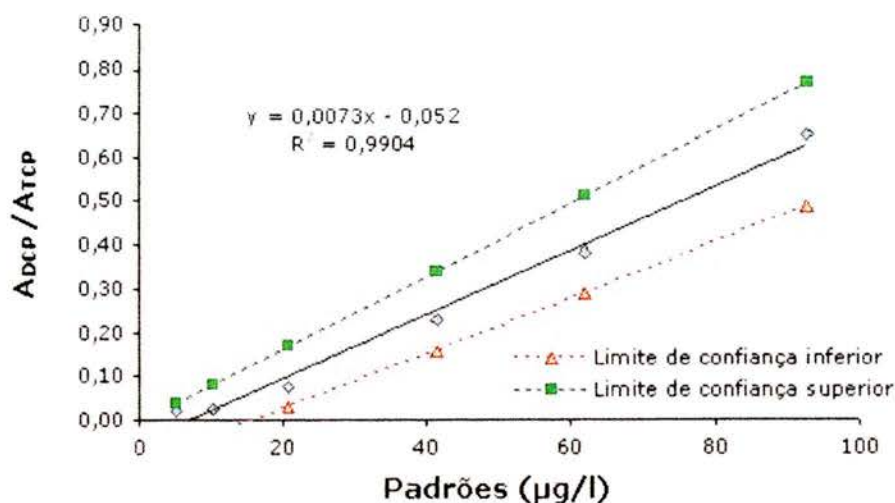


Figura 15. Representação gráfica da recta de calibração e respectivos limites de confiança.

De acordo com os resultados obtidos constata-se que a recta de calibração obtida para o 2,4-DCP apenas não cumpre uma das exigências admitidas para métodos analíticos convenientemente validados (Anexo B). Isto porque o coeficiente de correlação é de 0,9952, que é superior a 0,9950, o erro do declive é de 4,91% que é inferior a 5% mas o intervalo de confiança para a ordenada na origem $[-0,103; -0,003]$ não inclui a própria origem. Determinou-se o limite de detecção do método tendo-se obtido, em termos de concentração, o valor 7,28 µg/l.

6.2.2. Precisão

Nesta experiência, a precisão do método foi avaliada através da precisão intermédia. Os resultados são expressos em termos de coeficiente de variação (CV) que não é mais do que o cálculo do desvio padrão sobre a média, em percentagem, ou seja, um desvio padrão relativo:

$$CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (5)$$

O valor de precisão intermédia obtido a concentração de 40 µg/l foi de 26,8%. Os resultados dos ensaios que produziram este valor apresentam-se no anexo C.

Um valor até 10% é considerado aceitável, dado o tipo de metodologia empregue e nível de concentração usado (na ordem dos $\mu\text{g/l}$). Contudo, esse valor foi excedido.

6.2.3. Exactidão

Nesta experiência, a exactidão foi avaliada por intermédio de ensaios de recuperação de padrões de 2,4-DCP de concentração conhecida, recorrendo-se para tal ao método da adição de padrão (equação (6)).

$$\eta = \frac{\text{Área}_{\text{padrão}}}{\frac{\text{Área}_{(\text{padrão} + \text{água})} + \text{Área}_{\text{branco}}}{2}} \cdot 100 \quad (6)$$

Os valores de recuperação obtidos para os dois níveis de concentração indicam-se na tabela seguinte. Os resultados dos ensaios que produziram estes valores apresentam-se no anexo C.

Tabela 5. Resultados referentes à exactidão do método analítico.

	[DCP]=40 $\mu\text{g/l}$
Recuperação média (%)	119,9

Os ensaios efectuados para a avaliação da exactidão do GC-ECD conduziram a valores de recuperação compreendidos entre 80 e 120%, o que indica que o método de determinação de 2,4-DCP no GC-ECD é exacto.

6.2.4. Incerteza global

A incerteza global representa uma medida da possível variabilidade e consequente fiabilidade do método analítico [10]. A avaliação da incerteza associada a um método analítico que foi validado é a etapa final da validação, que conduz à emissão do resultado $\pm$ incerteza.

A avaliação da incerteza global combina as contribuições de todas as fontes de erro, julgadas significativas pelo operador, por forma a conduzir a uma melhor interpretação final dos resultados e constatar as fontes de erro mais influentes. Para cada caso as contribuições podem variar mas em geral são tidas em conta as incertezas individuais. Neste caso, foram quatro as incertezas individuais contabilizadas para a incerteza global:

- incerteza associada à preparação dos padrões, U_1
- incerteza associada à recta de calibração, U_2
- incerteza associada à precisão, U_3
- incerteza associada à exactidão, U_4

A incerteza global do método é determinada pela seguinte expressão:

$$U = \sqrt{U_1^2 + U_2^2 + U_3^2 + U_4^2} \tag{7}$$

O fundamento teórico bem como todos os cálculos intermédios que serviram de base para a obtenção das várias incertezas estão disponíveis no anexo C.

Os resultados obtidos para as diferentes incertezas e incerteza global indicam-se na tabela 6.

Tabela 6. Resultados relativos à incerteza global do método de análise para a determinação do 2,4-DCP.

[DCP] (µg/l)	Incertezas (%)				
	U_1	U_2	U_3	U_4	U
5,16	1,50	34,23			36,55
10,32	1,50	31,22			33,74
20,64	1,50	18,11	12,00	4,24	22,18
41,28	1,49	7,90			15,05
61,92	1,48	5,39			13,90
92,88	1,46	4,31			13,51

Para uma melhor visualização apresenta-se, na Figura 16, a variação da incerteza global com a concentração dos padrões utilizados.

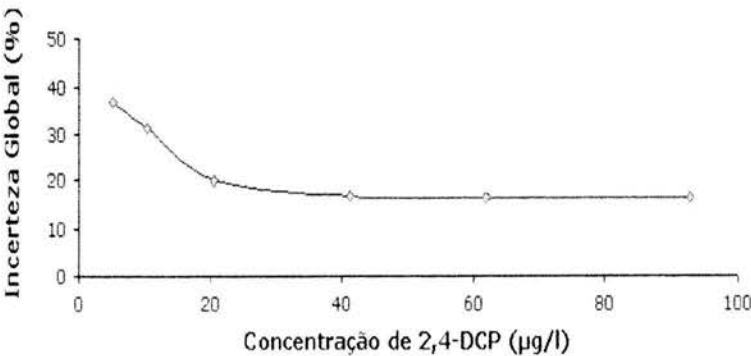


Figura 16. Representação gráfica da incerteza global do método em função da concentração do padrão de calibração

A incerteza global mantém-se praticamente constante para as gamas de concentração alta, subindo exponencialmente para as gamas mais baixas de concentração. Por tal facto, os ensaios foram programados de modo a que os seus resultados se situassem nas gamas de concentração mais elevadas.

6.3. Oxidação com reagente Fenton

6.3.1. Ensaios preliminares

A determinação do pH óptimo conduziu ao resultados detalhados no anexo A. A Figura 17 representa a comparação entre as quatro experiências realizadas a diferentes pH.

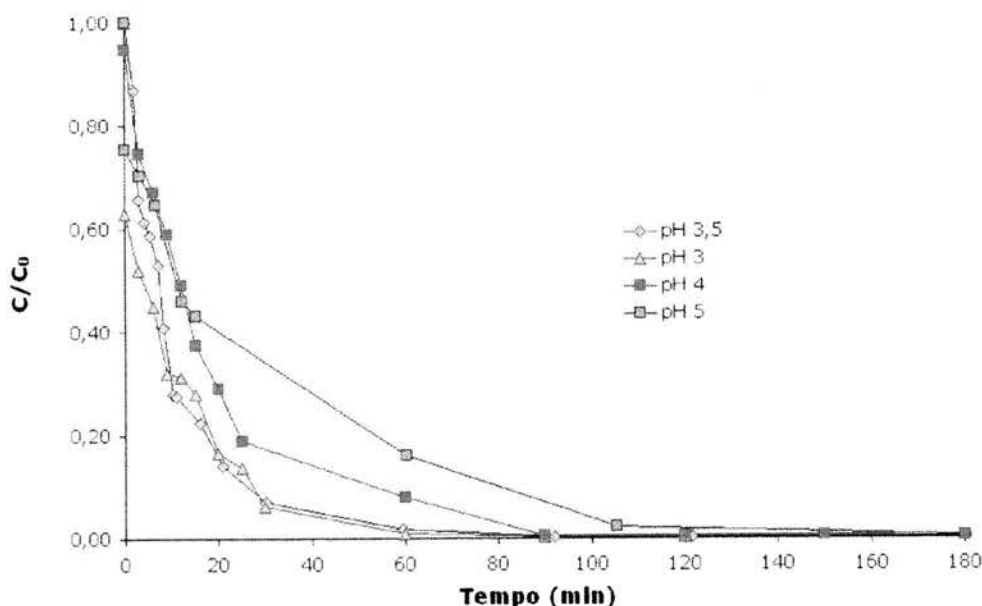


Figura 17. Representação gráfica dos ensaios a diferentes pH

Como é possível concluir pela observação da figura, o processo é mais eficiente (a degradação é mais rápida) a pH 3,5. A pH 3 esta é praticamente idêntica, no entanto optou-se por usar pH 3,5 para consumir menos reagente, neste caso H_2SO_4 . Para pH inferior a 3, o consumo de ácido tornava-se excessivo e o processo menos rentável. Sendo assim no planeamento de experiências foi utilizado pH = 3,5, e todos os ensaios foram conduzidos com este nível de acidez inicial.

6.3.2. Design of experiments (DOE)

Como referido anteriormente o planeamento foi elaborado no *software* JMP [29] e os ensaios foram realizados de acordo com as condições obtidas. A tabela 7 mostra os ensaios e os resultados obtidos, quer em termos de concentração final obtida quer em termos de degradação a um mesmo tempo experimental (neste caso 10 min.).

Tabela 7. Condições dos ensaios realizados e resultados obtidos

En.	[Fe ²⁺] (mg/L)	[H ₂ O ₂] (mg/L)	T (°C)	Tempo (min)	[2,4-DCP] final (mg/L)	Degradação 10 min (%)	Valores codificados		
							[Fe ²⁺]	[H ₂ O ₂]	T
1	5,5	208	40	31	0,0093	99,8	0,3	0,3	1
2	4,5	208	25	90	0,016	89,5	-0,3	0,3	-0,5
3	6,5	212	20	70	0,013	89,9	1	1	-1
4	4,5	204	40	20	0,010	99,2	-0,3	-0,3	1
5	3,5	208	35	92	0,018	88,3	-1	0,3	0,5
6	6,5	200	25	60	0,012	93,4	1	-1	-0,5
7	5,5	204	25	93	0,010	92,4	0,3	-0,3	-0,5
8	5,5	212	35	59	0,020	99,3	0,3	1	0,5
9	4,5	200	25	177	0,049	42,3	-0,3	-1	-0,5
10	5,5	212	25	180	0,042	46,5	-1	1	-0,5
11	5	206	30	60	0,014	88,8	0	0	0
12	5	206	30	64	0,012	90,2	0	0	0
13	5	206	30	61	0,010	93,0	0	0	0

A % de degradação dá-nos uma ideia da velocidade que a reacção apresenta nessas condições. Por exemplo na 1ª experiência, aos 10 minutos o composto já tinha sido degradado 99,8%. No mesmo tempo, e nas condições do ensaio 10, apenas se obtém cerca de 46%. Pela mera observação da tabela podemos concluir que a experiência 1 apresenta as condições mais favoráveis ao processo, visto que o limite legal foi atingido em apenas 30 minutos, sendo que o composto foi degradado 99,8% em apenas 10 minutos. As variáveis codificadas são obtidas usando a eq. 8 (exemplificada para o parâmetro [Fe²⁺], concentração de ferro), e são utilizadas na aplicação do modelo polinomial aos resultados atingidos. Para além de fornecer uma ideia mais generalizada da influência e importância dos factores estudados [5], os erros inerentes ao processo de ajuste são consideravelmente inferiores [18] .

$$[Fe^{2+}]_{cod.} = \frac{[Fe^{2+}] - [Fe^{2+}]_{media}}{[Fe^{2+}]_{max} - [Fe^{2+}]_{media}} \quad (8)$$

A Figura 18 apresenta um comparativo entre os 10 ensaios, podendo-se concluir da maior eficiência das condições usadas nas primeiras experiências.

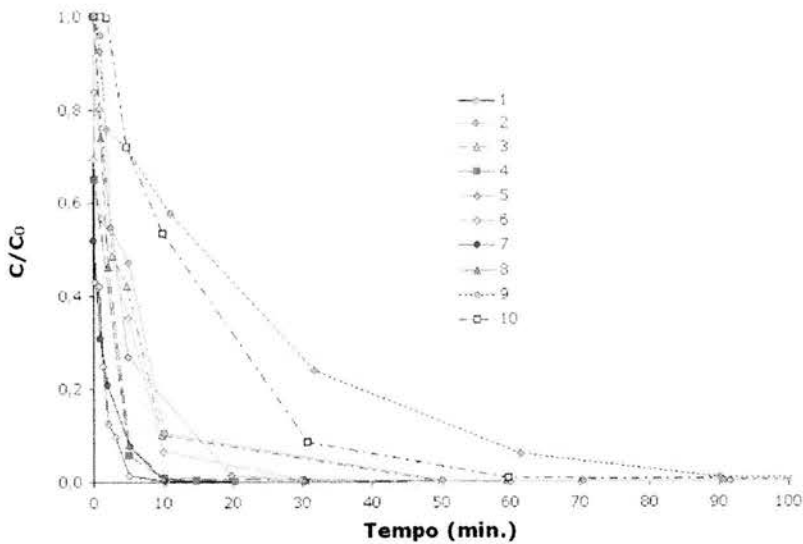


Figura 18. Representação gráfica da variação da concentração de 2,4-DCP ao longo do tempo nos diferentes ensaios

A figura seguinte apresenta os valores de concentração (normalizados) atingidos no final de cada ensaio.

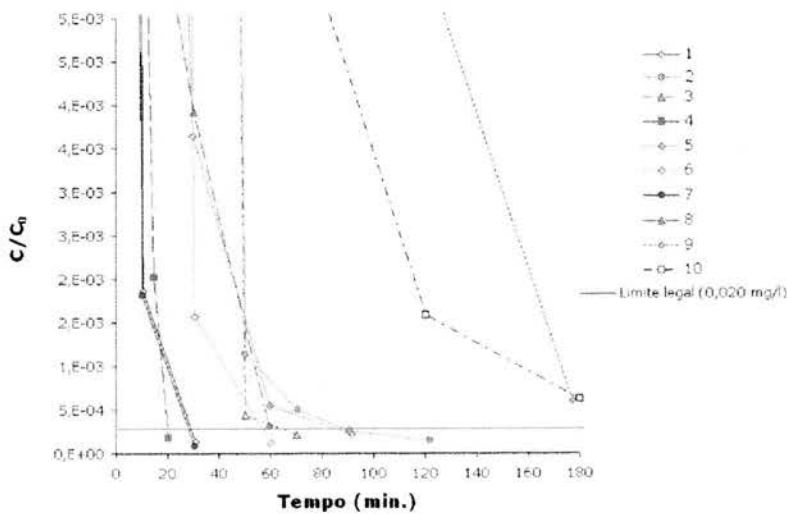


Figura 19. Representação gráfica do limite legal e dos valores de concentração (normalizada) atingidos nos ensaios

Praticamente em todas as experiências o limite legal de 0,02 mg/L foi atingido durante o tempo experimental. Apenas no ensaios 9,10 isso não aconteceu, principalmente devido às condições específicas dos mesmos.

Os resultados foram aplicados a um modelo polinomial, recorrendo a um ajuste por mínimos quadrados. A função obtida relaciona a percentagem de degradação atingida aos 10 minutos de experiência com os factores considerados, nomeadamente concentração inicial de ião ferro, $[Fe^{2+}]$, temperatura e concentração inicial de peróxido, $[H_2O_2]$. Nas situações em que o valor do erro é maior que o parâmetro obtido, esse efeito não foi considerado.

$$\begin{aligned} \% \text{ degradação}_{10 \text{ min}} = & 94,55 (\pm 4,22) + 23,96 \cdot [Fe^{2+}] (\pm 4,48) + 17,40 \cdot T (\pm 6,02) - \\ & 9,04 \cdot T^2 (\pm 8,92) - 21,76 \cdot [H_2O_2]^2 (\pm 7,42) + 4,46 \cdot [H_2O_2] (\pm 0,36) \end{aligned} \tag{9}$$

Pela equação 9 podemos concluir que as interacções entre as variáveis não são significativas e que tanto a concentração de ião ferro como a temperatura têm um efeito positivo na degradação do composto. A concentração de peróxido tem um efeito não linear que é visível nas figuras seguintes, que permitem analisar o efeito geral de cada factor no processo. A Figura 20 relaciona a % de degradação obtida ao fim de 10 minutos de experiência em função das concentrações dos reagentes introduzidos no sistema. As concentrações encontram-se em variáveis codificadas.

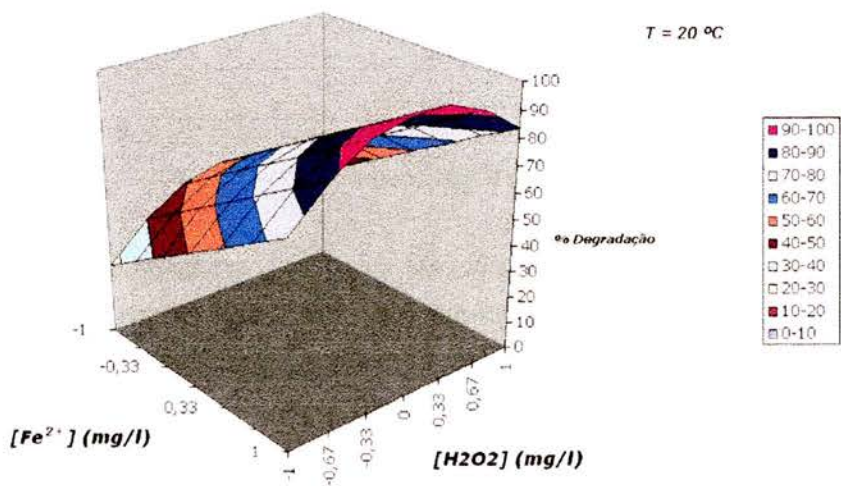


Figura 20. Representação gráfica da % de degradação em função da concentração do ião ferro e peróxido

Pela observação da Figura 20 podemos concluir que o ferro, como se esperava, tem um efeito bastante positivo na degradação de 2,4-DCP. No entanto se a concentração de ferro fosse bastante maior seria de esperar que o excesso de ião se tornasse prejudicial para o processo, como descrito anteriormente no ponto 4.2.1. Contudo, para as condições utilizadas nos ensaios, esse fenómeno não se verificou.

Em termos da concentração de peróxido de hidrogénio, observa-se a existência de um máximo, para o valor de 206 mg/L. Este máximo vem de encontro ao que foi salientado no ponto 4.2.2., nomeadamente no que se refere ao excesso de reagente e à existência de reacções parasitas.

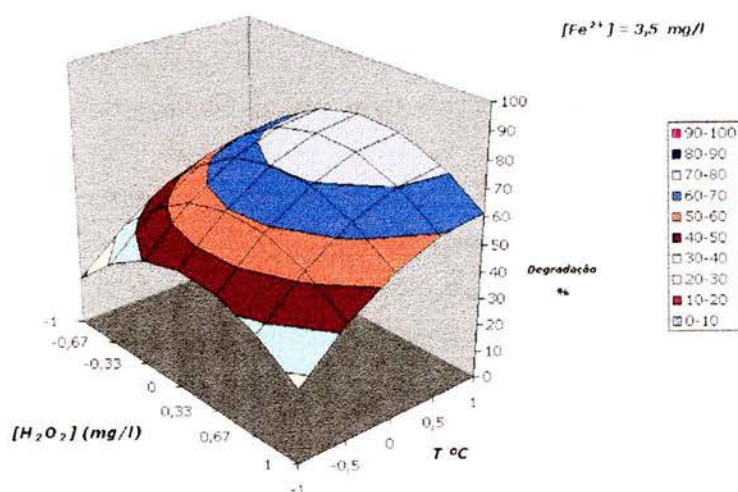


Figura 21. Representação gráfica da % de degradação em função da concentração de peróxido e da temperatura

A Figura 21 representa o efeito da temperatura e da concentração de peróxido de hidrogénio na degradação do composto em estudo. Nota-se que para temperaturas mais elevadas o processo perde eficiência. Este efeito vem igualmente de encontro ao que era esperado (4.2.3.). A temperaturas acima dos 40-50 $^{\circ}C$ a decomposição do peróxido em oxigénio e água é mais acentuada, prejudicando a formação de radicais hidroxilo.

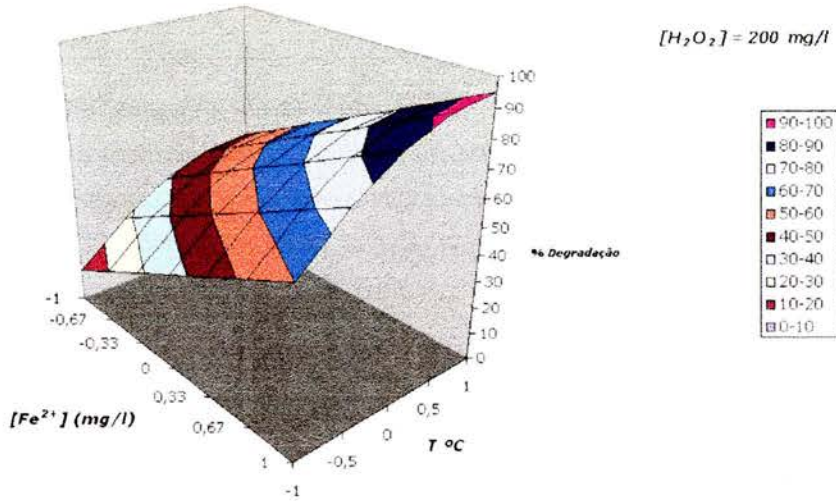


Figura 22. Representação gráfica da % de degradação em função da concentração de ião ferro e da temperatura

A Figura 22 vem confirmar o efeito linear do ião ferro e a importância da temperatura no processo. De notar que, usando as condições óptimas expressas nos gráficos (pH 3,5; temperatura de 40 °C; concentração de ião ferro, $[Fe^{2+}]$, 6,5 mg/L; e concentração de peróxido, $[H_2O_2]$, 206 mg/L), é possível atingir 80-99 % de degradação de 2,4-DCP em apenas 10 minutos de tratamento.

7. Conclusões

O objectivo essencial deste trabalho consistiu no estudo da degradação do 2,4-DCP, um poluente com elevada toxicidade, através da reacção de Fenton. De acordo com tal objectivo, o trabalho desenvolvido dividiu-se em duas partes: validação do método de análise do 2,4-DCP e estudo da degradação desse poluente, bem como da evolução de outras propriedades.

O método de análise para a quantificação do 2,4-DCP baseou-se na técnica de microextração em fase sólida (SPME) seguido por cromatografia gasosa com detecção por captura de electrões (GC-ECD). O limite de detecção obtido para o 2,4-DCP foi 7,38 µg/l, o que comprova a vantagem desta associação na análise de amostras com concentrações baixas de pesticidas. Os ensaios de validação visaram ainda a determinação da incerteza global, obtendo-se aproximadamente 17% para os padrões de concentração mais elevada (20 a 90 µg/l) aumentando consideravelmente para as concentrações mais baixas (máximo de 37,8% para 5 µg/l). Deste modo, os ensaios foram programados de modo a que os seus resultados se situassem nas gamas de concentração mais elevadas, pelo que se poderá considerar aceitável o valor da incerteza global mínima como uma referência válida para a metodologia analítica.

Através dos resultados preliminares obtidos, a oxidação com reagente de Fenton é um processo rápido e eficiente, atingindo-se 99% de composto degradado em curto espaço de tempo, e usando relativamente mínimas quantidades de reagente. O limite legal actual para o composto em estudo é facilmente atingido, recorrendo a condições específicas de ensaio.

Para pH = 3,5 o processo é mais vantajoso, considerando o aspecto eficiência *versus* consumo de reagentes. A concentração de ião ferro tem um efeito linear positivo, i.e., a degradação aumenta com a quantidade de reagente. Contudo, para a temperatura e para a concentração de peróxido, existe um valor óptimo que deve ser tomado para atingir resultados mais eficientes. Nas condições estudadas os resultados mais favoráveis são atingidos a pH 3,5; temperatura de 40 °C; concentração de ião ferro, [Fe²⁺], 5,5 mg/L; e concentração de peróxido, [H₂O₂], 206 mg/L.

Os resultados obtidos nestas experiências são promissores no sentido de utilizar estes sistemas, em escala industrial, na descontaminação de efluentes reais contendo diversos poluentes, podendo estender-se a outros compostos com interesse ambiental.

8. Sugestões futuras

Este processo pode igualmente ser utilizado para compostos de maior toxicidade, nomeadamente o PCP. Será interessante avaliar no futuro o poder oxidante do reagente de Fenton em substâncias mais difíceis de degradar, e sua selectividade para os mesmos. Este objectivo pode ser facilmente atingido tratando uma mistura aquosa de vários compostos (2,4-DCP, PCP, etc.) no sistema implementado neste estudo para degradar unicamente o 2,4-DCP.

9. Bibliografia

- [1] Alquímica - Química Industrial Lda, Disponível em <http://www.alquimica.pa-net.pt/>; Último acesso em Março de 2004
- [2] Aksu, Z. and J. Yener, *A comparative adsorption / biosorption study of mono-chlorinated phenols onto various sorbents*. Waste Management, 21 (2001). p. 695-702.
- [3] Atuanya, E.I.; H.J. Purohit and T. Chakrabarti, *Anaerobic and aerobic biodegradation of chlorophenols using UASB and ASG bioreactors*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16 (2000). p. 95-98.
- [4] Baçaoui, A.; A. Dahbi and A. Yaacoubi, *Experimental design to optimize preparation of activated carbons for use in water treatment*. Environ. Sci. & Technol., 36(17) (2002). p. 3844-3849.
- [5] Baçaoui, A.; A. Yaacoubi; A. Dahbi; C. Bennouna; R.P.T. Luu; F.J. Maldonado-Hodar; J. Rivera-Utrilla and C. Moreno-Castilla, *Optimization of conditions for the preparation of activated carbons from olive-waste cakes*. Carbon, 39 (2001). p. 425-432.
- [6] Çatalkaya, E.; U. Bali and F. Sengul, *Photochemical Degradation and Mineralization of 4.-Chlorophenol*. Environ. Sci. & Pollut., (2003). p. 113-120.
- [7] Chen, J.; W.H. Rulkens and H. Bruning, *Photochemical elimination of phenols and COD in industrial wastewaters*. Water Science Technology, 35 (4) (1997). p. 231-238.
- [8] Decreto-Lei nº 506/99, in *Diário da República - I Série A*. (1999). p. 8273-8275.
- [9] Desmurs, J.R. and S. Ratton, *Chlorophenols*, Kirk-Otmer Encyclopaedia of Chemical Technology. (2000).
- [10] Directiva 86/280/EEC, in *Official Journal of the European Communities L181*. (1986). p. 1-34.
- [11] Eurachem / CITAC Guide CG4, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 2th ed, Ellison, Rosslein, and W. Editors. 2000
- [12] Fukushima, M. and K. Tatsumi, *Degradation pathways of pentachlorophenol by photo-Fenton systems in the presence of iron(III), humic acid, and hydrogen peroxide*. Environ. Sci. & Technol., 35 (9) (2001). p. 1771-1778.
- [13] Henke, G.A., *Bioremediation*. (2001): Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry.
- [14] Hugül, M.; R. Apak and S. Demirci, *Modeling the kinetics of UV / hydrogen peroxide oxidation of some mono-, di-, and trichlorophenols*. Journal of Hazardous Materials, B77 (2000). p. 193-208.

- [15] Huling, S.G.; R.G. Arnold; R.A. Sierka; P.K. Jones and D.D. Fine, *Contaminant Adsorption and Oxidation Via Fenton Reaction*. Journal of Environmental Engineering, 126 (2000). p. 595-600.
- [16] Lord, H. and J. Pawliszyn, *Evolution of Solid-Phase Microextraction Technology*. Journal of Chromatography A, 885 (2000). p. 155-193.
- [17] Mckinzi, A. and T.J. Dichristina, *Microbially Driven Fenton Reaction for Transformation of Pentachlorophenol*. Environ. Sci. Technol., 33 (1999). p. 1886-1891.
- [18] Montgomery, C., *Design and analysis of experiments*. 5th ed. John Wiley & Sons, New York, 2001
- [19] Muller, F. and L. Caillard, *Chlorophenols, Ullmann's Encyclopaedia of Industrial Chemistry*. 2001
- [20] Ormad, M.P. and J. Kiwi, *Photocatalytic degradation of concentrated solutions of 2,4 - Dichlorophenol using low energy light*. Elsevier, (2000).
- [21] Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction - Theory and Practice*. Wiley-VCH, 1997
- [22] Pera-Titus, M.; V. Garcia-Molina and M. Banos, *Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: a general review*. App. Catal. B-Environ., 47 (2003). p. 219-256.
- [23] Pérez, M.; F. Torrades; J. Peral and H.D. Mansilla, *Experimental design of Fenton and photo-Fenton reactions for the treatment of cellulose bleaching effluents*. Chemosphere, 53(10) (2003). p. 1211-1220.
- [24] Ratola, N., Adsorção de Micropoluentes por Casca e Pinheiro - Estudo da Interferência de Metais Pesados no Processo de Adsorção de Pesticidas Organoclorados, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, (2002)
- [25] Ribeiro, A., Poluentes Orgânicos Prioritários em Lixiviados de Aterros Sanitários. Dissertação de Mestrado do Curso de Mestrado em Engenharia do Ambiente, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, (2001)
- [26] Rosatto, S.S.; R.S. Freire; N. Dúran and I.T. Kubota, *Biossensores Amperométricos para determinação de compostos fenólicos de amostras de Interesse Ambiental*. Química Nova, (2001). p. 77-86.
- [27] Robinson, J.F., *Contemporary Chemical Analysis*. Prentice Hall, (1998).
- [28] Sabhi, S. and J. Kiwi, *Degradation of 2,4-Dichlorophenol by immobilized iron catalysts*. Wat. Res., 35 (8) (2001). p. 1994-2002.
- [29] SAS, JMP The Statistical Discovery Software, www.jmp.com/product/jmp_intro.shtml; Last accessed April 2004
- [30] Sauleda, R. and E. Brillas, *Mineralization of aniline and 4-chlorophenol in acidic solution by ozonation catalysed with Fe²⁺ and UVA light*. Applied Catalysis B-Environmental, 29 (2001). p. 135-145.
- [31] Solvay, Oxidation of Aromatics with Hydrogen Peroxide, Disponível em www.solvayinterox.com; Último acesso em Março 2004

- [32] Steinle, P.; G. Stucki; R. Stettler and K.W. Hanselmann, *Aerobic Mineralization of 2,6-Dichlorophenol by Ralstonia sp. Strain RK1*. Applied and Environmental Microbiology, 64 (7) **(1998)**. p. 2566-2571.
- [33] US-EPA, *Ambient Water Quality Criteria for 2,4-Dichlorophenol*. **(1980)**.
- [34] US-EPA, Method 625 - Semi volatile compounds - Spectrum Laboratories, Disponível em www.speclab.com/compound/m625.html; Último acesso em Março de **2004**
- [35] US-Peroxide, Peroxide Applications, www.h2O2.com; Last accessed April **2004**
- [36] Valenzuela, J.; U. Bumann; R. Céspedes; L. Padilla and B. González, *Degradation of chlorophenols by Alcaligenes eutrophus JMP134(pJP4) in bleached kraft mill effluent*. Applied and Environmental Microbiology, 63 (1) **(1997)**. p. 227-232.

Anexo A – Ensaios Preliminares – Determinação do pH ótimo

Neste anexo, apresentam-se os resultados obtidos nas experiências efectuadas com reagente de Fenton para determinação do pH mais favorável.

Tabela A1. Resultados para pH = 3

Amostra	t (min.)	pH	T (°C)	C (mg/l)	C/C ₀	Degradação (%)
1,0	0,00	3,02	30,70	142,04	1	-
1,1	0,01	3,01	30,70	89,19	0,62	37,21
1,2	3,00	2,98	30,80	73,55	0,51	48,22
1,3	6,00	2,96	30,80	63,53	0,44	55,27
1,4	9,00	2,92	30,80	45,38	0,31	68,05
1,5	12,00	2,89	30,80	44,42	0,31	68,73
1,6	15,00	2,85	30,80	39,78	0,28	71,99
1,7	20,00	2,80	30,80	23,34	0,16	83,57
1,8	25,00	2,77	30,90	19,41	0,13	86,34
1,9	30,00	2,74	30,70	8,63	0,06	93,92
1,10	60,00	2,68	30,90	1,37	0,009	99,04
1,11	90,00	2,65	30,90	0,28	0,001	99,80
1,12	120,00	2,64	30,80	0,18	0,001	99,88
1,13	240,00	2,62	30,80	0,02	0,0001	99,98
1,14	300,00	2,62	30,90	0,02	0,0001	99,99

Tabela A2. Resultados para pH = 3,5

Amostra	t (min.)	pH	T (°C)	C (mg/l)	C/C ₀	Degradação (%)
2,0	0,00	3,58	30,40	144,43	1,000	-
2,1	2,05	3,38	30,30	125,54	0,869	13,08
2,2	3,02	3,35	30,30	95,04	0,658	34,20
2,3	4,17	3,30	30,30	88,56	0,613	38,68
2,4	5,27	3,27	30,30	84,91	0,588	41,21
2,5	7,13	3,21	30,30	76,65	0,531	46,93
2,6	8,17	3,17	30,30	58,96	0,408	59,18
2,7	10,13	3,12	30,30	40,46	0,280	71,99
2,8	11,00	3,05	30,30	39,79	0,275	72,45
2,9	16,00	2,99	30,50	32,32	0,224	77,62
2,10	21,00	2,93	30,50	20,34	0,141	85,92
2,11	30,05	2,86	30,50	10,09	0,070	93,01
2,12	59,60	2,77	30,50	2,47	0,017	98,29
2,13	92,17	2,73	30,50	0,29	0,002	99,80
2,14	121,50	2,72	30,50	0,19	0,001	99,87
2,15	300,00	2,70	30,50	0,02	0,000	99,99

Tabela A3. Resultados para pH = 4

Amostra	t (min.)	pH	T (°C)	C (mg/l)	C/C ₀	Degradação (%)
3,0	0,00	3,93	30,70	129,54	1	-
3,1	0,08	3,76	30,80	122,69	0,94	5,29
3,2	3,07	3,61	30,80	96,52	0,74	25,49
3,3	6,13	3,50	30,80	86,95	0,67	32,88
3,4	9,15	3,42	30,70	76,22	0,58	41,16
3,5	12,05	3,36	30,70	63,39	0,48	51,07
3,6	15,07	3,30	30,90	48,38	0,37	62,65
3,7	20,07	3,21	30,90	37,47	0,29	71,08
3,8	25,43	3,15	30,80	24,50	0,18	81,09
3,9	60,47	2,94	30,90	10,13	0,078	92,18
3,10	90,50	2,89	30,90	0,67	0,0051	99,48
3,11	122,25	2,88	30,90	0,63	0,0049	99,51
3,12	160,78	2,83	30,90	0,52	0,0041	99,60
3,13	184,90	2,83	30,90	0,26	0,0020	99,80
3,14	301,27	2,79	30,80	0,12	0,00093	99,91
3,15	391,72	2,78	30,80	0,05	0,00040	99,96

Tabela A4. Resultados para pH = 5

Amostra	t (min.)	pH	T (°C)	C (mg/l)	C/C ₀	Degradação (%)
4,0	0,00	5,24	30,70	130,87	1	-
4,1	0,08	4,01	30,70	98,53	0,75	24,71
4,2	3,12	3,80	30,80	91,93	0,70	29,75
4,3	6,67	3,72	30,80	84,62	0,64	35,34
4,4	12,05	3,63	30,80	59,99	0,45	54,16
4,5	15,05	3,58	30,80	56,29	0,43	56,99
4,6	60,17	3,14	30,90	21,14	0,16	83,85
4,7	105,37	2,94	30,90	2,83	0,021	97,84
4,8	187,70	2,85	30,90	0,33	0,0025	99,75
4,9	241,08	2,82	30,90	0,11	0,00084	99,92

ANEXO B – Fundamento teórico e cálculos intermédios referentes ao estudo estatístico da linearidade

Apresentam-se neste anexo, o modo de preparação dos padrões utilizados na obtenção da recta de calibração, bem como o fundamento teórico e todos os resultados experimentais que serviram de base à obtenção da referida recta.

B.1 – Modo de preparação dos padrões

Foram preparadas soluções mãe de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP do seguinte modo:

- solução mãe M₁ de 2,4-DCP à concentração de 516 mg/l: pesaram-se 12,9 mg de 2,4-DCP, as quais foram dissolvidas em isopropanol num balão volumétrico de 25 ml.
- solução mãe M₂ de 2,4-DCP à concentração de 5,16mg/l: retirou-se um volume de 250 µl da solução mãe M₁ de 2,4-DCP os quais foram diluídos em isopropanol, num balão volumétrico de 25 ml.
- solução mãe M₁ de 2,4,6-TCP à concentração de 1012 mg/l: pesaram-se 25,3 mg de 2,4,6-TCP, as quais foram dissolvidas em isopropanol num balão volumétrico de 25 ml.
- solução mãe M₂ de 2,4,6-TCP à concentração de 5,06 mg/l: retirou-se um volume de 100 µl da solução mãe M₁ de 2,4,6-TCP os quais foram diluídos em isopropanol, num balão volumétrico de 20 ml.

A partir das soluções mãe M₂ de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP, prepararam-se, em água destilada, os padrões a extrair por SPME. Os volumes utilizados na preparação dos padrões encontram-se na tabela seguinte. O padrão interno (2,4,6-TCP) foi adicionado a todos os padrões à concentração de 5 µg/l.

Tabela B1. Volumes utilizados na preparação dos padrões de 2,4-DCP para a obtenção da recta de calibração.

Concentração padrão (µg/l)	Concentração real (µg/l)	Volume a retirar da solução M ₂ de 2,4-DCP (µl)	Volume a retirar da solução M ₂ de 2,4,6-TCP (µl)	Capacidade do balão volumétrico (ml)
5	5,16	25	25	25
10	10,32	50	25	25
20	20,64	100	25	25
40	41,28	200	25	25
60	61,92	300	25	25
90	92,88	450	25	25

Como foi referido, a adição de sal e o pH são factores que influenciam a eficiência da extracção. Deste modo, transferiu-se o conteúdo dos balões volumétricos para frascos de vidro escuro de 30 ml, adicionaram-se 1 ml de ácido sulfúrico a procedeu-se à sua agitação num vortex.

B.2 – Resultados obtidos na quantificação dos padrões de 2,4-DCP

Na tabela seguinte apresentam-se os resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração que serviu de base ao estudo dos parâmetros de validação.

Tabela B2. Resultados obtidos na análise dos padrões preparados para a obtenção da recta de calibração.

[2,4-DCP] (µg/l)	A _{DCP} /A _{TCP}	Média	Desvio padrão	CV (%)
5,16	0,018	0,019	1,31E-03	6,78
	0,020			
10,32	0,030	0,026	5,8E-03	22,33
	0,022			
21,64	0,073	0,077	5,4E-03	7,06
	0,081			
41,28	0,225	0,228	3,7E-03	1,61
	0,231			
61,92	0,395	0,381	2,0E-02	5,13
	0,367			
92,88	0,649	0,649	3,2E-04	0,049
	0,649			

Com base nos dados da tabela anterior pode-se conhecer a equação da recta de calibração, (equação (B1)) e calcular os parâmetros apresentados na tabela B3.

$$y = 7,33 \times 10^{-3} \cdot x - 5,21 \times 10^{-2}$$

(B1)

onde y é a razão das áreas de 2,4-DCP e 2,4,6-TCP e x é a concentração de 2,4-DCP.

Tabela B3. Parâmetros necessários para o estudo da linearidade da resposta do GC-ECD.

Padrão (ppb)	x _i	x _i ²	y _i	y _{calc}	(y _i -y _{calc}) ²	(y _i -y _{medio})	(x _i -x _{medio}) ²	S _{xo}
5	5,16	26,63	0,02	-0,01	0,00112	-0,2110	1124,93	3,35
10	10,32	106,50	0,03	0,02	0,00001	-0,2040	805,42	3,33
20	20,64	426,01	0,08	0,10	0,00046	-0,1530	326,16	3,20
40	41,28	1704,04	0,23	0,25	0,00043	-0,0020	6,66	3,03
60	61,92	3834,09	0,38	0,40	0,00033	0,1510	539,17	3,20
90	92,88	8626,69	0,65	0,63	0,00058	0,4190	2935,47	4,14
Soma		14723,96			0,00293		5737,82	
Média	38,70	2453,99						

Os valores apresentados na tabela anterior foram calculados com base nas equações seguintes:

$$y_{\text{calc}} = 7,33 \times 10^{-3} \cdot x_i - 5,21 \times 10^{-2} \quad (\text{B2})$$

$$s_{x0} = \frac{s_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_i - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B3})$$

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - y_{\text{calc}})^2}{N - 2}} \quad (\text{B4})$$

em que,

y_{calc} = valores da razão das áreas calculados, para cada valor de x_i , com base na recta de calibração

y_i = valores da razão das áreas obtidos experimentalmente

x_i = concentração do padrão

s_{x0} = desvio padrão associado ao valor de concentração

$s_{y/x}$ = desvio padrão residual

b = declive da recta de calibração

N = número de pontos experimentais (neste caso, $N=6$)

n = número de ensaios efectuados para cada padrão (neste caso, $n=2$)

$\bar{x}$ = média dos valores de concentração dos padrões

$\bar{y}$ = média dos valores de área obtidos experimentalmente.

Os parâmetros do estudo de linearidade foram determinados para um nível de confiança de 95% e com base nas equações seguintes,

$$s_a = s_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B5})$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{B6})$$

onde s_a e s_b são, respectivamente, o desvio padrão associado à ordenada na origem e o desvio padrão associado ao declive. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela B4.

Tabela B4 – Parâmetros do estudo da linearidade, calculados para um nível de confiança de 95%.

t_{student}	S_{y/x}	S_b	S_a
2,776	2,71×10 ⁻²	3,57×10 ⁻⁴	1,77×10 ⁻²

Com base nos valores apresentados anteriormente, e nas equações que se apresentam de seguida, estabeleceram-se os intervalos de confiança para o declive *b*, *IC_b*, e ordenada na origem *a*, *IC_a*, que se encontram na tabela B5.

$IC_b = t_{student} \cdot S_b$

(B7)

$IC_a = t_{student} \cdot S_a$

(B8)

Tabela B5 – Intervalos de confiança correspondentes ao declive e à ordenada na origem, para um nível de confiança de 95%.

	Intervalo de confiança	Valor determinado	Mínimo	Máximo
Declive (b)	9,90×10 ⁻⁴	7,33×10 ⁻³	6,29×10 ⁻³	8,29×10 ⁻³
Ordenada na origem (a)	4,914×10 ⁻²	-5,21×10 ⁻²	-1,02×10 ⁻¹	-3,00×10 ⁻³

A partir destes valores obtiveram-se as bandas de confiança para cada valor de concentração da recta de calibração (equações (B9) e (B10)), permitindo o traçado das rectas limite máxima e mínima representadas na figura 18.

$y_{i\max} = b_{\max} \cdot x_i + a_{\max}$

(B9)

$y_{i\min} = b_{\min} \cdot x_i + a_{\min}$

(B10)

Com base na equação (B11) determinou-se o limite de detecção do método:

$y_{LD} = a + 3 \cdot s_a = 9,60 \times 10^{-4} \Rightarrow x_{LD} = 7,28 \mu\text{g/l}$

(B11)

ANEXO C – Fundamento teórico e cálculos intermédios na determinação da incerteza global do método

Neste anexo, apresentam-se o fundamento teórico e os resultados obtidos na determinação da incerteza global do método.

C.1 – Incerteza associada à preparação dos padrões, U_1

Esta incerteza foi calculada por recurso à expressão:

$$U_1 = \sqrt{\sum_i \left(\frac{\Delta m_i}{m_i} \right)^2} \quad (C1)$$

onde Δm_i é o erro associado à medição de um determinado parâmetro, como por exemplo, a pesagem de um reagente e a preparação das soluções e m_i é o valor medido do respectivo parâmetro.

As incertezas associadas à preparação das soluções mãe de 2,4-DCP indicam-se de seguida.

Solução mãe M_1

Para preparar a solução M_1 de 2,4-DCP pesaram-se cerca de 12,9 mg de 2,4-DCP, as quais foram diluídas num balão volumétrico de 25 ml com água destilada.

Massa (2,4-DCP) = $12,9 \pm 0,1$ mg

Volume (solução M_1) = $25 \pm 0,04$ ml

A concentração desta solução é de 516 mg/l. A incerteza relativa associada a esta concentração é calculada por:

$$\text{incerteza relativa} = \sqrt{\left(\frac{0,1}{12,9} \right)^2 + \left(\frac{0,04}{25} \right)^2} = 7,91 \times 10^{-3} \quad (C2)$$

Solução mãe M_2

A solução M_2 foi preparada por diluição de 250 μ l da solução M_1 num balão volumétrico de 25 ml com água destilada.

Incerteza relativa da solução M_1 = $7,91 \times 10^{-3}$

Incerteza relativa da micropipeta para um volume de 250 μ l = $6,67 \times 10^{-3}$ (informação retirada do catálogo da Socorex para uma micropipeta com capacidade de volume de 100-1000 μ l)

Volume (solução M_2) = $25 \pm 0,04$ ml

A concentração desta solução é de 5,16 mg/l. A incerteza relativa associada a esta concentração é calculada por:

$$\text{incerteza relativa} = \sqrt{(7,91 \times 10^{-3})^2 + (6,67 \times 10^{-3})^2 + \left(\frac{0,04}{25}\right)^2} = 1,10 \times 10^{-2} \quad (\text{C3})$$

Os padrões utilizados na obtenção da recta de calibração foram preparados a partir da solução M₂. Na tabela seguinte são apresentados os volumes dessa solução medidos para cada nível de concentração, a incerteza associada à medição destes volumes e a incerteza associada ao volume do balão volumétrico. Considerou-se desprezável a contribuição do 2,4,6-TCP na preparação dos padrões uma vez que é introduzido um volume muito reduzido.

Tabela C1. Incertezas associadas à preparação dos padrões para a obtenção da recta de calibração.

Padrão (µg/l)	Solução mãe M ₂		Volume retirado de M ₂		Balão volumétrico		Incerteza relativa (%)
	Conc. mg/L	Incerteza relativa	Volume (µl)	Incerteza relativa	Volume (ml)	Incerteza (ml)	
5,16	5,16	1,10×10 ⁻²	25	7,16×10 ⁻³	25	0,04	1,50
10,32			50	7,11×10 ⁻³	25	0,04	1,50
20,64			100	7,00×10 ⁻³	25	0,04	1,50
41,28			200	6,78×10 ⁻³	25	0,04	1,49
61,92			300	6,56×10 ⁻³	25	0,04	1,48
92,88			450	6,22×10 ⁻³	25	0,04	1,46

C.2 - Incerteza associada à recta de calibração, U₂

Calculou-se a incerteza relativa associada ao cálculo do valor de concentração obtido pela recta (S_{x0}), ou seja:

$$U_2 = \frac{S_{x0}}{x_0} \quad (\text{C4})$$

no qual s_{x0} é o desvio padrão da concentração calculado pela equação (B3), e x₀ é a concentração calculada através da recta de calibração. Os resultados indicam-se na tabela C2.

Tabela C2. Incertezas associadas à determinação da recta de calibração.

Padrão (µg/l)	S _{x0}	U ₂ (%)
5,16	3,35	34,23
10,32	3,33	31,22
20,64	3,21	18,11
41,28	3,04	7,90
61,92	3,20	5,39
92,88	4,15	4,31

C.3 - Incerteza associada à precisão do método, U_3

A partir dos dados de validação para a precisão intermédia calculou-se a incerteza relativa através de:

$$U_3 = \frac{s}{\sqrt{n} \times C} \quad (C5)$$

em que s é o desvio padrão das n medições da mesma amostra e C a concentração média do composto a analisar. A incerteza absoluta é dada por:

$$\text{incerteza absoluta} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (C6)$$

Os resultados indicam-se na tabela C3.

Tabela C3. Valores da concentração de 2,4-DCP obtidas nos ensaios de precisão, para a concentração de 40 µg/l, e incertezas associadas.

	Concentração amostra 40 µg/l
Dia 1	62,32
Dia 2	41,04
Dia 3	64,46
Dia 4	52,76
Dia 5	32,88
n	5
Média	50,69
Desvio padrão	13,59
Precisão (CV %)	26,8%
Incerteza relativa (U_3)	12,0%
Incerteza absoluta	6,08

C.4 - Incerteza associada à exactidão do método, U_4

Realizaram-se ensaios de adição de padrão a uma amostra real, calcularam-se as percentagens de recuperação (R) e o valor da incerteza é dado por:

$$U_4 = \frac{R_{\text{máx}} - R_{\text{mín}}}{R_{\text{médio}} \times \sqrt{n}} \quad (C7)$$

Contudo, por vezes, o valor dado pela equação anterior é demasiado elevado não correspondendo à situação real, utilizando-se a equação (C5) para determinar esta incerteza.

No caso desta experiência optou-se por determinar a incerteza relativa associada à exactidão por recurso à equação (C5), uma vez que a determinada pela equação (C7) apresentava valores muito elevados. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela seguinte.

Tabela C6. Valores de recuperação obtidos e incertezas associadas à exactidão do método (valores em %).

	Concentração amostra 40 µg/l
1	99,8
2	134,4
3	116,7
4	114,1
5	129,4
6	135,2
7	109,7
n	7
média	119,9
Desvio padrão	13,5
Incerteza relativa (U ₄)	4,24%

C.5 - Incerteza global, U

A incerteza global é dada pela equação (7). Exemplificando para o nível de concentração 5,16 µg/l de 2,4-DCP:

$$U = \sqrt{1,50^2 + 34,23^2 + 12,0^2 + 4,24^2} \Rightarrow U = 36,55\%$$

O procedimento para determinar a incerteza global para os restantes níveis de concentração foi idêntico.

Anexo D – Oxidação com reagente de Fenton – Exemplo de Cálculo

Dados:

M (2,4-DCP) = 162,9 g/mol

M (FeSO₄.H₂O) = 277,86 g/mol

M (Na₂SO₃) = 126,02 g/mol

[2,4-DCP] solução mãe ≈ 3 g/l = 2,98 g/l

[H₂O₂] solução disponível = 339 g/l

Volume do reactor = 0,26 l

Volume das amostras = 1 ml

pH = 3,5

T = 30 °C

No reactor, no instante inicial:

[H₂O₂] = 200 mg/l

[2,4-DCP] = 100 mg/l

Volume a retirar da solução-mãe de 2,4-DCP para obter no reactor, no instante zero, a concentração indicada de 100 mg/l:

Volume a retirar da solução de H₂O₂ para obter no reactor, no instante zero, a concentração indicada de 200 mg/l:

$$V = \frac{100 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot \frac{1}{1000} \frac{\text{g}}{\text{mg}} \cdot 0,26\text{l}}{2,98 \frac{\text{g}}{\text{l}}} = 8,72\text{ml}$$

$$V = \frac{200 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot \frac{1}{1000} \frac{\text{g}}{\text{mg}} \cdot 0,26\text{l}}{339 \frac{\text{g}}{\text{l}}} = 0,153\text{ml}$$

Massa de FeSO₄.7H₂O a adicionar:

Para obter uma razão Fe²⁺/H₂O₂ = 0,00250 (g/g) temos :

$$m \text{Fe}^{2+} = 0,0025 \cdot m \text{H}_2\text{O}_2 = 0,0025 \cdot \frac{200 \text{ mg}}{\text{l}} \cdot \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \cdot 0,26 \text{ l} = 0,13 \text{ mg}$$

Sendo que $\text{mol Fe}^{2+} = \text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ então:

$$\frac{1,3 \cdot 10^{-4} \text{ g}}{55,8 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = \frac{m \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}}{277,6 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \Leftrightarrow m \text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 6,74 \text{ mg}$$

Massa de Na_2SO_3 a adicionar às amostras:

$$\text{mol Na}_2\text{SO}_3 = \text{mol H}_2\text{O}_2$$

$$\frac{200 \frac{\text{mg}}{\text{l}} \cdot 1 \text{ ml}}{34 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 5,88 \cdot 10^{-6} \text{ mol}$$

$$m \text{Na}_2\text{SO}_3 = 5,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot 126,02 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,741 \text{ mg}$$





FACULDADE DE ENGENHARIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

BIBLIOTECA



0000091309



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

prodep III

Mais Educação