

MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO MONITORAMENTO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS



ORGANIZAÇÃO:

Leandro Augusto G. de Godoi

Rachel Biancalana Costa

Renata de Bello Solcia Guerrero

Carla Eloísa Diniz dos Santos

Carolina Ap. Sabatini Mirandola

Maria Angela Tallarico Adorno



Leandro Augusto Gouvêa de Godoi
Rachel Biancalana Costa
Renata de Bello Solcia Guerrero
Carla Eloísa Diniz dos Santos
Carolina Ap. Sabatini Mirandola
Maria Angela Tallarico Adorno
(Organizadores)

MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO MONITORAMENTO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS DE
TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

EESC/USP
São Carlos
2021

DOI: 10.11606/9786586954067

Universidade de São Paulo

Reitor – Prof. Dr. Vahan Agopyan

Vice-Reitor – Prof. Dr. Antonio Carlos Hernandez

Escola de Engenharia de São Carlos

Diretor – Prof. Dr. Edson Cezar Wendland

Vice-diretor – Prof. Dr. Denis Vinicius Coury

Ficha catalográfica elaborada pela Seção de Atendimento ao
Usuário do Serviço de Biblioteca “Prof. Dr. Sérgio Rodrigues
Fontes”

M593 Métodos analíticos aplicados ao monitoramento de
processos biológicos de tratamento de águas
residuárias / Organizadores: Leandro Augusto Gouvêa
de Godoi ... [et al]. - São Carlos: EESC/USP,
2021.

261 p.
ISBN: 978-65-86954-06-7
DOI: 10.11606/9786586954067

1. Análises físico-químicas. 2. Amostras ambientais.
3. Águas residuárias. 4. Efluentes. 5. Processos
biológicos. 6. Biogás. I. Godoi, Leandro Augusto Gouvêa
de. II Costa, Rachel Biancalana. III Guerrero, Renata de
Bello Solcia.

Eduardo Graziosi Silva – CRB-8/8907

Esta obra é de acesso aberto. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e
autoria e respeitando a Licença Creative Commons indicada.



MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS AO MONITORAMENTO DE PROCESSOS BIOLÓGICOS DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

MANUAL DE LABORATÓRIO

O presente Manual foi elaborado para utilização dos usuários do Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da EESC-USP, e não tem o objetivo de substituir livros, dissertações, teses e artigos sobre os métodos analíticos apresentados.

Este Manual **é apenas para consulta, não constituindo material original, e não devendo, por isso, ser citado como bibliografia.** As referências devem ser feitas às fontes originais, indicadas em cada capítulo e listadas na seção final.

É de responsabilidade de cada pesquisador conhecer em profundidade os métodos analíticos que serão empregados em seu trabalho. Para conhecer demandas específicas, consulte diretamente as referências indicadas.

Vale lembrar que as metodologias aqui apresentadas foram convenientemente adaptadas para a utilização dentro da rotina e estrutura do LPB, mas podem ser facilmente implementadas em outros laboratórios, com as devidas adaptações.

2021

(Versão revista e ampliada)

ELABORAÇÃO

VERSÃO 2010

ANA PAULA SILVEIRA PAIM
CATARINA SIMONE DO CANTO
ELIZABETH DE MATTOS MORAES
EUGENIO FORESTI
JOSÉ ALBERTO DOMINGUES RODRIGUES
LEONARDO HENRIQUE SOARES DAMASCENO
MARCELO ZAIAT
MARIA ANGELA TALLARICO ADORNO
SUZANA MARIA RATUSZNEI
WALTER BORZANI

Versão 2021

LEANDRO AUGUSTO GOUVÊA DE GODOI (ORGANIZADOR)
RACHEL BIANCALANA COSTA (ORGANIZADORA)
RENATA DE BELLO SOLCIA GUERRERO (ORGANIZADORA)
CARLA ELOÍSA DINIZ DOS SANTOS (ORGANIZADORA)
CAROLINA AP. SABATINI MIRANDOLA (ORGANIZADORA)
MARIA ANGELA TALLARICO ADORNO (ORGANIZADORA)

ALANA GANDRA LIMA DE MOURA
ALEJANDRA CAROLINA VILLA MONTOYA
BRUNO GARCIA SILVA
CAMILA ABREU BORGES SILVA RABELO
ELIS WATANABE NOGUEIRA
JÉSSICA COSTA LOPES
GUILHERME SOARES CAVALCANTE
JEAN MAIKON SANTOS OLIVEIRA
LAÍS AMÉRICO SOARES
LUCAS TADEU FUESS
MARIA EDUARDA SIMÕES DIAS
MIRABELLE PEROSSI CUNHA
RAFAELA ARANTES STANCARI
RODRIGO BRAZ CARNEIRO
TIAGO DUARTE SANTOS PEREIRA
VANESSA CRISTINA DA SILVA
VERA TAINÁ FRANCO VIDAL MOTA

SUMÁRIO

I. RECOMENDAÇÕES GERAIS.....	13
II. RECOMENDAÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS	16
III. MATÉRIA ORGÂNICA	17
1. SÓLIDOS – MÉTODO GRAVIMÉTRICO.....	18
1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS	18
1.2. MATERIAL.....	19
1.3. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (ST).....	19
1.4. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS FIXOS E VOLÁTEIS (STF E STV)	20
1.5. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST)	20
1.6. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS FIXOS E VOLÁTEIS (SSF E SSV).....	21
1.7. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS DISSOLVIDOS TOTAIS, FIXOS E VOLÁTEIS (SDT, SDF E SDV)	21
1.8. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SEDIMENTÁVEIS E ÍNDICE VOLUMÉTRICO DE LODO (IVL)	21
1.9. ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS (SSV) PELA DQO	23
2. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) – MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	25
2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS	25
2.2. MÉTODO PARA CONCENTRAÇÕES DE DQO ENTRE 90 E 900 MG/L	28
2.3. REMOÇÃO DA INTERFERÊNCIA DEVIDA A SULFETOS (ADAPTADO DE POINAPEN; EKAMA; WENTZEL, 2009)	31
2.4. REMOÇÃO DO EXCESSO DE ÍONS CLORETOS (ADAPTADO DE TZENG E CHEN, 1993).....	32
2.5. REMOÇÃO DE ÍONS NITRITO (ADAPTADO DE AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2005)).....	33
2.6. MÉTODO PARA CONCENTRAÇÕES DE DQO DE 10 A 90 MG/L.....	35
3. CARBOIDRATOS – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	38
3.1. AÇÚCARES TOTAIS – MÉTODO DO FENOL-SULFÚRICO	38
3.2. AÇÚCARES REDUTORES – MÉTODO DO DNS	41
4. PROTEÍNAS – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	44
4.1. MÉTODO DO MICRO-BIURETO.....	44
4.2. PROTEÍNAS – MÉTODO DE LOWRY.....	49
4.3. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE PROTEÍNA BRUTA PELO MÉTODO KJELDAHL	53
5. LIPÍDIOS – MÉTODO DA SULFO-FOSFO-VANILINA (ESPECTROFOTOMÉTRICO)	54
5.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS	54
5.2. MATERIAL.....	54
5.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE VANILINA 0,6%	55
5.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1.000 – 15.000 MG/L)	55
5.5. DETERMINAÇÃO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDIOS (> 1.000 MG/L).....	55

5.6.	AMOSTRAS COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES (< 1.000 MG/L)	56
6.	GLICEROL – MÉTODO ENZIMÁTICO (ESPECTROFOTOMÉTRICO)	58
6.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	58
6.2.	MATERIAL.....	58
6.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE GLICEROL (1.000 MG/L)	59
6.4.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1,0 – 15,0 MG/L)	59
6.5.	PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL	60
7.	ÁCIDO LÁTICO – MÉTODO DO P-FENILFENOL (ESPECTROFOTOMÉTRICO)	61
7.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	61
7.2.	MATERIAL.....	61
7.3.	PREPARO DAS SOLUÇÕES REAGENTES	62
7.4.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (2,5 – 30 MG/L)	62
7.5.	PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS COMPLEXAS (BARKER & SUMMERSON, 1941)	63
7.6.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO	63
IV.	COMPOSTOS RECALCITRANTES.....	65
8.	FENÓIS TOTAIS – MÉTODO DA 4-AMINOANTIPIRINA (ESPECTROFOTOMÉTRICO).....	67
8.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	67
8.2.	MATERIAL.....	68
8.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE 4-AMINOANTIPIRINA (20,8 MM EM NAHCO ₃ 0,25 M)	68
8.4.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO (83,4 MM EM NAHCO ₃ 0,25 M)	69
8.5.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA (1 M).....	69
8.6.	PREPARO DE ÁGUA DE DILUIÇÃO DESOXIGENADA	69
8.7.	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE FENOL (10 G/L)	69
8.8.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,5 – 12,5 MG/L)	70
8.9.	DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS	71
8.10.	PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS CONTENDO SULFETOS (ADAPTADO DE GORDON (1960)).....	71
9.	TANINOS E LIGNINAS (POLIFENÓIS TOTAIS) – MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	72
9.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	72
9.2.	MATERIAL.....	72
9.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE METANOL ACIDIFICADO (HCl 1% v/v)	73
9.4.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE CARBONATO DE SÓDIO 7,5% (M/V)	73
9.5.	PREPARO DE ÁGUA DE DILUIÇÃO DESOXIGENADA	73
9.6.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE FOLIN-CIOCALTEU 10% (V/V)	73
9.7.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (5 – 50 MG EQ. ÁCIDO GÁLICO/L)	74
9.8.	DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS	74
10.	LIGNINA – MÉTODO GRAVIMÉTRICO (LIGNINA KLASON)	75

10.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS.....	75
10.2.	INTERFERENTES.....	76
10.3.	MATERIAL.....	76
10.4.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 72% (M/M).....	77
10.5.	PREPARO DAS AMOSTRAS.....	77
10.6.	DETERMINAÇÃO DE LIGNINA KLASON.....	78
10.7.	DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL EM ÁCIDO.....	80
10.8.	PREPARO DA AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS.....	80
11.	SURFACTANTES ANIÔNICOS – MÉTODO MBAS (ESPECTROFOTOMÉTRICO)	82
11.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	82
11.2.	MÉTODO MBAS SIMPLIFICADO.....	83
11.3.	MÉTODO MBAS ORIGINAL.....	87
V.	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	92
12.	PH – MÉTODO POTENCIOMÉTRICO.....	93
12.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	93
12.2.	MATERIAL.....	94
12.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE ACONDICIONAMENTO (KCL 3 M).....	94
12.4.	PROCEDIMENTO PARA MEDIÇÃO DO PH	94
12.5.	CUIDADOS COM O PHMETRO.....	95
12.6.	LIMPEZA DO ELETRODO DE PH	96
13.	CONDUTIVIDADE E SALINIDADE – MÉTODO CONDUTIMÉTRICO	97
13.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	97
13.2.	MATERIAL.....	98
13.3.	PROCEDIMENTO PARA MEDIDA DE CONDUTIVIDADE	99
13.4.	CALIBRAÇÃO DO SENSOR DE CONDUTIVIDADE.....	99
13.5.	CUIDADOS COM O SENSOR DE CONDUTIVIDADE	100
14.	ALCALINIDADE E ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS (MÉTODOS TITULOMÉTRICOS).....	101
14.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	101
14.2.	MATERIAL.....	102
14.3.	PREPARO E PADRONIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES.....	103
14.4.	DETERMINAÇÃO DE ALCALINIDADE – MÉTODO DE RIPLEY	105
14.5.	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS – MÉTODO DE DILALLO & ALBERTSON	106
14.6.	ALCALINIDADE E ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS – MÉTODO DE KAPP.....	108
14.7.	ALCALINIDADE E ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS – MÉTODO CONDUTIMÉTRICO	111
14.8.	ALCALINIDADE A BICARBONATO DE RESERVA	118
14.9.	ALCALINIDADE DEVIDA A SULFETO	119

15.	COR – MÉTODO DO REGISTRO DO ESPECTRO	121
15.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	121
15.2.	MATERIAL.....	121
15.1.	PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AJUSTE DO PH DA AMOSTRA.....	122
15.2.	PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA	122
15.3.	PROCEDIMENTO PARA LEITURA DAS AMOSTRAS	122
VI.	MACRO-NUTRIENTES E COMPOSTOS RELACIONADOS	124
16.	NITROGÊNIO ORGÂNICO E AMONIAICAL	126
16.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	126
16.2.	DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL KJELDAHL (NTK) E NITROGÊNIO AMONIAICAL – MÉTODO TITULOMÉTRICO	127
16.3.	NITROGÊNIO AMONIAICAL – MÉTODO DO FENOL-HIPOCLORITO (ESPECTROFOTOMÉTRICO)	139
17.	NITRITO – MÉTODO DA SULFANILAMIDA (ESPECTROFOTOMÉTRICO).....	143
17.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS.....	143
17.2.	INTERFERENTES.....	143
17.3.	ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA.....	144
17.4.	MATERIAL.....	144
17.5.	PREPARO DO REAGENTE COLORANTE	145
17.6.	PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AJUSTE DO PH DA AMOSTRA.....	145
17.7.	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO (250 MG N-NO ₂ ⁻ /L)	145
17.8.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE PERMANGANATO DE POTÁSSIO 0,01 M (0,05 N)	145
17.9.	PREPARO DA SOLUÇÃO REDUTORA PARA PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO	146
17.10.	PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO.....	146
17.1.	SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA DE NITRITO (50 MG N-NO ₂ ⁻ /L)	147
17.2.	SOLUÇÃO MÃE DE NITRITO (500 µG N-NO ₂ ⁻ /L).....	148
17.3.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (50 – 500 µG N-NO ₂ ⁻ /L)	148
17.4.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO	148
18.	NITRATO – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS	150
18.1.	MÉTODO DA ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA	150
18.2.	NITRATO – MÉTODO DO ÁCIDO CROMOTRÓPICO	154
18.3.	NITRATO + NITRITO – MÉTODO DA REDUÇÃO COM CÁDMIO	157
19.	SULFATO – MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS.....	161
19.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	161
19.2.	MÉTODO DO TAMPÃO ACETATO	162
19.3.	SULFATO – MÉTODO DA SOLUÇÃO CONDICIONADORA	166
20.	SULFETO	169

20.1.	MÉTODO DO AZUL DE METILENO (ESPECTROFOTOMÉTRICO).....	169
20.2.	SULFETO – MÉTODO IODOMÉTRICO (TITULOMÉTRICO).....	175
21.	ENXOFRE ELEMENTAR – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO.....	179
21.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS.....	179
21.2.	MATERIAL.....	180
21.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR (200 MG/L).....	180
21.4.	PREPARO DA SOLUÇÃO DE ACIDIFICAÇÃO (HCL 6 M).....	180
21.5.	PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS CONTENDO SULFETO.....	180
21.6.	EXTRAÇÃO DO ENXOFRE ELEMENTAR DE AMOSTRAS AQUOSAS.....	181
21.7.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (5 – 100 MG S ⁰ /L).....	182
21.8.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR.....	182
22.	FÓSFORO – MÉTODO DO ÁCIDO ASCÓRBICO (ESPECTROFOTOMÉTRICO).....	183
22.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS.....	183
22.2.	FÓSFORO INORGÂNICO (ORTOFOSFATOS).....	183
22.3.	FÓSFORO TOTAL.....	188
22.4.	MÉTODO DE DIGESTÃO SIMULTÂNEA DO PERSULFATO PARA FÓSFORO E NITROGÊNIO TOTAIS.....	191
22.1.	ORIENTAÇÕES GERAIS PARA A OPERAÇÃO DA AUTOCLAVE.....	193
VII.	METAIS E OUTROS ÍONS.....	195
23.	FERRO II E III – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	197
23.1.	MÉTODO DA FERROZINA.....	197
23.2.	FERRO II E III – MÉTODO DA 1,10-FENANTROLINA.....	204
24.	COBRE I E II – MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA).....	209
24.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS.....	209
24.2.	MATERIAL.....	209
24.3.	SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO (HCL 0,5 M).....	210
24.4.	SOLUÇÃO TAMPÃO TARTARATO.....	210
24.5.	SOLUÇÃO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO (0,1%).....	210
24.6.	SOLUÇÃO REDUTORA DE HIDROXILAMINA (10%).....	210
24.7.	SOLUÇÃO ESTOQUE DE COBRE CUPROSO (1,0 G/L CU ⁺¹).....	210
24.8.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (15 – 125 MG/L).....	210
24.9.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE TOTAL.....	211
24.10.	PRÉ-TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DA INTERFERÊNCIA DEVIDA AO ÍON FÉRRICO (Fe ³⁺).....	212
25.	CLORETOS TOTAIS – MÉTODO DE MOHR (ARGENTOMÉTRICO).....	213
25.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS.....	213
25.2.	MATERIAL.....	213

25.3.	SOLUÇÃO PADRÃO DE NITRATO DE PRATA 0,0141 N	214
25.4.	SOLUÇÃO PADRÃO DE CLORETO DE SÓDIO 0,0141 N	214
25.5.	SOLUÇÃO INDICADORA DE CROMATO DE POTÁSSIO (5%).....	214
25.6.	SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 1 N	214
25.7.	SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1 N	215
25.8.	PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA	215
25.9.	PROCEDIMENTOS PARA A PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	215
25.10.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETOS	215
25.11.	DETERMINAÇÃO DO BRANCO	216
VIII.	BIOGÁS E GASES DISSOLVIDOS	217
26.	OXIGÊNIO DISSOLVIDO – MÉTODO DE WINKLER (TITULOMÉTRICO)	218
26.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	218
26.2.	MATERIAL.....	218
26.3.	ÁGUA DE DILUIÇÃO DESOXIGENADA	219
26.4.	SOLUÇÃO DE SULFATO MANGANOSO (MnSO ₄).....	219
26.5.	SOLUÇÃO ALCALINA DE IODETO-AZIDA	219
26.6.	SOLUÇÃO INDICADORA DE AMIDO	220
26.7.	SOLUÇÃO PADRÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 0,025 N	220
26.8.	SOLUÇÃO PADRÃO DE DICROMATO DE POTÁSSIO 0,1 N	220
26.9.	PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO.....	220
26.10.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO	221
26.11.	CALIBRAÇÃO DE OXÍMETRO (SONDA DE OD).....	221
27.	METANO DISSOLVIDO – MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDIRETO.....	223
27.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	223
27.2.	MATERIAL.....	223
27.3.	PREPARO DOS FRASCOS DE ENSAIO	223
27.4.	PROCEDIMENTO.....	224
28.	BIOGÁS – MÉTODO DO DESLOCAMENTO DE VOLUME.....	227
28.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	227
28.2.	MATERIAL.....	227
28.3.	PREPARO DAS SOLUÇÕES SELETIVAS PARA O SELO HÍDRICO (WALKER ET AL., 2009).....	227
28.4.	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO EM REATORES EM BATELADA	228
28.5.	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO EM REATORES CONTÍNUOS.....	230
29.	SULFETO GASOSO – MÉTODO COLORIMÉTRICO INDIRETO	232
29.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	232
29.2.	MATERIAL.....	232

29.3.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,02 – 0,2 μ MOLS H ₂ S)	232
29.4.	DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE MOLS DE H ₂ S EM AMOSTRAS GASOSAS	233
29.5.	CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE H ₂ S NO BIOGÁS	234
29.6.	CUIDADOS PARA COLETA DO H ₂ S PARA LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	234
IX.	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA	236
30.	GRANULOMETRIA DE LODOS BIOLÓGICOS – MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE IMAGEM	237
30.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	237
30.2.	MATERIAL	238
30.3.	COLETA DAS AMOSTRAS DE GRÂNULOS	238
30.4.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA	238
30.5.	ENSAIO DE DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA	238
31.	CLOROFILA – MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO	245
31.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	245
31.2.	MATERIAL	245
31.3.	SOLUÇÃO SATURADA DE CARBONATO DE MAGNÉSIO (MgCO ₃ 10 G/L)	246
31.4.	SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO (ACETONA 90%)	246
31.5.	SOLUÇÃO DE ACIDIFICAÇÃO (HCL 0,1 N)	246
31.6.	PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO	247
31.7.	DETERMINAÇÃO DA CLOROFILA A NA PRESENÇA DE FEOFITINA A (MÉTODO MONOCROMÁTICO)	247
31.8.	DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA A, B, E C (MÉTODO TRICROMÁTICO)	248
31.9.	PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÕES DE CLOROFILA (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014)	249
32.	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE – MÉTODO DO PAPEL DE FILTRO	251
32.1.	CONCEITOS FUNDAMENTAIS	251
32.2.	MATERIAL	251
32.3.	PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO CITRATO 0,05 M	251
32.4.	PROCEDIMENTO	252
32.5.	LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO	253
32.6.	CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE	253
33.	REFERÊNCIAS	254



I. RECOMENDAÇÕES GERAIS

- O uso de jaleco no interior do laboratório é de uso obrigatório!
- Cabelos compridos devem ser presos por questões de segurança. Utilizar sempre calçados fechados e calças compridas.
- Ao manipular compostos voláteis, ácidos concentrados e solventes sempre utilizar a capela com a exaustão ligada, luvas, óculos de segurança e jaleco.
- Obviamente, comer, beber, fumar, aplicar cosméticos, bem como levar objetos do laboratório à boca não são permitidos! Evite contaminações: Cuidado redobrado ao manipular microrganismos!
- Amostras que serão submetidas à ebulição devem ser colocadas sob exaustão, na capela. Os frascos Duran® com biogás também devem, obrigatoriamente, ser despressurizados na capela, com a exaustão ligada.
- Nunca colocar as ponteiros dentro de pissetas ou frascos contendo reagente. Sempre transfira uma alíquota da solução para um béquer e pipete dali. Evite contaminar o que é de uso comum. Assegure-se também de transferir uma alíquota de volume adequado, pois o excedente deverá ser descartado, não podendo ser retornado ao frasco inicial.
- Respeite o conteúdo indicado de cada pisseta:
 - **Verde:** Água deionizada;
 - **Azul:** Água ultrapura (Milli-Q®);
 - **Vermelho:** Etanol 70%;
 - **Amarelo:** Detergente Extran;
 - **Preto:** Ácido clorídrico 3 N (diluir 1 vol. de HCl em 3 vol. de H₂O).
- Verifique o nível dos barriletes antes de coletar água deionizada!
- Para preparar a solução de álcool 70% para limpeza, misturar cerca de 730 mL de etanol 96% com 270 mL de água deionizada por litro de solução final; ou 500 mL de etanol 96% com 500 mL de álcool de cozinha comercial (etanol 46%) por litro de solução final.
- Nunca deixe de lavar adequadamente a vidraria utilizada: Lavar vidrarias que receberam amostras orgânicas ou oleosas com detergente neutro e bucha. Lavar três vezes com água da torneira e repassar com água deionizada também por três vezes.
- Caso não puder lavar imediatamente após o uso, deixar a vidraria identificada em lugar adequado na pia. Lembre-se de lavá-la o quanto antes (no máximo em 24 h).
- As vidrarias volumétricas (balões, provetas, pipetas) são bastante delicadas e foram previamente calibradas. Elas não devem ser submetidas a mudanças de temperatura, as quais provocam a dilatação/retração do vidro e, conseqüentemente, a perda da calibração do material. Assim, nunca, em hipótese alguma, utilize vidrarias volumétricas (principalmente balões) para armazenar soluções na geladeira. Elas também não devem ser aquecidas ou submetidas ao ultrassom.
- Não utilizar micropipetas na transferência de compostos voláteis, ácidos concentrados e solventes. Lembre-se que a micropipeta é calibrada para a densidade e viscosidade da água. Em caso de materiais com densidades/viscosidades diferentes, a pipeta de vidro (volumétrica ou graduada) é mais indicada.
- Guardar as micropipetas sempre na posição vertical, ajustadas para o volume máximo (posição de descanso do mecanismo).
- Nunca deixar micropipetas com ponteiros sujas ou molhadas na posição horizontal!



- Nunca virar as micropipetas de cabeça para baixo!
- Sempre que utilizar os reagentes sólidos que permanecem secando nas estufas, lembre-se de repor a quantidade original, para que o próximo usuário não encontre o recipiente vazio...
- Limpe as balanças analíticas após utilizá-las. São instrumentos caros, frágeis e também indispensáveis em nossa rotina de laboratório. Reagentes caídos em qualquer parte da balança (inclusive debaixo do prato) podem prejudicá-la e devem ser limpos imediatamente! Não deixe a sua sujeira escondida!
- Sempre verifique se as balanças se encontram niveladas antes de usá-las. Verifique o indicador de nível na parte de trás da balança.
- Lembre-se que a bomba a vácuo precisa ser ligada e desligada à pressão atmosférica. Portanto, ela deve ser pressurizada após ser ligada e despressurizada antes de ser desligada.
- Observe o nível de óleo lubrificante da bomba a vácuo. O nível de óleo deve estar sempre visível entre as marcas *Mín* e *Máx* do reservatório de lubrificação por capilaridade. Adicione mais óleo se o nível estiver abaixo da marca *Mín* e descarregue o óleo se o nível estiver acima de *Máx*. Nunca troque o óleo se a bomba estiver quente.
- Verifique o nível de água da autoclave antes da utilização. Após o uso, limpar adequadamente e trocar a água caso apresente aspecto sujo. Siga as instruções do fabricante para operar o equipamento com segurança, evitando manobras arriscadas. Não abandone o equipamento ligado, mas permaneça atento ao seu funcionamento, observando os limites máximos de temperatura e pressão.
- Abrir e manusear a mufla apenas quando ela já tiver atingido temperatura próxima dos 350°C, usando luvas apropriadas para evitar queimaduras. Nunca, em hipótese alguma, abrir a mufla em temperaturas maiores. Abrir a mufla em temperaturas acima dos 350°C representa risco para você, que pode se queimar, e representa risco de provocar rachaduras na cerâmica da mufla, o que inutilizaria o equipamento.
- Quando retirar as cápsulas da mufla (lembre-se, abaixo dos 350°C), transfira-as inicialmente para a estufa de 100°C. Não transferir diretamente para o dessecador. A mudança brusca de temperatura pode fazer com que as cápsulas de porcelana rachem e se quebrem.
- Cápsulas e membranas não devem ser armazenadas por tempo indeterminado na estufa (e menos ainda no dessecador).
- A sílica que permanece na base dos dessecadores não é enfeite! Deve ser trocada (pela sílica azul que fica na estufa a 100°C) sempre que apresentar coloração rosada ou marrom.
- Quando for calcinar ou secar volumes significativos de amostras orgânicas, lodos e afins, lembre-se de ligar a exaustão da sala de estufas!
- Após utilizar as centrífugas de bancada, verifique a ocorrência de respingos ou vazamentos de suas amostras. Limpe adequadamente as paredes internas, o rotor e o suporte de tubos com pano úmido, borrifando um pouco de água sanitária, e repassando com álcool 70%. Seque adequadamente ao término.
- Cuidado ao acender o bico de Bunsen! Cuidado com cabelos e luvas próximos da chama acesa! Sempre verifique os registros dos gases (principalmente CH₄, H₂ e O₂) que possam estar abertos, e também se não há solventes e outros materiais inflamáveis por perto.
- Coloque avisos nas chapas aquecedoras ("Quente!") e em outros equipamentos que possam representar perigo aos outros usuários do laboratório.
- Sempre que ocorrer vazamentos de reagentes de DQO nos digestores, desligá-los, aguardar o esfriamento e realizar a limpeza adequada, principalmente dos blocos de digestão (desacoplar, lavar e secar).



- Cuidado ao usar o espectrofotômetro! Não manuseá-lo com luvas contaminadas. Evite derramar substâncias em seu interior. Desligar sempre que não for utilizá-lo por longo período de tempo (principalmente quando você for o último a sair do laboratório).
- Não deixe cubetas com amostras esquecidas dentro do espectrofotômetro. A lâmpada é calibrada sempre que o equipamento é ligado e a presença de uma cubeta prejudicará a calibração.
- Deve-se tomar um cuidado especial com as cubetas utilizadas no espectrofotômetro. Observe sempre os procedimentos de lavagem adequados para cada tipo de análise (os tubos de DQO, por exemplo, não devem ser lavados com detergentes ou álcool).
- Antes de proceder à leitura da absorbância de DQO, os tubos (padrão HACH®) podem ser limpos com palha de aço seguida de papel higiênico com álcool. Isso porque o digestor pode sujar a parte externa do tubo. A palha de aço também ajuda a remover riscos leves decorrentes do uso prolongado do tubo. **MAS ATENÇÃO!!!** Esse procedimento só vale para os tubos de DQO. Cubetas de vidro (como as utilizadas nas análises de sulfeto e sulfato) e quartzo (para leituras na região do UV) só devem ser limpas muito suavemente com papel higiênico e álcool. Cubetas de poliestireno e acrílico só podem ser limpas com papel higiênico e água. Nunca utilize papel toalha, pois ele é mais áspero e pode riscar as cubetas.
- Lembre-se de descartar corretamente os resíduos de suas análises. Cada resíduo deve ter o seu frasco devidamente identificado, com etiqueta própria. Não espere o frasco transbordar para trocá-lo. Por segurança, os frascos de resíduos maiores (5 litros) não devem ser preenchidos com volume acima de 2/3 da sua capacidade. Em outras palavras: Nunca encha o frasco até a boca!
- Descartar adequadamente todos e quaisquer materiais de vidro trincado ou que possam oferecer perigo quando do seu uso. Acondicionar os cacos de vidro em caixas próprias (vidro transparente, âmbar/verde ou porcelana), não misturando com o lixo comum.
- Lembre-se de identificar suas amostras guardadas na geladeira de uso comum com seu Nome, Data, Identificação e Concentração do produto! Caso contrário, elas serão descartadas sem aviso prévio.
- Por fim, mantenha as bancadas limpas, secas e organizadas! Não deixe materiais acumulados, apenas os itens indispensáveis para a realização dos experimentos e análises devem ser utilizados.
- **Havendo qualquer dúvida, não hesite em perguntar para as técnicas responsáveis.**

Tenha sempre em mente que as dependências e os materiais do laboratório são de uso coletivo e, portanto, devem ser bem cuidados para que nenhum pesquisador seja prejudicado!

BOM TRABALHO!

II. RECOMENDAÇÕES PARA PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS

PARÂMETRO	FRASCO	PROCEDIMENTO
ALCALINIDADE	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente ou refrigerar (4°C).
CARBOIDRATOS	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente ou congelar (-20°C).
CONDUTIVIDADE	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente ou refrigerar (4°C).
COR	Plástico / Vidro	Filtrar e refrigerar (4°C) por até 24 h.
CLOROFILA	Opaco / Âmbar	Armazenar refrigerado (4°C) por até 24 h. Se possível, filtrar imediatamente e congelar o filtro (a -20°C por 30 dias; ou a -80°C por mais tempo). Não armazenar amostras ácidas.
DBO	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente ou refrigerar (4°C).
DQO	Plástico / Vidro	Analisar o quanto antes ou acidificar com H ₂ SO ₄ até pH < 2,0 e refrigerar (4°C) ou congelar (-20°C).
ENXOFRE ELEMENTAR	Plástico/Vidro	Reter o S ⁰ em membrana de celulose regenerada (0,2 µm) por filtração e extrair em acetona. Conservar em geladeira, ao abrigo da luz.
FENÓIS	Vidro âmbar	Acidificar com H ₂ SO ₄ até pH < 2,0 e refrigerar (4°C). Agentes oxidantes devem ser removidos por adição de FeSO ₄ em excesso. Analisar o quanto antes.
FERRO II	Plástico / Vidro	Acidificar com HCl até pH < 2,0 e guardar ao abrigo da luz. Para ferro dissolvido, filtrar imediatamente e acidificar.
FOSFATO	Plástico / Vidro	Para fosfato dissolvido: filtrar imediatamente (Não acidificar). Refrigerar (4°C).
FÓSFORO TOTAL	Plástico / Vidro	Acidificar com H ₂ SO ₄ até pH < 2,0 e refrigerar (4°C).
METAIS	Plástico / Vidro	Acidificar com HNO ₃ até pH < 2,0. Para metais dissolvidos, filtrar imediatamente e acidificar.
NITROGÊNIO AMONIAICAL	Plástico / Vidro	Analisar o quanto antes ou acidificar com H ₂ SO ₄ até pH < 2,0 e refrigerar (4°C).
NITRITO	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente. Para tempos de armazenamento de até dois dias, refrigerar (4°C) ou congelar (-20°C). <u>Nunca acidificar!</u>
NITRATO	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente ou refrigerar (4°C) por até 2 dias. Amostras desinfetadas duram até 14 dias sem preservação ácida. <u>Não acidificar amostras contendo nitrito.</u>
NTK e N-ORGÂNICO	Plástico / Vidro	Analisar o quanto antes. Até 24 h: Refrigerar (4°C). Entre 24 h e 28 dias: acidificar com H ₂ SO ₄ (pH < 2,0) e congelar (-20°C).
ÓLEOS E GRAXAS (LIPÍDIOS)	Vidro	Acidificar com H ₂ SO ₄ ou HCl (pH < 2,0) e refrigerar (4°C).
OXIGÊNIO DISSOLVIDO	Frasco de DBO com tampa esmerilhada	Analisar imediatamente. No método iodométrico pode-se adiar a titulação (por até 8 h) após acidificar a amostra.
pH	Plástico / Vidro	Analisar imediatamente.
SÓLIDOS	Plástico / Vidro	Refrigerar (4°C).
SULFATO	Plástico / Vidro	Filtrar imediatamente e refrigerar (4°C). Eliminar sulfetos por acidificação com HCl até pH entre 3,0 – 4,0 e aeração rápida por agitação magnética ou fluxo de N ₂ por 15 min.
SULFETO	Frasco de DBO com tampa esmerilhada	Analisar imediatamente ou fixar com acetato de zinco (1 M) e elevar o pH com NaOH (> 9,0). Refrigerar (4°C) e analisar o quanto antes.
SURFACTANTES	Plástico / Vidro	Analisar o quanto antes. Refrigerar (4°C).
TURBIDEZ	Plástico / Vidro	Analisar no dia. Guardar ao abrigo da luz e refrigerar (4°C).



III. MATÉRIA ORGÂNICA¹

- 1 Sólidos – Método Gravimétrico
- 2 Demanda Química de Oxigênio (DQO) – Método Espectrofotométrico
- 3 Carboidratos – Métodos Espectrofotométricos
- 4 Proteínas – Métodos Espectrofotométricos
- 5 Lipídios – Método da Sulfo-Fosfo-Vanilina (Espectrofotométrico)
- 6 Glicerol – Método Enzimático (Espectrofotométrico)
- 7 Ácido Lático – Método do P-Fenilfenol (Espectrofotométrico)



¹ As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

1. SÓLIDOS – MÉTODO GRAVIMÉTRICO

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Concentrações de sólidos dissolvidos e suspensos, orgânicos e inorgânicos, são ferramentas muito utilizadas na caracterização de águas residuárias.

Essas determinações, baseadas em análise gravimétrica, utilizam massas de resíduos secos e calcinados presentes em amostras brutas e filtradas.

A massa seca das células microbianas é, normalmente, expressa em termos de sólidos em suspensão (SS), uma vez que a biomassa é constituída de sólidos que se encontram suspensos no reator (no caso de crescimento disperso). No entanto, como os sólidos em suspensão englobam também os materiais particulados menores que 2,0 μm , orgânicos e inorgânicos, presentes nas amostras, a biomassa é frequentemente representada pelos sólidos voláteis em suspensão (SSV). Esses abrangem, principalmente, a fração orgânica dos sólidos suspensos eliminada através da combustão (oxidação) como gás carbônico e água, enquanto algumas substâncias inorgânicas passam apenas por modificações.

No entanto, nem toda fração orgânica da biomassa é ativa. Assim, os sólidos voláteis em suspensão podem ser ainda divididos em frações ativa e inativa. A fração ativa é a que tem real participação na estabilização do substrato, porém, a dificuldade da sua medição é a principal limitação à utilização desse parâmetro no projeto e controle operacional de estações de tratamento. Existem processos indiretos, baseados em quantificações de DNA, ATP, proteínas e outros, mas nenhum se compara à simplicidade da determinação direta dos sólidos voláteis em suspensão.

Além da consideração da atividade da biomassa, os sólidos voláteis podem ser interpretados também com relação à biodegradabilidade, podendo apresentar frações biodegradável e não biodegradável (VON SPERLING, 1996a; 1996b).

Como em todas as análises, as amostras devem ser representativas e, em certos casos, materiais estranhos devem ser evitados durante a amostragem. Porções de óleo ou graxa devem ser dispersas antes da transferência das alíquotas a serem analisadas.

O limite recomendado para a massa do resíduo seco é de 200 mg, para evitar a formação de camada superficial isolante, que dificulta a sua secagem (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Substâncias muito higroscópicas podem mascarar resultados.

American Public Health Association (2005) apresenta valores de precisão na determinação de sólidos totais e suspensos:

(a) *determinação de sólidos totais a 103°C:*

- 6 mg/L de desvio padrão;

(b) *determinação de sólidos suspensos a 103°C:*

- 5,2 mg/L de desvio padrão em amostras de 15 mg/L, ou seja, 33% de coeficiente de variação;

- 24 mg/L de desvio padrão em amostras de 242 mg/L, ou seja, 10% de coeficiente de variação;

- 13 mg/L de desvio padrão em amostras de 1707 mg/L, ou seja, 0,76% de coeficiente de variação;

(c) *determinação de sólidos voláteis totais a 550°C:* não disponível;

(d) *determinação de sólidos voláteis suspensos a 550°C:*

- 11 mg/L de desvio padrão em amostras de 170 mg/L, ou seja, 6,5% de coeficiente de variação.

Damasceno (2004) também observou a influência de elevadas concentrações de bicarbonato de sódio nos resultados de análises de sólidos totais (ST) e sólidos voláteis (SV), conforme mostrada na Tabela 1.

Tabela 1: Concentrações de sólidos em amostras de soro de queijo (A) e amostras de soro de queijo com bicarbonato de sódio (B).

Parâmetros (mg/L)	Soro (A) (1 g DQO/L)	Soro (B) (1,0 g DQO/L e 1,0 g NaHCO₃/L)
DQO	995	1.004
ST	946	1.698
SVT	898	1.096
SST	68	56
SSV	52	42

Fonte: Damasceno, 2004.

Como se pode observar, as concentrações de sólidos totais e sólidos voláteis totais foram fortemente influenciadas, enquanto que os valores de SST e SSV não sofreram variações significativas, considerando-se o erro do método empregado.

1.2. MATERIAL

- **Aparato de filtração a vácuo:** Bomba de vácuo; funil tipo Büchner para membrana com diâmetro de 47 mm e kitassato de 250 mL com alongas de borracha para filtração ou conjunto de filtração a vácuo da Millipore® (*Nalgene*®) para membrana com diâmetro de 47 mm
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Dessecador com sílica anidra
- Estufa a 103-105°C
- Forno tipo mufla a 550°C
- Cápsulas de porcelana (modelos 05-50 ou nº 2 e 05-85 ou nº 4)
- Pinças metálicas (tenazes) para cápsulas de porcelana (com comprimento de 20 cm para uso na estufa e de 50 cm para uso na mufla)
- Pinça de 15 cm para transferência da membrana filtrante
- Luvas para forno
- Proveta graduada de 50 mL
- Membranas filtrantes de microfibras de vidro, com tamanho nominal de abertura de poro entre 1,0 – 1,5 μm e diâmetro de 47 mm. Quando calcinada a 550°C, a membrana de microfibras de vidro mantém sua integridade estrutural

1.3. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS (ST)

ATENÇÃO: Abrir e manusear a mufla apenas quando ela já tiver atingido temperatura próxima dos 300°C, usando luvas apropriadas para evitar queimaduras. **Cuidado!!!**

Este procedimento é limitado a uma quantidade de sólidos secos próxima de 200 mg para impedir a formação de uma camada que dificulta a secagem do resíduo, comum em massas maiores.

Inicialmente, preparar a cápsula de porcelana que servirá de suporte para a amostra:

- (a) Calcinar as cápsulas de porcelana em mufla a 550°C até massa constante (neste caso, por cerca de 20 min). Aguardar a mufla atingir a temperatura de segurança antes da sua abertura (300°C) e transferir as cápsulas, com auxílio de uma tenaz, para estufa a 103-105°C, na qual deverão permanecer por tempo adequado para a estabilização da temperatura (cerca de 30 min). Resfriar as cápsulas calcinadas em dessecador apenas pelo tempo suficiente para que atinjam a temperatura ambiente, verificando sempre o estado da sílica (azul quando anidra, e marrom ou rosada quando úmida, necessitando ser trocada). Determinar a massa M_1 , em gramas, em balança analítica (utilizar uma pinça ou tenaz, evitando manipular as cápsulas com as mãos);
- (b) na sequência, transferir um volume conhecido da amostra (V_1 , em mL), de tal forma que a quantidade de resíduo não supere 200 mg, para a cápsula de massa conhecida (M_1). Secar a amostra em estufa a 103-105°C até massa constante (neste caso, por cerca de 24 h) e determinar a massa do conjunto após resfriamento em dessecador (M_2 , em gramas);
- (c) calcular ST pela Equação 1:

$$ST \text{ (g/L)} = \frac{(M_2 - M_1) \text{ (g)}}{V_1 \text{ (mL)}} \times 1000 \quad \text{Equação 1}$$

1.4. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS FIXOS E VOLÁTEIS (STF E STV)

- (a) Após a determinação da concentração de sólidos totais, calcinar a cápsula com a amostra em forno tipo mufla a 550°C até massa constante (neste caso, por cerca de 20 min para uma única amostra e, no máximo, por 2 h, quando o forno estiver repleto de cápsulas). Após o resfriamento da mufla (até, no mínimo, 300°C), transferir as cápsulas, com auxílio de uma tenaz, para estufa a 103-105°C até a estabilização da temperatura (cerca de 30 min) e resfriá-las em dessecador apenas pelo tempo necessário para que atinjam a temperatura ambiente. Em seguida, determinar a massa do conjunto (M_3 , em gramas) em balança analítica (evitar manipular as cápsulas com as mãos);
- (b) calcular STF pela Equação 2 e STV pela Equação 3:

$$STF \text{ (g/L)} = \frac{(M_3 - M_1) \text{ (g)}}{V_1 \text{ (mL)}} \times 1000 \quad \text{Equação 2}$$

$$STV \text{ (g/L)} = \frac{(M_2 - M_3) \text{ (g)}}{V_1 \text{ (mL)}} \times 1000 \quad \text{Equação 3}$$

1.5. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS TOTAIS (SST)

Este procedimento também é limitado a uma quantidade de sólidos secos de 200 mg devido à possibilidade de formação de uma camada que dificulte a secagem do material.

- (a) Com auxílio de pinça metálica, inserir a membrana filtrante (microfibra de vidro de 1,0 – 1,5 μm) no sistema de filtração e lavá-la utilizando três porções de 20 mL de água deionizada (cerca de 60 mL), as quais devem ser desprezadas;

- (b) transferir a membrana para a cápsula de porcelana, calcinar em forno tipo mufla, a 550°C, por 15 min e resfriar até a temperatura de segurança (300°C) para abertura da mufla;
- (c) usando a tenaz, transferir o conjunto para a estufa a 103-105°C para a estabilização da temperatura (cerca de 30 min) e resfriar em dessecador até a temperatura ambiente;
- (d) com auxílio de pinça metálica, determinar a massa da membrana (M_4 , em gramas) em balança analítica;
- (e) utilizando a pinça, transferir a membrana calcinada novamente para o sistema de filtração;
- (f) filtrar um volume conhecido de amostra (V_2 , em mL) no sistema de filtração a vácuo (homogeneizar a amostra por agitação manual ou magnética antes de transferir o volume);
- (g) transferir cuidadosamente a membrana contendo o resíduo para a cápsula de porcelana;
- (h) secar o conjunto em estufa a 103-105°C até massa constante (por cerca de 24 h) e, após o resfriamento em dessecador, determinar a nova massa da membrana (M_5 , em gramas);
- (i) calcular SST pela Equação 4:

$$\text{SST (g/L)} = \frac{(M_5 - M_4)(\text{g})}{V_2 (\text{mL})} \times 1000 \quad \text{Equação 4}$$

1.6. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS FIXOS E VOLÁTEIS (SSF E SSV)

- (a) Após a determinação da concentração de sólidos suspensos totais, calcinar o conjunto em um forno tipo mufla, a 550°C, por tempo suficiente para atingir massa constante (por cerca de 20 min) e aguardar o resfriamento da mufla até a temperatura de segurança (300°C) antes da sua abertura. Após transferência para estufa a 103-105°C para estabilização da temperatura e resfriamento em dessecador, determinar a massa final da membrana (M_6 , em gramas);
- (b) calcular SSF pela Equação 5 e SSV pela Equação 6:

$$\text{SSF (g/L)} = \frac{(M_6 - M_4)(\text{g})}{V_2 (\text{mL})} \times 1000 \quad \text{Equação 5}$$

$$\text{SSV (g/L)} = \frac{(M_5 - M_6)(\text{g})}{V_2 (\text{mL})} \times 1000 \quad \text{Equação 6}$$

1.7. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS DISSOLVIDOS TOTAIS, FIXOS E VOLÁTEIS (SDT, SDF E SDV)

Os valores das concentrações de sólidos dissolvidos podem ser obtidos pelas diferenças entre concentrações de sólidos totais e suspensos, considerando-se as respectivas frações (totais, fixos e voláteis).

1.8. DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SEDIMENTÁVEIS E ÍNDICE VOLUMÉTRICO DE LODO (IVL)

Consideram-se como sólidos sedimentáveis a porção dos sólidos em suspensão que sedimenta sob a ação da gravidade durante o intervalo de tempo de uma hora, a partir de um litro de amostra mantida em repouso em cone Imhoff graduado. Como material para a realização do presente procedimento exige-se apenas um cone Imhoff de 1.000 mL (ou proveta graduada), bastão de vidro (de 30 a 40 cm) e cronômetro:

- (a) Transferir uma alíquota de amostra para o cone Imhoff até a marca de 1.000 mL e homogeneizar manualmente com auxílio do bastão de vidro;
- (b) deixar decantar em repouso por 45 min à temperatura ambiente;
- (c) após esse tempo, passar vagarosamente o bastão de vidro na parede interna do cone, promovendo o desprendimento dos sólidos aderidos, ou então girar suavemente o cone entre as mãos promovendo rotação de 360° (evitar movimentos bruscos ou turbulência excessiva para que não ocorra a ressuspensão dos sólidos já sedimentados);
- (d) manter em repouso por mais 15 min (tempo total de sedimentação de 1 h);
- (e) o resultado é dado diretamente pela leitura do nível do sedimentado na escala graduada do cone Imhoff e expresso em mL/L;
- (f) arredondar o valor para a marcação do cone mais próxima da interface lodo/sobrenadante.

Observação: *Se for percebida a presença de bolsões de líquido em meio ao material sedimentado, estimar esse volume e subtrair do volume de sólidos sedimentáveis. Caso haja o aparecimento de material flutuante na superfície do líquido sobrenadante, não computar esse material como material sedimentável.*

Os níveis de concentração de sólidos sedimentáveis e de sólidos em suspensão (SST – item 1.4) são relacionáveis entre si, constituindo um outro parâmetro prático de grande importância no controle operacional de sistemas de tratamento biológico de esgotos (principalmente sistemas aeróbios), conhecido por índice volumétrico de lodo (IVL). O IVL representa o volume ocupado por unidade de massa de lodo, ou seja, o volume ocupado por 1 g de lodo após a sedimentação (Equação 7). Geralmente, para cálculo do IVL, é usual utilizar o volume de sólidos sedimentados após **30 min** de decantação em cone Imhoff:

$$\text{IVL (mL/g)} = \frac{\text{Sólidos Sedimentáveis (mL/L)}}{\text{SST (g/L)}} \quad \text{Equação 7}$$

Outra forma de efetuar o cálculo do IVL consiste em medir a altura do nível de líquido no tempo inicial (H_0) e a altura da interface lodo/sobrenadante ao final de um período de sedimentação de 30 min ($H_{30 \text{ min}}$ = altura de lodo sedimentado) em proveta graduada de 1.000 mL, aplicando a Equação 8 mostrada seguir (VON SPERLING, 1997):

$$\text{IVL (mL/g)} = \frac{H_{30 \text{ min}} \text{ (m)} \times 10^3 \text{ (mL/L)}}{H_0 \text{ (m)} \times \text{SST (g/L)}} \quad \text{Equação 8}$$

1.9. ESTIMATIVA DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SUSPENSOS VOLÁTEIS (SSV) PELA DQO

(BULLOCK et al., 1996; CONTRERAS et al., 2002)

Uma alternativa mais simples e rápida para a determinação da concentração de sólidos suspensos voláteis (SSV) no efluente de reatores é a aplicação do teste de DQO (conforme procedimentos apresentados no item 2). O recurso à DQO como estimativa da biomassa em suspensão se deve ao fato das células microbianas serem oxidadas pelo dicromato de potássio em meio ácido.

De fato, altas concentrações de biomassa em suspensão costumam levar à obstrução das membranas filtrantes de 1,0 – 1,5 µm empregadas na análise gravimétrica de SSV, impedindo que um volume significativo de amostra seja utilizado, o que prejudica a representatividade do teste.

Além do mais, a própria natureza destrutiva e os grandes volumes de amostra requeridos pelo método gravimétrico são fortes limitantes da sua aplicabilidade, uma vez que nem sempre é possível sacrificar tais volumes, sejam de efluente, de biomassa em suspensão ou de material suporte retirado do sistema.

Tais problemas podem ser contornados com a medida da demanda química de oxigênio (DQO) da amostra bruta (DQO_{TOTAL}) subtraindo-se a parcela de DQO dissolvida (DQO_{FILTRADA}), obtendo-se a fração da DQO em suspensão (DQO_{SUSPENSÃO}), a qual está relacionada com a concentração de SSV da amostra.

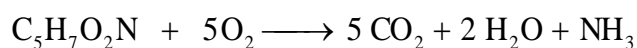
Uma vez que a análise de DQO exige volumes menores de amostra para sua realização, e o fato de altas concentrações de compostos inorgânicos, tais como o bicarbonato, não provocarem interferências positivas no método (o que pode ocorrer na análise gravimétrica, conforme indicado no item 1.1), essa alternativa se mostra interessante pela rapidez e facilidade na sua execução.

Para a aplicação dessa alternativa a um determinado tipo de amostra (seja efluente ou lodo de reator biológico) é necessário que, de tempos em tempos, sejam efetuados testes de verificação e validação da metodologia. Para isso deve ser realizada a análise gravimétrica (sempre em triplicatas) para a determinação da concentração de SSV de uma amostra representativa (por exemplo, uma amostra composta – coletada em dias diferentes de operação), e a análise da DQO dessa mesma amostra bruta e filtrada (também em triplicatas).

A diferença entre a DQO_{BRUTA} e a DQO_{FILTRADA} fornece a DQO_{SUSPENSÃO} da amostra, a qual está relacionada a uma dada concentração de SSV (medida por gravimetria). Assim poderá ser determinado um fator de conversão (f) que expresse a relação entre a massa de sólidos suspensos voláteis com a sua respectiva DQO (g DQO / g SSV), o que é válido para amostras obtidas sob as mesmas condições operacionais.

Mudanças no inóculo, na concentração e nas características da matéria orgânica afluyente, bem como nos parâmetros operacionais do reator, exigem uma nova validação do método, para a determinação de um novo coeficiente de conversão (f).

Uma vez que a composição elementar média da célula é próxima de C₅H₇O₂N (SPEECE, 1996), podemos calcular um fator teórico e aproximado de conversão de massa de células em DQO da ordem de 1,42 gDQO/gCélula, o qual se obtém pelo balanceamento da reação de oxidação da matéria orgânica celular (Equação 9).



Equação 9

Massa célula: 113 g
 Massa O₂: 160 g

No entanto, como a metodologia gravimétrica de SSV, assim como a análise de $DQO_{SUSPENSA}$, computam praticamente toda a matéria orgânica em suspensão presente na amostra (incluindo polímeros e materiais extracelulares), esse fator tende a variar de amostra para amostra. Altas concentrações de partículas inertes em suspensão também podem causar interferências significativas (BULLOCK et al., 1996).

Para efeitos comparativos:

- Bullock et al. (1996) obtiveram um fator de conversão na faixa de 1,20 a 1,66 gDQO/gSSV em amostras de esgoto sanitário e efluentes da indústria de papel;
- Contreras et al. (2002) determinaram coeficiente de 1,16 gDQO/gSSV para culturas puras de bactérias e de 1,29 gDQO/gSSV para amostras de sistemas de lodos ativados.

2. DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO (DQO) – MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

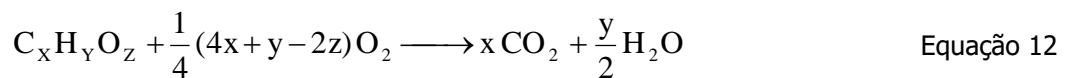
A matéria orgânica de águas residuárias pode apresentar-se em solução, em sua maioria, rapidamente biodegradável, e em suspensão, de biodegradação mais lenta.

A Demanda Química de Oxigênio (DQO), variável ligada à presença de espécies reduzidas em substâncias de uma amostra, representa a quantidade de oxigênio necessária para oxidá-las totalmente, como nos exemplos abaixo:



No primeiro exemplo pode-se verificar que a queima de 46 g de etanol consome 96 g de O_2 , ou ainda, que uma solução de 46 mg/L de etanol apresenta DQO de 96 mg/L. Já para a oxidação de 34 g de sulfeto de hidrogênio, 64 g de O_2 são demandados. Isso significa que uma solução contendo 34 mg/L de sulfeto de hidrogênio irá apresentar DQO de 64 mg/L.

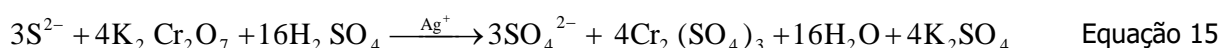
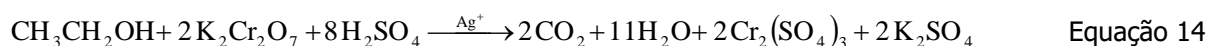
Para a estimativa da DQO teórica de uma determinada substância, pode-se partir da reação de oxidação completa de um composto orgânico genérico, com fórmula molecular $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z$, conforme abaixo representada (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994):



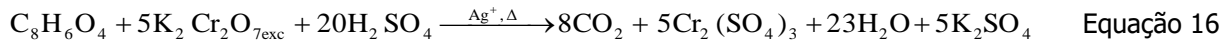
Nesse caso, de acordo com a estequiometria da reação acima, a DQO do composto orgânico em questão pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$\text{DQO}_{\text{TOTAL}} = \frac{8(4x + y - 2z)}{12x + y + 16z} \text{mgDQO} / \text{mgC}_x\text{H}_y\text{O}_z \quad \text{Equação 13}$$

A maioria das substâncias oxidáveis, orgânicas e inorgânicas, presentes em águas residuárias, pode ser quantificada rapidamente pela reação com o dicromato, em meio ácido, a quente, como mostrado nas equações a seguir:



A Equação 16 representa a reação de oxidação do ácido ftálico, pelo íon dicromato, em meio com excesso de ácido sulfúrico, que ocorre durante o processo de digestão da substância usada como padrão primário para a quantificação da DQO, o hidrogenoftalato de potássio (KHP).



A partir de equação de curva de calibração, preparada com soluções de diferentes concentrações de hidrogenoftalato de potássio, a DQO é quantificada através da quantidade produzida de íons crômico (Cr^{3+}), de coloração azul.

São adotadas as seguintes formas de representação do substrato, ou seja, da matéria carbonácea (VON SPERLING, 1996a; 1996b):

- **DQO bruta afluente:** representa a DQO total (solúvel e em suspensão) que entra no reator. Essa consideração é feita pois processos de tratamento com decantação primária dos afluentes removem apenas cerca de 2/3 dos sólidos em suspensão. Os sólidos em suspensão que chegam ao reator são adsorvidos pela biomassa, hidrolisados e convertidos em sólidos solúveis. Dessa forma, tanto o material solúvel quanto o particulado, afluentes ao reator, devem ser computados como substrato a ser removido;
- **DQO filtrada efluente:** representa os compostos orgânicos solúveis efluentes do reator e algumas substâncias inorgânicas que podem interferir (oxidadas também pelo dicromato). Essa consideração é feita pela necessidade de remoção dos sólidos em suspensão (sólidos biológicos) dos efluentes em processos que utilizam decantação secundária. Portanto, não há sentido considerar a DQO total efluente do reator, pois pode ser maior que a DQO afluente, devido à elevada concentração de matéria orgânica em suspensão, representada pela população microbiana. A qualidade do efluente final do sistema de tratamento depende da DQO solúvel, indicativo do desempenho do reator e da DQO em suspensão, indicativo do desempenho da unidade de decantação final.

Segundo American Public Health Association (2005), compostos orgânicos voláteis podem ter menor contato com o agente oxidante da fase líquida. Sulfato de mercúrio deve ser adicionado à solução digestora para evitar que íons Cl^- , Br^- e I^- precipitem o íon Ag^+ , usado como catalisador. Este método apresentou os seguintes valores de precisão em 48 análises com hidrogenoftalato de potássio:

- 17 mg O_2/L de desvio padrão em amostras de 193 mg O_2/L , ou seja, 8,7% de coeficiente de variação, na ausência Cl^- ;
- 20 mg O_2/L de desvio padrão em amostras de 212 mg O_2/L , ou seja, 9,6% de coeficiente de variação, na presença de 100 mg Cl^-/L .

Observações:

1) Um interferente comum ao teste da DQO é o íon cloreto (Cl^-), o qual reage com a prata (Ag^+) precipitando na forma de cloreto de prata (AgCl), reduzindo a quantidade efetiva do catalisador em solução. O cloreto também pode ser oxidado a cloro molecular (Cl_2) durante o teste, exercendo DQO. A presença de sulfato de mercúrio (HgSO_4) na solução de dicromato é adicionada para complexar com os íons cloreto, minimizando assim a sua interferência no teste. Para efetuar a análise de DQO de efluentes salinos, com concentrações de íons cloreto acima de 2.000 mg/L, as amostras deverão ser previamente submetidas ao método de remoção de cloretos (item 2.4).

2) No caso de amostras contendo altas concentrações de sulfeto (como no caso de efluentes de reatores sulfetogênicos), este deverá ser removido previamente ao teste da DQO, por ser tratar de um composto facilmente oxidado pelo íon dicromato (Equação 15) e interferir positivamente no resultado da análise. O procedimento para precipitação e separação do sulfeto é apresentado logo mais, no item 2.3.

3) Os nitritos (NO_2^-) exercem 1,1 mg DQO/mg N- NO_2^- . Entretanto, raramente ocorrem quantidades significativas de nitrito em esgotos sanitários e águas naturais. Por isso, essa interferência é normalmente ignorada. Caso seja necessário eliminar uma interferência significativa devida ao íon NO_2^- , adicionar 10 mg de ácido sulfâmico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$) para cada mg de N- NO_2^- presente no volume de amostra a ser utilizado. Preparar um branco com água deionizada e adicionar a mesma dosagem de $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Para fins mais práticos, um procedimento alternativo, utilizando uma solução concentrada de ácido sulfâmico, é apresentado no item 2.5.

4) O íon inorgânico NH_4^+ , no qual o nitrogênio está no maior estado de redução permitido a esse átomo, não é diretamente oxidado pelo íon dicromato em meio ácido. Por esse motivo, é comum a afirmação de que o íon NH_4^+ não tem DQO. Outros agentes oxidantes, dentre eles o persulfato, transformam NH_4^+ em NO_3^- . Na presença de altas concentrações do íon cloreto (≥ 1.000 mg Cl/L), porém, observou-se que o íon amônia passou a exercer DQO, o que pode ser atribuído à formação de cloraminas (AQUINO; SILVA; CHERNICHARO, 2006).

5) Existem ainda algumas substâncias orgânicas que não são oxidadas por dicromato nestas condições, como, por exemplo, a piridina e compostos semelhantes, bem como o corante "Lugamil Orange", usado no tingimento de couros.

2.2. MÉTODO PARA CONCENTRAÇÕES DE DQO ENTRE 90 E 900 MG/L

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

2.2.1. MATERIAL

- **Aparato de filtração a vácuo:** Bomba de vácuo; funil tipo Büchner para membrana com diâmetro de 47 mm e kitassato de 250 mL com alongas de borracha para filtração ou conjunto de filtração a vácuo da Millipore® (*Nalgen®*) para membrana com diâmetro de 47 mm
- Agitador magnético e barra magnética
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Bastão de vidro
- Capela com exaustão
- Centrífuga de bancada
- Digestor de DQO
- Dispensadores automáticos de 5,0 mL
- Espectrofotômetro
- Estufas a 60°C e 103-105°C
- Membranas de microfibras de vidro com poros de 0,45 e 1,2 μm , e diâmetro de 47 mm
- Balões Volumétricos de 10, 500 e 2.000 mL
- Béquer de 100 mL
- Erlenmeyer de 2.000 mL
- Proveta de vidro graduada de 500 mL
- Micropipetas de 200, 1.000 e 5.000 μL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 50 mL
- Sulfato de Prata – Ag_2SO_4 P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Sulfato de Mercúrio – HgSO_4 P.A.
- Dicromato de Potássio – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ P.A.
- Hidrogenoftalato de Potássio (KHP) – $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})\text{COOK}$ (202,22 g/mol) P.A.
- Sulfato de Zinco – ZnSO_4 P.A. (pré-tratamento para a remoção de sulfetos – item 2.3)
- Nitrato de Prata – AgNO_3 P.A. (pré-tratamento para a remoção de cloretos em excesso – item 2.4)
- Ácido Sulfâmico – $\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$ P.A. (pré-tratamento para a remoção de nitrito – item 2.5)

2.2.2. SOLUÇÃO DE SULFATO DE PRATA EM H_2SO_4 CONCENTRADO (SOLUÇÃO CATALÍTICA)

ATENÇÃO: *Trabalhar em capela e usar jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança!*

- (a) Transferir 10,12 g de sulfato de prata (Ag_2SO_4), triturado com bastão de vidro, para 1.000 mL de H_2SO_4 concentrado (96–97%, densidade = 1,84 kg/L), no frasco âmbar original do ácido. Fechar hermeticamente o frasco e colocar etiqueta de identificação. Deixar em repouso por 48 h, no escuro, para que ocorra a dissolução. Homogeneizar antes de usar.

- (b) Para a solução ser usada imediatamente após sua preparação, transferir 10,12 g de Ag_2SO_4 para béquer de 100 mL. **MUITO CUIDADO:** triturar o sulfato de prata com bastão de vidro e adicionar cerca de 70 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitar com bastão e transferir apenas a solução para frasco de vidro escuro. Repetir adições de ácido sulfúrico até que todo sal esteja dissolvido. Transferir o restante do ácido sulfúrico para o frasco de estocagem, fechar hermeticamente e homogeneizar. Pode ser usado imediatamente.

2.2.3. SOLUÇÃO DE $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ E HgSO_4 , ACIDIFICADA COM H_2SO_4 (SOLUÇÃO DE DIGESTÃO)

ATENÇÃO: *Trabalhar em capela e usar jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança!*

- (a) Armazenar o dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) em estufa a 60°C para evitar a absorção de umidade. Caso contrário, secar uma massa adequada do reagente em estufa a $103\text{-}105^\circ\text{C}$ por cerca de 2 h, no mínimo, resfriando em dessecador antes do uso;
- (b) transferir cerca de 1 litro de água deionizada para um erlenmeyer de 2.000 mL e dissolver 20,432 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$;
- (c) vagarosamente, adicionar 334 mL de ácido sulfúrico concentrado, medido com auxílio de proveta de vidro graduada. **CUIDADO: A reação é extremamente exotérmica!**
- (d) enquanto a solução ainda estiver quente, adicionar 66,6 g de sulfato de mercúrio (HgSO_4) e manter em agitação magnética vigorosa até a completa dissolução do reagente. **CUIDADO com respingos! Trabalhar com o vidro da capela abaixado;**
- (e) aguardar a solução resfriar até a temperatura ambiente e transferir para balão volumétrico de 2.000 mL, completando o volume com água deionizada;
- (f) armazenar a solução em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado.

Observação: *O preparo de uma nova solução de digestão (solução com dicromato de potássio) exige o levantamento de uma nova curva de calibração!*

2.2.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (90 – 900 MG/L)

A DQO de 1,000 mg de hidrogenoftalato de potássio (KHP), padrão primário, é de 1,176 mg O_2 .

- (a) Armazenar o KHP em estufa a 60°C para evitar a absorção de umidade. Caso contrário, secar uma massa adequada do reagente em estufa a $103\text{-}105^\circ\text{C}$ por 2 h, no mínimo, e resfriar em dessecador antes do uso;
- (b) dissolver 0,851 g do KHP em água deionizada (o ideal é pesar exatamente esse valor, para usar diretamente a Tabela 2; caso não seja possível, anotar a massa exata e calcular a DQO real da solução, adaptando os valores da tabela). Transferir o reagente para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água deionizada (solução mãe de 2.000 mg DQO/L);
- (c) conforme a Tabela 2, preparar os padrões, no mínimo em triplicatas*, para o levantamento da curva de calibração para a faixa de concentrações de **90 a 900 mg DQO/L**.

***Observação:** *Levar em conta que a triplicata implica no preparo de três soluções de mesma concentração, e não retirar três alíquotas da mesma solução para fazer a medida.*

Tabela 2: Relação das concentrações padrões e alíquotas da solução mãe para a curva alta da DQO.

Concentrações estimadas (mg DQO/L)	Alíquota da solução mãe (µL) para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0 (branco)	0
90	450
150	750
300	1.500
450	2.250
600	3.000
750	3.750
900	4.500

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução digestora for preparada ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

2.2.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DQO FRAÇÃO TOTAL

ATENÇÃO: Usar jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança!

- (a) Em tubos de borossilicato com tampas rosqueáveis (tubos de DQO padrão HACH®), com o auxílio de micropipeta, adicionar 1,25 mL* de amostra bruta (a diluição da amostra se faz necessária quando a DQO esperada for maior que 900 mg/L), ou das soluções padrões preparadas para a curva de calibração;
- (b) preparar um branco com água deionizada (1,25 mL) no lugar da amostra;
- (c) segurando o tubo próximo à rosca, adicionar, com o auxílio de dispensadores automáticos, 0,75 mL da solução de dicromato de potássio e, **vagarosamente**, 1,75 mL da solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado;
- (d) **fechar hermeticamente** o tubo e homogeneizar o conteúdo por inversões sucessivas, segurando-o pela tampa;
- (e) a análise poderá ser interrompida neste ponto, desde que as amostras sejam estocadas no escuro;
- (f) manter os tubos em digestor previamente aquecido à temperatura de 150°C durante 120 min;
- (g) após esse tempo, retirar os tubos do digestor e aguardar o resfriamento até a temperatura ambiente, estocando-os ao abrigo da luz;
- (h) na sequência, ajustar o espectrofotômetro em comprimento de onda de 600 nm;
- (i) homogeneizar os tubos por inversões, zerar o espectrofotômetro com o teste em branco e ler as absorbâncias das amostras;
- (j) interpolar o resultado na curva de calibração;
- (k) para obtenção da curva de calibração, plotar as absorbâncias das soluções padrões no eixo Y contra os valores de DQO em mg/L das soluções de KHP no eixo X, e determinar a equação da reta obtida;
- (l) descartar adequadamente o resíduo da análise em frascos próprios e lavar convenientemente a vidraria utilizada: Jamais descartar os resíduos na pia!

***Observações:**

1) Os volumes da amostra (1,25 mL), da soluções digestora (0,75 mL) e da solução catalítica (1,75 mL) aqui propostos são proporcionais aos volumes recomendados pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005), devendo a altura final da mistura na cubeta ser suficiente para a leitura no espectrofotômetro. Caso isso não ocorra, aumentar os volumes mantendo sempre a mesma proporção entre a amostra e as soluções reagentes.

2) Quando for utilizada a solução comercial da HACH® para determinação de DQO, bem como a curva instalada no espectrofotômetro do mesmo fabricante (Method 8000), o volume de amostra deverá ser de 2,00 mL.

3) Amostras contendo concentrações expressivas de material em suspensão devem ser previamente homogeneizadas em liquidificador (de preferência, utilizar um volume próximo de 100 mL). Em seguida, transferir a amostra para béquer em agitação magnética em velocidade adequada para obter a formação de um pequeno vórtex na superfície do líquido. Pipetar, então, o volume necessário para efetuar a diluição e/ou análise garantindo uma amostragem representativa.

2.2.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DQO FRAÇÃO DISSOLVIDA

Utilizar amostras previamente filtradas em membrana com poros de 0,45 µm.

2.2.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DQO FRAÇÕES COLOIDAL + DISSOLVIDA

Utilizar amostras previamente filtradas em membrana com poros de 1,2 µm.

2.2.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DQO FRAÇÃO PARTICULADA

A fração particulada (ou em suspensão) da DQO é calculada pela diferença entre os valores da DQO total e a DQO das frações coloidal + dissolvida.

Alternativamente pode-se realizar a separação da matéria orgânica suspensa em um volume conhecido de amostra ($V_{ORIGINAL}$) por centrifugação (3.500 – 5.000 rpm por, no mínimo, 10 min).

Na sequência, o material sedimentado deve ser ressuspenso em um volume conhecido de água deionizada ($V_{ÁGUA}$) com auxílio de vórtex. Homogeneizar adequadamente a amostra e submeter uma alíquota ao teste para determinação da DQO em suspensão. Por fim, calcular o fator de diluição empregado ($V_{ÁGUA} / V_{ORIGINAL}$) e multiplicar pelo resultado final da análise.

2.3. REMOÇÃO DA INTERFERÊNCIA DEVIDA A SULFETOS (ADAPTADO DE POINAPEN; EKAMA; WENTZEL, 2009)

O sulfeto é uma substância inorgânica reduzida facilmente oxidada pelo íon dicromato em meio ácido, de modo que concentrações elevadas desse composto em amostras submetidas ao teste da DQO deverão ser descontadas. Embora o coeficiente estequiométrico teórico de oxidação do sulfeto seja 2,0 g DQO/g Sulfeto, Aquino, Silva e Chernicharo (2006) obtiveram, na prática, um coeficiente empírico da ordem de 1,2 g DQO/g

Sulfeto, o que se atribuiu à volatilização de uma parcela do sulfeto de hidrogênio sob as condições ácidas do teste.

Para a remoção do sulfeto presente na amostra previamente à análise da DQO pode ser empregado o procedimento descrito a seguir:

- (a) Medir 50 mL da amostra de interesse em proveta de vidro graduada e transferir para tubo de centrifugação tipo *falcon* de 50 mL;
- (b) dosar uma quantia em excesso (cerca de 0,5 g ou ½ espátula) de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) para precipitar o sulfeto sob a forma de sulfeto de zinco (ZnS);
- (c) adicionar, em seguida, 3 gotas de solução de hidróxido de sódio 10 M ($NaOH - 400 \text{ g/L}$) para elevação do pH e favorecimento da precipitação do sulfeto de zinco e dos íons Zn^{2+} em excesso (preparo da solução de $NaOH$ conforme item 20.1.4);
- (d) agitar em vórtex durante 5 s e centrifugar a 3.500 – 5.000 rpm por, no mínimo, 5 min;
- (e) filtrar o sobrenadante (0,45 – 1,2 μm), se necessário, e utilizá-lo na determinação da DQO dissolvida;
- (f) caso sejam utilizados menores volumes de amostra, a dosagem de sulfato de zinco e da solução de $NaOH$ também deverão ser proporcionalmente diminuídas.

Observação: *A aplicação do presente pré-tratamento em amostras contendo sulfetos impede a quantificação da fração total ou em suspensão da DQO orgânica da amostra. Caso seja necessário, preservar a amostra imediatamente após a coleta dosando 3 gotas da solução de $NaOH$ 10 M para cada 50 mL de amostra e analisar diretamente uma alíquota bruta, sem adição de zinco. Na sequência, descontar a contribuição devida ao sulfeto do resultado final da análise para obter a DQO orgânica total da amostra. Para converter a concentração de sulfeto total (determinada na mesma amostra pelo método colorimétrico – item 20.1) em termos de DQO, aplicar criteriosamente um dos dois fatores acima mencionados (1,2 ou 2,0 g DQO/g Sulfeto). Um maior detalhamento desse procedimento também pode ser encontrado no trabalho de Godoi (2018).*

2.4. REMOÇÃO DO EXCESSO DE ÍONS CLORETOS (ADAPTADO DE TZENG; CHEN, 1993)

Para efetuar a remoção da interferência dos íons cloreto em excesso ($> 2.000 \text{ mg Cl}^-/\text{L}$), algumas estratégias podem ser encontradas na literatura.

O presente método consiste em adicionar à amostra algumas gotas de uma solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 1 M (preparo da solução conforme item 8.5), para a precipitação dos íons cloretos sob a forma de cloreto de prata ($AgCl$), o qual é insolúvel. Sulfetos em solução também são removidos por esse método.

Esse procedimento é válido para a remoção de cloretos em amostras com concentrações de DQO acima de 100 mg/L. Para amostras com concentrações inferiores, uma solução de sulfato de prata ao invés de nitrato é recomendada (TZENG; CHEN, 1993).

- (a) Medir 20 mL da amostra de interesse em proveta de vidro graduada e transferir para balão volumétrico de 25 mL;
- (b) dosar algumas gotas da solução de nitrato de prata ($AgNO_3$) 1 M e observar se ocorre a formação de uma suspensão branca (cloreto de prata coloidal);

- (c) é possível que, antes da suspensão branca, uma coloração marrom apareça, com a deposição de um precipitado escuro; nesse caso, continuar dosando, gota a gota, a solução de nitrato de prata, até que se inicie a formação da suspensão branca, o que indica a formação do AgCl;
- (d) continuar a dosagem, aguardando um intervalo de tempo entre uma gota e outra, até que não se observe mais a formação da suspensão branca na superfície do sobrenadante;
- (e) completar o volume do balão com água deionizada, homogeneizar e transferir para tubo de centrifugação tipo *falcon* de 50 mL;
- (f) centrifugar a 3.500 – 5.000 rpm por, no mínimo, 5 min;
- (g) filtrar o sobrenadante (0,45 – 1,2 µm) e utilizá-lo na determinação da DQO dissolvida;
- (h) levar em consideração o fator de diluição empregado (1,25 x) para corrigir o resultado final da análise (além das diluições adicionais, caso tenham sido necessárias);
- (i) descartar adequadamente o precipitado;
- (j) conforme a necessidade, volumes menores de amostra também podem ser submetidos ao presente pré-tratamento.

Observações:

1) *Uma desvantagem de recorrer ao presente método se deve ao fato dos sólidos em suspensão serem removidos pela centrifugação e filtração da amostra, inviabilizando a determinação da fração total da DQO. Como alternativa, a determinação da DQO em suspensão pode ser obtida separadamente, por meio da estratégia de centrifugação descrita no item 2.2.8. O sobrenadante, por sua vez, pode ser submetido ao método de remoção de cloretos para determinação da DQO dissolvida da amostra.*

2) *Outra alternativa para a minimização dos efeitos de altas concentrações de cloretos no teste da DQO é reportada com sucesso por Freire e Sant'Anna (1998). O método proposto pelos autores consiste na utilização de soluções digestoras com maiores concentrações de HgSO₄ (83,3 g/L). Nesse caso, as curvas de calibração (faixas alta e baixa) também deverão ser confeccionadas utilizando-se as soluções digestoras modificadas. Deve-se preparar também alguns padrões de DQO contendo teores de cloretos (usar NaCl ou KCl) similares àqueles esperados nas amostras em questão para verificação da eficácia do método.*

2.5. REMOÇÃO DE ÍONS NITRITO (ADAPTADO DE AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2005))

Para corrigir interferências decorrentes de altas concentrações de nitrito (NO₂⁻), pode-se utilizar uma solução de ácido sulfâmico 2% (NH₂SO₃H – 20,0 g/L – preparo conforme item 18.1.7).

Adicionar 1,0 mL dessa solução a cada 10,0 mL de amostra (já previamente diluída para a faixa de análise de DQO, caso necessário) e agitar por cerca de 1 min (essa proporção de ácido sulfâmico é suficiente para efetuar a remoção de uma concentração de nitrito de até cerca de 200 mg N-NO₂⁻/L na amostra).

Tratar o branco da mesma forma que a amostra, adicionando a mesma proporção da solução de ácido sulfâmico 2%. Submeter a amostra tratada ao teste da DQO e corrigir o resultado final da análise multiplicando-o pelo fator 1,1 (referente à diluição da amostra pela solução de ácido sulfâmico).

2.6. MÉTODO PARA CONCENTRAÇÕES DE DQO DE 10 A 90 MG/L

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

2.6.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Este método pode ser utilizado para a determinação de concentrações de DQO entre 10 e 90 mg O₂/L.

Enquanto na metodologia anterior, para concentrações de DQO maiores que 100 mg O₂/L, o aumento do íon crômico (Cr³⁺) é determinado na região dos 600 nm, no presente procedimento acompanha-se o decaimento da concentração do íon dicromato (Cr₂O₇²⁻), reduzido no processo de oxidação da matéria orgânica. A leitura da concentração remanescente do íon dicromato é feita em comprimento de onda de 420 nm, no qual a absorção do Cr³⁺ é muito menor que a do dicromato.

Levar em conta que, para concentrações abaixo dos 25 mg O₂/L, o resultado do teste da DQO deverá ser empregado mais com caráter qualitativo que quantitativo.

2.6.2. MATERIAL

Mesmo que no método da DQO para altas concentrações (item 2.2.1).

2.6.3. SOLUÇÕES REAGENTES

A solução catalítica (sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado) é a mesma utilizada no método da DQO para altas concentrações (procedimento de preparo no item 2.2.2).

Já a solução de digestão é preparada com concentração de 1,022 g/L de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). A proporção de ácido sulfúrico concentrado (167 mL para cada 1.000 mL de solução final) e a concentração de sulfato de mercúrio (33,3 g/L) são mantidas iguais que no método anterior. O modo de preparo pode ser visto no item 2.2.3. **Lembrar apenas de corrigir a massa do dicromato de potássio!**

***Observação:** Pela alta sensibilidade do método, recomenda-se a utilização de água deionizada recentemente coletada e não estocada em frascos de plástico no preparo das soluções reagentes, bem como na diluição de amostras, a fim de se evitarem erros decorrentes de contaminação.*

2.6.4. SOLUÇÃO DO PADRÃO KHP (DQO TEÓRICA DE 1.000 MG/L)

Em balança analítica, pesar cerca de 0,425 g de hidrogenoftalato de potássio (KHP), previamente seco em estufa (seja mantido a 60°C por mais que 24 h, ou a 103-105°C por, no mínimo, 2 h, e resfriado em dessecador). **O ideal é pesar a massa exata. Caso não seja possível, anotar a massa aferida para ser usada nos cálculos das concentrações reais.** Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 500 mL, completando o volume com água deionizada (solução mãe).

2.6.5. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (10 – 90 MG/L)

Transferir as alíquotas da solução mãe correspondentes à DQO desejada, sempre em triplicatas*, conforme a Tabela 3, para balão volumétrico de 50,0 mL.

****Observação:** Levar em conta que a triplicata implica no preparo de três soluções de mesma concentração, e não retirar três alíquotas da mesma solução para fazer a medida.*

Tabela 3: Volumes da solução de KHP usados na preparação da curva baixa da DQO.

Concentrações estimadas (mg DQO/L)	Alíquotas da solução estoque (μ L) para balão volumétrico de 50 mL
0 (branco)*	0
10	500
20	1.000
40	2.000
60	3.000
80	4.000
90	4.500

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução digestora for preparada ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

***Observações:**

1) Originalmente, o espectrofotômetro deveria ser zerado com uma cubeta de DQO contendo apenas água deionizada, sem adição das soluções reagentes. Um branco (DQO = 0 mg/L) preparado com 1,25 mL de água deionizada + os reagentes do método deveria ser digerido em conjunto com as amostras. No preparo da curva de calibração, plotavam-se as diferenças obtidas entre a absorbância do branco e a absorbância dos padrões ($A_{BRANCO} - A_{PADRÃO}$) contra o valor da concentração de cada padrão.

2) Partindo da experiência prática do LPB, basta que seja preparado um teste em branco consistindo de água deionizada (1,25 mL) + os reagentes do método. Esse branco é submetido ao mesmo procedimento de digestão que as amostras e utilizado para zerar o espectrofotômetro. Para o traçado da curva de calibração, as absorbâncias negativas obtidas (visto que decresce a concentração do íon dicromato com o aumento da DQO) são plotadas contra a concentração de cada padrão, permitindo a leitura direta das amostras.

2.6.6. PROCEDIMENTO PARA LEITURA DAS AMOSTRAS

ATENÇÃO: Usar jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança!

- (a) Transferir 1,25 mL das amostras, ou das soluções padrões, para os respectivos tubos de DQO (lembrar que a diluição se faz necessária sempre que a DQO esperada for maior que 90 mg/L);
- (b) preparar um branco com água deionizada (1,25 mL) no lugar da amostra;
- (c) segurando o tubo próximo à rosca, adicionar, com o auxílio de dispensadores automáticos, 0,75 mL da solução de dicromato de potássio e, **vagarosamente**, 1,75 mL da solução de sulfato de prata em ácido sulfúrico concentrado;
- (d) **fechar hermeticamente** o tubo e homogeneizar o conteúdo por inversões sucessivas, segurando-o pela tampa;

- (e) a análise poderá ser interrompida neste ponto, desde que as amostras sejam estocadas no escuro;
- (f) manter os tubos em digestor previamente aquecido à temperatura de 150°C durante 120 min;
- (g) após esse tempo, retirar os tubos do digestor e aguardar o resfriamento até a temperatura ambiente, estocando-os ao abrigo da luz;
- (h) na sequência, ajustar o espectrofotômetro em comprimento de onda de 420 nm;
- (i) homogeneizar os tubos por inversões, zerar o espectrofotômetro com o teste em branco e ler as absorbâncias das amostras;
- (j) interpolar o resultado na curva de calibração;
- (k) descartar adequadamente os resíduos da análise em frascos próprios: Jamais na pia!

3. CARBOIDRATOS – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

3.1. AÇÚCARES TOTAIS – MÉTODO DO FENOL-SULFÚRICO

(DUBOIS et al., 1956; BLUNDI; GADELHA, 2001)

3.1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Descrito por Dubois et al. (1956), o método utilizado para a determinação de carboidratos totais consiste na desidratação dos açúcares de uma amostra pela ação do ácido sulfúrico concentrado, seguido da complexação dos compostos formados (furfural para pentoses e 5-hidroximetilfurfural para hexoses) com o fenol, o que resulta na produção de uma substância de coloração alaranjada, com pico de absorvância máxima próximo dos 490 nm.

A concentração de carboidratos da amostra é então determinada através de uma curva de calibração previamente construída a partir de uma solução padrão do carboidrato escolhido como referência (glicose ou sacarose, por exemplo).

Este método é rápido e simples, possibilitando a aquisição de resultados bastante reprodutíveis, sendo a substância colorida estável por várias horas.

Deve-se levar em conta que, em alguns casos, a interação do ácido sulfúrico com outros constituintes orgânicos presentes na amostra pode resultar em interferências positivas, as quais devem ser corrigidas por meio da construção de uma curva de calibração modificada (GERCHACOV; HATCHER, 1972) e utilizando como branco a própria amostra, a qual é tratada com H₂SO₄ sem adição de fenol (item 3.1.6).

3.1.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 µm de poro
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Micropipeta de 1.000 µL
- Pipeta de vidro graduada de 1.000 µL
- Balões volumétricos de 50 e 1.000 mL
- Dispensador automático de 5,0 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Ácido Sulfúrico concentrado – H₂SO₄ P.A.
- Fenol – C₆H₅OH P.A.
- Padrão analítico do carboidrato de referência

3.1.3. SOLUÇÃO DE FENOL A 5%

ATENÇÃO: *Trabalhar em capela sob exaustão. Usar luvas nitrílicas, óculos de segurança e máscara contra compostos orgânicos voláteis! O fenol é extremamente TÓXICO!*

- (a) Talar a balança analítica com um frasco de vidro tampado, o qual será utilizado para a pesagem da massa de fenol (C₆H₅OH) (colocar um aviso de reservado na balança para que outro usuário não altere a tara);

- (b) na capela, com a exaustão ligada, ir adicionando o fenol ao frasco. Depois de transferir uma massa considerável, tampar o frasco e levá-lo para ser pesado na balança anteriormente tarada;
- (c) repetir o procedimento até a obtenção de 50 gramas de fenol;
- (d) com água deionizada, transferir a massa de fenol para um balão volumétrico de 1.000 mL por meio de lavagens sequenciais;
- (e) completar o volume do balão com água deionizada e homogeneizar até a completa dissolução do reagente;
- (f) armazenar a solução de fenol a 5% em frasco âmbar bem fechado, ao abrigo da luz e devidamente identificado.

Observação: O preparo de uma nova solução de fenol a 5% exige a construção de uma nova curva de calibração!

3.1.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (10 – 100 MG/L)

Em balão volumétrico de 1.000 mL preparar uma solução mãe com 1.000 mg/L do carboidrato de interesse (glicose, sacarose ou lactose, por exemplo) completando com água deionizada.

Construir a curva de calibração com diferentes concentrações do carboidrato de interesse em água deionizada, conforme indicado na Tabela 4. Usar triplicatas para cada concentração, o que significa preparar três soluções de mesma concentração, e não retirar três alíquotas do mesmo balão volumétrico para fazer a medida. Submeter os padrões ao mesmo procedimento descrito a seguir para as amostras (item 3.1.5).

Tabela 4: Relação das concentrações padrões e alíquotas da solução mãe para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Carboidrato/L)	Alíquota da solução mãe (µL) para diluição em balão volumétrico de 50 mL
0 (branco)	0
10	500
20	1.000
40	2.000
60	3.000
80	4.000
100	5.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução de fenol 5% for preparada ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

3.1.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS

- (a) Transferir 500 µL de amostra bruta (carboidratos totais) ou filtrada em 0,45 µm (carboidratos dissolvidos) para tubo de DQO;
- (b) na capela, com a exaustão ligada e auxílio de pipeta de vidro (ver observações*), adicionar 500 µL da solução de fenol 5%;
- (c) ainda sob exaustão, adicionar, com auxílio de dispensador automático, 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, rapidamente e com o jato direcionado para a superfície do líquido, de modo a obter uma boa mistura (ver observações*);

- (d) tampar o tubo e deixar em repouso por 10 min;
- (e) após esse período, agitar e imergir os tubos em banho de água por cerca de 15 min para o resfriamento até a temperatura ambiente;
- (f) zerar o espectrofotômetro com o teste em branco (água deionizada no lugar da amostra) em comprimento de onda de 490 nm e efetuar a leitura das absorbâncias das amostras;
- (g) a cor formada é estável, podendo a leitura ser adiada após a adição dos reagentes, caso seja necessário, por até cerca de 24 h.

***Observações:**

- 1)** Não utilizar micropipetas na transferência de compostos voláteis, ácidos concentrados e solventes! Pipetas de vidro são mais indicadas para esse propósito!
- 2)** Muito cuidado ao manusear o frasco de ácido concentrado: Trabalhar na capela, usar jalecos, luvas nitrílicas e óculos de segurança!
- 3)** Para adicionar a solução fenólica também pode-se empregar um dispensador automático, ajustado para 0,5 mL, devendo apenas ser realizado um descarte prévio do fenol que permanece estagnado no bico do dispensador todo dia em que a solução for utilizada.
- 4)** Não afundar demais o bico dos dispensadores automáticos nos tubos contendo amostras, de modo a evitar respingos ocasionais que podem contaminar o aparelho de uso comum.

3.1.6. CORREÇÃO DE INTERFERÊNCIAS (ADAPTADO DE GERCHACOV; HATCHER, 1972)

Caso se suspeite da presença de outros constituintes orgânicos na matriz da amostra que possam implicar em interferências sobre o resultado final da análise, recomenda-se a construção de uma curva de calibração modificada. Para isso, preparar a mesma série de padrões indicados na Tabela 4. Para cada padrão, entretanto, preparar em conjunto um branco modificado, substituindo a adição da solução fenólica por 500 µL de água deionizada.

Aguardar o mesmo período de reação indicado na metodologia convencional (item 3.1.5) e efetuar a leitura dos padrões no mesmo comprimento de onda (490 nm), zerando o espectrofotômetro antes da leitura de cada padrão com o seu respectivo branco modificado.

Traçar a curva de calibração modificada plotando os valores das absorbâncias obtidas ($ABS_{MODIFICADA}$) contra o valor da concentração de cada padrão ($ABS_{MODIFICADA} \times \text{Concentração}_{PADRÃO}$).

Para a correção de interferências em amostras reais, preparar um branco modificado (sem fenol) para cada amostra, consistindo de 500 µL da amostra em questão + 500 µL de água deionizada e 2,5 mL de H₂SO₄.

Após o período de reação, zerar o espectrofotômetro com o branco modificado e ler, por fim, a absorbância da amostra tratada conforme o método convencional (com adição de fenol – item 3.1.5), interpolando o resultado na curva de calibração modificada.

3.2. AÇÚCARES REDUTORES – MÉTODO DO DNS

(MILLER, 1959)

3.2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O método do ácido dinitro-3,5-salicílico (DNS), descrito por Miller (1959), é utilizado para a quantificação de açúcares redutores totais, em concentrações de até 5.000 mg/L. O método baseia-se na reação entre o açúcar redutor e o ácido 3,5-dinitrosalicílico (cor amarelo), que é reduzido a um composto colorido avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, com oxidação do monossacarídeo redutor. A cor avermelhada formada é lida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

A concentração de açúcares redutores da amostra é determinada através de uma curva de calibração previamente construída a partir de uma solução padrão de glicose.

Deve-se levar em conta que o método do DNS permite apenas a quantificação dos açúcares classificados como redutores, ou seja, aqueles que apresentam um grupo carbonila (C=O) livre em meio alcalino, sendo passíveis de serem oxidados para dar origem a ácidos carboxílicos. Glicose, frutose, maltose e lactose são os exemplos mais comuns de açúcares redutores. Já a sacarose, por suas propriedades diversas (ligações glicosídeas), é o exemplo mais comum de açúcar não redutor, não sendo por isso determinado pelo presente método, a não ser que uma etapa de hidrólise ácida ou quebra enzimática da sacarose em glicose + frutose seja previamente efetuada.

3.2.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 µm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Banho termostático (100°C)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Copos de béquer de 100 e 2000 mL
- Balões volumétricos de 10 e 100 mL
- Micropipeta de 1.000 µL
- Pipetas graduadas de vidro de 1,00 e 5,00 mL
- Provetas graduadas de 100 e 1000 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Glicose – C₆H₁₂O₆ P.A.
- Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) P.A.
- Fenol – C₆H₅OH P.A.
- Metabissulfito de Sódio – Na₂S₂O₅ P.A.
- Tartarato de Sódio e Potássio – KNaC₄H₄O₆ P.A.

3.2.3. REAGENTE DNS

(a) Em balança analítica, pesar 10,6 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e 19,8 g de NaOH;

(b) em béquer de 2.000 mL, dissolver os reagentes com 1416 mL de água deionizada (medir com auxílio de proveta graduada);

- (c) após a dissolução completa, adicionar (na capela, sob exaustão) 7,6 mL de fenol fundido a 50°C (preparado conforme o procedimento apresentado a seguir, no item 3.2.4);
- (d) em seguida, adicionar 306,0 g de tartarato de sódio e potássio ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), e 8,3 g de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$);
- (e) homogeneizar a solução e manter refrigerada, em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado.

Observação: *O preparo de uma nova solução do reagente DNS exige o levantamento de uma nova curva de calibração!*

3.2.4. FUSÃO DE FENOL A 50°C

ATENÇÃO: *Trabalhar em capela sob exaustão. Usar luvas nitrílicas, óculos de segurança e máscara contra compostos orgânicos voláteis! O fenol é extremamente TÓXICO!*

- (a) Transferir para um frasco de vidro com tampa cerca de 9 g de fenol (*tarar a balança analítica com o frasco tampado; na capela, com a exaustão ligada, adicionar uma massa de fenol aproximada; tampar o frasco e pesar; repetir o procedimento até obter a massa desejada*);
- (b) colocar o frasco tampado em banho de água a 50°C até o derretimento da massa de fenol;
- (c) com pipeta de vidro graduada transferir (ainda na capela, com a exaustão ligada) o volume de 7,6 mL do fenol liquefeito para a solução reagente DNS (item 3.2.3);
- (d) descartar adequadamente o resíduo de fenol.

Observação: *Uma massa maior de fenol poderá ser pesada caso se deseje guardar o fenol nesse mesmo frasco para uso posterior. Armazenar o frasco do reagente ao abrigo da luz, refrigerado, devidamente tampado e identificado.*

3.2.5. SOLUÇÃO PADRÃO DE GLICOSE (10 G/L)

- (a) Pesar, em balança analítica, 1.000 mg de glicose e dissolver com aproximadamente 50 mL de água deionizada em béquer de 100 mL em agitação magnética constante;
- (b) transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada, e homogeneizar vigorosamente;
- (c) esta solução deve ser preparada e utilizada no mesmo dia do levantamento da curva de calibração.

3.2.6. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,5 – 5,0 G/L)

Fazer diluições partindo da solução padrão de glicose (10,0 mg/mL) com água deionizada em balões volumétricos de 10 mL, conforme demonstrado na Tabela 5.

Preparar os padrões em triplicatas (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração para efetuar a medida). Homogeneizar vigorosamente as soluções e transferir 1,0 mL de cada padrão para tubos de DQO.

Na sequência, aplicar o teste de DNS conforme o procedimento apresentado a seguir (item 3.2.7).

Tabela 5: Preparação das diluições da solução padrão de glicose ou frutose a 1,0 g/L.

Volume da solução padrão (10 mg/mL)	Volume de água deionizada	Concentração final (mg/mL)
0,0 mL (branco)	10,0 mL	0,0
0,5 mL	9,5 mL	0,5
1,0 mL	9,0 mL	1,0
2,0 mL	8,0 mL	2,0
3,0 mL	7,0 mL	3,0
4,0 mL	6,0 mL	4,0
5,0 mL	5,0 mL	5,0

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução do reagente DNS for preparada ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

3.2.7. TESTE DO DNS: PROCEDIMENTO DE DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES

- (a) Transferir 1,0 mL da amostra filtrada em membrana de 0,45 µm (ou solução padrão) para tubo de DQO e adicionar 1,0 mL do reagente DNS;
- (b) aquecer em banho de água em ebulição por 5 min;
- (c) em seguida, resfriar o tubo em banho de gelo por 5 min;
- (d) acrescentar 5,0 mL de água deionizada aos tubos (não considerar este volume no fator de diluição);
- (e) zerar o espectrofotômetro com o branco e efetuar a leitura da absorbância das amostras (e padrões) a 540 nm. O branco consiste em substituir o volume de amostra ou solução padrão de glicose por água deionizada (1,0 mL).

Observação: As amostras devem ser diluídas convenientemente para que as suas concentrações de carboidratos não ultrapassem o limite de 5,0 g/L.

4. PROTEÍNAS – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

4.1. MÉTODO DO MICRO-BIURETO

(STICKLAND, 1951; BLUNDI et al., 1990)

4.1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O método aqui apresentado para a determinação da concentração de proteínas totais é o do micro-biureto, conforme procedimento descrito por Stickland (1951). Entre os diversos métodos existentes para esse fim, trata-se do mais simples entre os mais comumente empregados. Consiste na adição de hidróxido de sódio e sulfato de cobre à amostra. O cobre (II) em meio alcalino reage com as proteínas, formando um complexo com a ligação peptídica. O excesso de hidróxido de cobre e material intracelular insolúvel, por sua vez, é removido através de centrifugação. A intensidade da cor violeta desenvolvida é proporcional à quantidade de proteínas presente na amostra e a sua absorbância pode ser medida em espectrofotômetro em duas bandas de comprimentos de onda: Na região do UV, ente 270 e 310 nm; ou na região do visível, entre 500 e 540 nm.

Apesar da banda na região do ultravioleta aumentar em seis vezes a sensibilidade do método, a banda na região do visível é a mais utilizada para fins analíticos, uma vez que diversas substâncias normalmente presentes em águas residuárias também absorvem na região do ultravioleta, especialmente compostos orgânicos, causando interferências (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Outras interferências importantes a serem levadas em conta durante a realização da análise estão relacionadas com a presença de açúcares, amido e aminoácidos, os quais reagem com o íon cúprico (Cu^{2+}) implicando em falsos resultados positivos (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998). Uma estratégia adicional para a remoção de interferentes consiste na separação das proteínas por precipitação com ácido tricloroacético, centrifugação e posterior ressuspensão do precipitado em solução alcalina, conforme sugerido na literatura (HILLER; GREIF; BECKMAN, 1948).

No caso da análise ter por objetivo a determinação do teor de proteínas constituintes da biomassa (por exemplo, para a determinação indireta da concentração de microrganismos), a amostra deverá ser submetida a uma etapa de aquecimento após a dosagem do NaOH, promovendo-se assim a hidrólise alcalina do material celular com a consequente liberação das proteínas para o meio líquido (BLUNDI; POVINELLI; LALLUCE, 1990).

A concentração de proteínas é determinada com o auxílio de uma curva de calibração previamente construída usando-se, por exemplo, uma solução de caseína ou de soro-albumina bovina como padrão.

4.1.2. MATERIAL

- Agitador Vórtex
- Agitador magnético e barra magnética
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Banho termostático ou chapa aquecedora
- Centrífuga de bancada
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro (UV-Vís)
- Micropipetas de 1.000, 5.000 e 10.000 μL
- Balões volumétricos de 10, 50 e 100 mL
- Proveta de vidro graduada de 100 mL

- Copos de béquer de 50 e 100 mL
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 15 mL
- Cubetas de quartzo com passo óptico de 1,0 cm (para leitura na região do UV)
- Cubetas de vidro ótico com passo de 1,0 cm (ou tubos de DQO padrão HACH®)
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Sulfato de Cobre pentahidratado – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Ácido Tricloroacético – CCl_3COOH P.A.
- Padrão analítico da proteína de referência

4.1.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 20%

Na capela, sob exaustão, dissolver **cuidadosamente** 20,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) P.A. em cerca de 80 mL de água deionizada. Utilizar béquer de plástico e realizar o procedimento usando luvas e óculos de segurança. Resfriar a solução até a temperatura ambiente e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada.

4.1.4. PREPARO DA SOLUÇÃO SUPERSATURADA DE SULFATO DE COBRE 25%

Dissolver 25,0 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água deionizada e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume com água deionizada. Manter em agitação magnética vigorosa até a dissolução do reagente. Por se tratar de uma solução saturada, pode apresentar precipitado de fundo.

4.1.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.1.1.1. ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 10%

Pelo fato do ácido tricloroacético (TCA) consistir de um reagente extremamente higroscópico, difícil de ser manuseado e pesado adequadamente, deve-se preparar previamente uma solução estoque a 100% (m/v) adicionando-se 227 mL de água deionizada em um frasco de 500 g de ácido tricloroacético recém-aberto. Homogeneizar bem e armazenar a solução refrigerada, a 4°C, em frasco de vidro âmbar devidamente fechado e identificado. Em seguida, preparar uma solução de TCA a 10% diluindo 10 mL da solução estoque 100% em 90 mL de água deionizada. Armazenar refrigerada, em frasco de vidro e ao abrigo da luz.

4.1.1.2. HIDRÓXIDO DE SÓDIO 3%

Pesar 3,0 g de hidróxido de sódio e dissolver completamente em cerca de 80 mL de água deionizada. Aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 100 mL, completando o volume.

4.1.2. LEVANTAMENTO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Inicialmente, preparar a solução padrão utilizando a proteína escolhida como referência (soroalbumina bovina ou caseína, por exemplo). Para a leitura na região do ultravioleta (UV), em 310 nm, o método apresenta boa linearidade na faixa de **10 a 500 mg/L**, aproximadamente. Já para a leitura na região do visível, em 540 nm, a faixa de concentração vai de cerca de **100 a 3.000 mg/L**.

Para preparo da curva de calibração, pesar, com exatidão, a proteína padrão e dissolver em béquer com água deionizada morna (~ 60°C), em agitação magnética lenta, evitando a formação de espuma. Transferir com cuidado, evitando turbulência excessiva, para balão volumétrico, e completar com água deionizada. Caso ocorra formação de espuma no balão, borrifar a superfície da espuma com um pouco de etanol 70%, até a sua dissolução, e só então completar o volume do balão com água deionizada.

Para a construção da curva de calibração no UV, preparar uma solução mãe de 1.000 mg/L (100 mg de proteína em balão de 100 mL, por exemplo). Já para a curva de calibração no visível, preparar uma solução mãe de 4.000 mg/L (400 mg de proteína em balão de 100 mL, por exemplo).

Preparar soluções intermediárias por diluição da solução mãe de proteína em balões volumétricos de 10 mL. Construir a curva de calibração com, no mínimo, 7 concentrações da proteína de referência cobrindo a faixa de interesse. Usar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração para efetuar a medida). Tratar os padrões seguindo os mesmos passos descritos para as amostras (item 4.1.4).

As tabelas a seguir apresentam exemplos de curvas de calibração que podem ser utilizadas na aplicação do método com leitura no UV (Tabela 6) ou no visível (Tabela 7):

Tabela 6: Curva de calibração para leitura de proteínas totais no UV (faixa baixa).

Concentrações estimadas (mg Proteína/L)	Alíquota (μL) da solução mãe (1.000 mg/L) para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0 (branco)	0
10	100
50	500
100	1.000
200	2.000
300	3.000
400	4.000
500	5.000

Fonte: Os autores.

Tabela 7: Curva de calibração para leitura de proteínas totais no Visível (faixa alta).

Concentrações estimadas (mg Proteína/L)	Alíquota (μL) da solução mãe (4.000 mg/L) para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0 (branco)	0
100	250
500	1.250
1.000	2.500
1.500	3.750
2.000	5.000
2.500	6.250
3.000	7.500

Fonte: Os autores.

Observação: As curvas de calibração deverão ser refeitas todas as vezes que novas soluções forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

4.1.3. PURIFICAÇÃO PRELIMINAR DA AMOSTRA (HILLER; GREIF; BECKMAN, 1948)

A presente etapa preliminar de purificação de amostras por precipitação pode ser omitida desde que interferentes estejam ausentes.

Caso a amostra apresente concentrações de proteínas totais muito baixas, pode-se utilizar a mesma estratégia para efetuar a concentração da amostra, tratando um maior número de alíquotas e ressuspensando o material precipitado em um mesmo volume de água deionizada.

Caso seja utilizado o presente procedimento no tratamento de amostras, preparar alguns padrões da curva de calibração, submeter aos mesmos passos e verificar a eficiência de recuperação de proteínas totais.

- (a) Transferir 5 mL de amostra para tubo *falcon* de 15 mL;
- (b) adicionar 5 mL da solução de ácido tricloroacético (10%), tampar, homogeneizar por inversões sucessivas do tubo e deixar em repouso por 10 min;
- (c) na sequência, centrifugar por 15 min a 5.000 rpm;
- (d) descartar o sobrenadante e colocar o tubo de ponta cabeça sobre papel absorvente para remover o líquido remanescente;
- (e) ressuspender o precipitado em 5 mL de solução de hidróxido de sódio 3% com auxílio de vórtex até a completa dissolução do material;
- (f) submeter essa amostra ao teste colorimétrico, conforme o item a seguir, utilizando como branco, nesse caso, a solução de NaOH 3%.

4.1.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS

Todos os procedimentos descritos a seguir são aplicados tanto para a construção da curva de calibração, quanto para a análise de amostras:

- (a) Transferir 3,3 mL de amostra, de solução padrão ou de água deionizada (branco) para tubo tipo *falcon* de 15 mL;
- (b) adicionar 600 µL da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 20%, tampar adequadamente o tubo e agitar em vórtex por cerca de 5 s em velocidade alta;
- (c) aquecer o tubo com a tampa semi-rosqueada em banho de água em ebulição (~ 100°C) durante 15 min;
- (d) aguardar o completo resfriamento da amostra até a temperatura ambiente e adicionar 100 µL da solução de sulfato de cobre (CuSO₄.5H₂O) 25%;
- (e) agitar novamente o tubo em vórtex por 15 s e deixar em repouso durante 5 min;
- (f) em seguida, centrifugar a suspensão a 3.500 – 5.000 rpm por, no mínimo, 5 min;
- (g) **para efetuar a leitura em comprimento de onda de 310 nm (UV)**, transferir o sobrenadante para cubeta de quartzo com passo óptico de 1,0 cm, zerar o equipamento com o teste em branco e ler a absorbância da amostra;
- (h) **para leitura em comprimento de onda de 540 nm (Visível)**, transferir o sobrenadante para cubeta de vidro com passo óptico de 1,0 cm (ou tubo de DQO padrão HACH®), zerar o equipamento com o teste em branco e ler a absorbância da amostra.

Observações:

1) Caso se deseje determinar apenas o teor solúvel de proteínas no meio líquido, realizar a filtração prévia das amostras em membranas de 0,45 µm. Caso as amostras sejam submetidas à etapa de precipitação (item 4.1.3), realizar a filtração antes do pré-tratamento.

2) Já para a determinação da fração de proteínas devida exclusivamente à biomassa ou ao material celular em suspensão, centrifugar previamente as amostras (≥ 5.000 rpm por, no mínimo, 10 min) e ressuspender o precipitado em um volume de água deionizada igual ao da amostra original. Repetir o procedimento e realizar a análise partindo dessa amostra "lavada".

4.2. PROTEÍNAS – MÉTODO DE LOWRY

(LOWRY et al. 1951; PETERSON, 1977)

4.2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O método de Lowry está entre os métodos colorimétricos mais utilizados para determinação de proteínas. O princípio desse método consiste na adição de hidróxido de sódio e carbonato de sódio à amostra contendo proteínas, além de sulfato de cobre e tartarato (de sódio ou potássio). Uma coloração violeta se forma devido à reação da proteína com o íon cobre (II) (reação do Biureto). Por outro lado, a mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu) é reduzida pelo complexo formado, levando à geração de um composto azulado, o qual apresenta absorção máxima em comprimentos de onda na faixa de 650 a 750 nm.

A adaptação da metodologia de Lowry efetuada por Peterson (1977) prevê a adição de dodecil sulfato de sódio (um surfactante aniônico) como agente solubilizante da membrana plasmática dos microrganismos em suspensão na amostra. Essa estratégia permite a determinação das proteínas intracelulares liberadas por lise, dispensando assim a necessidade de uma etapa prévia de hidrólise alcalina do material celular.

A maior vantagem do método de Lowry se deve à sua alta sensibilidade, sendo por isso utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais nos mais variados tipos de amostras (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

A sua maior desvantagem, por outro lado, se relaciona ao fato de estar sujeito a diversos interferentes, os quais acarretam em falsos resultados positivos, ou na formação de precipitados, prejudicando a análise. Entre os principais interferentes podem ser citados compostos fenólicos, detergentes, agentes redutores e açúcares, dentre outros (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Uma estratégia que pode ser aplicada para a remoção prévia de interferentes consiste na precipitação das proteínas com ácido tricloroacético, centrifugação e posterior ressuspensão do precipitado antes de efetuar a análise (PETERSON, 1977).

4.2.2. MATERIAL

- Agitador Vórtex
- Agitador magnético e barra magnética
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Cronômetro digital
- Microcentrífuga de bancada
- Espectrofotômetro
- Micropipetas de 1.000 e 5.000 μ L
- Balões volumétricos de 5, 100 e 500 mL
- Proveta graduada de 100 mL
- Copos de béquer de 100 e 500 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Tubos *Eppendorf* de 2 mL
- Hidróxido de sódio – NaOH P.A.
- Carbonato de sódio – Na₂CO₃ P.A.
- Tartarato de sódio – Na₂C₄H₄O₆ P.A.

- Dodecil sulfato de sódio – $C_{12}H_{25}SO_4Na$ P.A.
- Reagente comercial de Folin-Ciocalteu
- Sulfato de cobre pentahidratado – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ P.A.
- Ácido Tricloroacético – CCl_3COOH P.A.
- Desoxicolato de sódio – $C_{24}H_{39}NaO_4$ P.A.
- Padrão analítico da proteína de referência

4.2.3. PREPARO DO REAGENTE ALCALINO

- (a) Pesar em balança analítica: 2 g de hidróxido de sódio, 10 g de carbonato de sódio, 2,5 g de tartarato de sódio e 12,5 g de dodecil sulfato de sódio;
- (b) Dissolver cuidadosamente em béquer com cerca de 400 mL de água deionizada e manter sob lenta agitação magnética até a completa dissolução dos reagentes;
- (c) resfriar e transferir para balão volumétrico de 500 mL, completando com água deionizada;
- (d) armazenar por até 3 meses em temperatura ambiente. Sempre verificar visualmente se a solução está cristalina antes do uso.

4.2.4. PREPARO DO REAGENTE DE COBRE

- (a) Pesar em balança analítica 1 g de cloreto de cobre pentahidratado;
- (b) transferir quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) armazenar por até 1 ano em temperatura ambiente.

4.2.5. PREPARO DO REAGENTE MISTO

- (a) Misturar 50 mL do reagente alcalino com 0,5 mL do reagente de cobre (ou juntar outros volumes obedecendo à proporção de 100:1);
- (b) sempre preparar antes de cada uso.

4.2.6. PREPARO DO REAGENTE DE FOLIN-CIOCALTEU DILUÍDO

- (a) Diluir o reagente comercial de Folin-Ciocalteu com um volume igual de água até obter o volume final de solução desejado (proporção 1:1);
- (b) sempre preparar antes de cada uso.

Observação: Ao invés da utilização do reagente comercial de Folin-Ciocalteu (recomendada pela praticidade e maior confiabilidade do reagente) o mesmo poderá ser preparado pelo analista, caso necessário, conforme o procedimento apresentado pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) na seção referente à determinação de Taninos e Ligninas.

4.2.7. PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

4.2.7.1. ÁCIDO TRICLOROACÉTICO 72%

Pelo fato do ácido tricloroacético (TCA) consistir de um reagente extremamente higroscópico, difícil de ser manuseado e pesado adequadamente, deve-se preparar previamente uma solução estoque a 100% (m/v) adicionando-se 227 mL de água deionizada em um frasco de 500 g de ácido tricloroacético recém-aberto.

Homogeneizar bem e armazenar a solução refrigerada, a 4°C, em frasco de vidro âmbar devidamente fechado e identificado.

Em seguida, preparar uma solução de TCA a 72% diluindo 72 mL da solução estoque 100% em 28 mL de água deionizada. Armazenar refrigerada, em frasco de vidro e ao abrigo da luz.

4.2.7.2. DESOXICOLATO DE SÓDIO 0,15%

Pesar 0,15 g de desoxicolato de sódio e dissolver em balão volumétrico de 100 mL com água deionizada. Agitar até a completa dissolução do reagente. Armazenar refrigerado.

4.2.8. **LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (10 – 300 MG/L)**

Inicialmente, preparar a solução padrão (500 mg/L) utilizando a proteína escolhida como referência (soro-albumina bovina ou caseína, por exemplo).

Pesar, com exatidão, 50 mg da proteína padrão e dissolver em béquer com água deionizada morna (~ 60°C), em agitação magnética lenta, evitando a formação de espuma. Transferir com cuidado, evitando turbulência excessiva, para balão volumétrico de 100 mL, completando em seguida com água deionizada. Caso ocorra formação de espuma no balão, borrifar a superfície da espuma com um pouco de etanol 70% até a sua dissolução, e só então completar o volume do balão com água deionizada.

Para a construção da curva de calibração, transferir as alíquotas indicadas na Tabela 8 da solução mãe para balões volumétricos de 5 mL, completando o volume com água deionizada. Preparar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Tabela 8: Relação das concentrações padrões e alíquotas da solução mãe para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Proteína/L)	Alíquota (µL) da solução mãe (500 mg/L) para diluição em balão volumétrico de 5 mL
0 (branco)	0
10	100
25	250
50	500
100	1.000
150	1.500
200	2.000
250	2.500
300	3.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou adquiridas, e sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

4.2.9. **PURIFICAÇÃO PRELIMINAR DA AMOSTRA (PETERSON, 1977)**

A presente etapa preliminar de purificação de amostras por precipitação pode ser omitida desde que interferentes estejam ausentes.

Caso a amostra apresente concentrações de proteínas totais muito baixas, pode-se utilizar a mesma estratégia para efetuar a concentração da amostra, tratando um maior número de alíquotas e ressuspensando o material precipitado em um mesmo volume de água deionizada.

Caso seja utilizado o presente procedimento no tratamento de amostras, preparar alguns padrões da curva de calibração, submeter aos mesmos passos e verificar a eficiência de recuperação de proteínas totais.

- (a) Transferir 1 mL de amostra contendo de 10 a 300 mg/L de proteína total para tubo *ependorf* de 2,0 mL;
- (b) adicionar 0,1 mL da solução de desoxicolato de sódio (0,15%) e homogeneizar a mistura e deixar em repouso por 10 min, a temperatura ambiente;
- (c) adicionar 0,1 mL da solução de ácido tricloroacético (72%), homogeneizar e centrifugar por 10 min a 6.000 rpm;
- (d) descartar o sobrenadante e colocar o tubo de ponta cabeça sobre papel absorvente para remover o líquido remanescente;
- (e) ressuspender o precipitado em 1 mL de água deionizada com auxílio de vórtex e submeter essa amostra ao teste colorimétrico, conforme o item a seguir.

4.2.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE PROTEÍNAS

Todos os procedimentos descritos a seguir são aplicados tanto para a construção da curva de calibração, quanto para a análise das amostras:

- (a) Transferir 1 mL de amostra, de solução padrão ou de água deionizada (branco) para tubo de DQO;
- (b) adicionar 5 mL do reagente misto recém preparado, tampar adequadamente o tubo e agitar cuidadosamente em vórtex;
- (c) incubar por 10 min à temperatura ambiente;
- (d) adicionar 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído, tampar e agitar imediatamente em vórtex;
- (e) incubar por 30 min à temperatura ambiente;
- (f) zerar o espectrofotômetro com o teste em branco e efetuar a leitura da absorbância da amostra em comprimento de onda de 660 nm.

Observações:

1) *Caso se deseje determinar apenas o teor solúvel de proteínas no meio líquido, realizar a filtração prévia das amostras em membranas de 0,45 µm. Caso as amostras sejam submetidas à etapa de precipitação (item 4.2.9), realizar a filtração antes do pré-tratamento.*

2) *Já para a determinação da fração de proteínas devida exclusivamente à biomassa ou ao material celular em suspensão, centrifugar previamente as amostras (≥ 5.000 rpm por, no mínimo, 10 min) e ressuspender o precipitado em um volume de água deionizada igual ao da amostra original. Repetir o procedimento e realizar a análise partindo dessa amostra "lavada".*

4.3. DETERMINAÇÃO INDIRETA DE PROTEÍNA BRUTA PELO MÉTODO KJELDAHL

O método Kjeldahl é usualmente empregado como método de referência para a determinação total de proteínas brutas. O procedimento é baseado na quantificação da fração de nitrogênio orgânico ($N_{\text{ORGÂNICO}} = N_{\text{TK}} - N_{\text{AMONIACAL}}$) obtido pelo método de Kjeldahl (procedimento descrito no item 16.2).

Uma vez que a composição elementar da maioria das proteínas é muito similar, multiplica-se o valor de nitrogênio orgânico da amostra por um fator que converte a concentração de nitrogênio orgânico em proteína total (também chamada de "proteína bruta").

Convencionalmente, para estimar a concentração de proteína bruta (PB) utiliza-se o fator médio 6,25, uma vez que a maioria das proteínas contém em suas moléculas aproximadamente 16% de nitrogênio (RAUNKJAER et al., 1994):

$$PB \text{ (mg/L)} = 6,25 \times N_{\text{ORGÂNICO}} \text{ (mg N/L)} \quad \text{Equação 17}$$

Esta metodologia deve ser utilizada com critério, uma vez que a digestão pelo método Kjeldahl permite quantificar o nitrogênio orgânico total presente na amostra, e não apenas o nitrogênio devido a proteínas, estando incluído no resultado final o nitrogênio devido aos outros componentes (ureia, aminoácidos e ácidos húmicos, por exemplo) (MIWA; FALCO; CALIJURI, 2008).

Uma alternativa para contornar este inconveniente consiste em efetuar a precipitação das proteínas da amostra com ácido tricloroacético (SRIDHAR; PILLAI, 1973). Duas alternativas para a realização desse procedimento são apresentadas nos itens 4.1.3 e 4.2.9 do presente manual. A análise pelo método Kjeldahl do sobrenadante, por sua vez, permite a medida do nitrogênio orgânico não proteico ($N_{\text{ORGÂNICO}}^{\text{NP}}$), o qual deverá ser subtraído da medida de nitrogênio orgânico total ($N_{\text{ORGÂNICO}}^{\text{TOTAL}}$). Por fim, a conversão do nitrogênio orgânico proteico pela aplicação do fator 6,25 resultará em uma determinação mais aproximada do conteúdo de proteína bruta da amostra:

$$PB \text{ (mg/L)} = 6,25 \times (N_{\text{ORGÂNICO}}^{\text{TOTAL}} - N_{\text{ORGÂNICO}}^{\text{NP}}) \text{ (mg N/L)} \quad \text{Equação 18}$$

5. LIPÍDIOS – MÉTODO DA SULFO-FOSFO-VANILINA (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(POSTMA; STROES, 1968; BLUNDI; GADELHA, 2001)

5.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O método utilizado para a determinação de altas concentrações de lipídios é o da sulfo-fosfo-vanilina, descrito por Postma e Stroes (1968), e consiste na reação dos lipídios com ácido sulfúrico concentrado, ácido fosfórico e vanilina, a qual consiste de um aldeído fenólico. Como resultado da reação, uma substância rosada é produzida, apresentando pico de absorvância em 537 nm.

Para a realização desse ensaio é necessário verificar se a amostra encontra-se dentro da faixa de sensibilidade do método original (concentração de lipídios de 1.000 a 15.000 mg/L).

Amostras com concentrações que excedem o limite do método devem ser tratadas por diluição.

Já amostras com baixas concentrações de lipídios podem ser analisadas após uma etapa de concentração da amostra seguindo o método adaptado no LPB pelas pesquisadoras Elisabeth Moraes e Ana Paula Miqueleto, baseado na extração dos lipídios da amostra com éter etílico em meio ácido (item 5.6.1); por meio da secagem da amostra em estufa e posterior tratamento do resíduo sólido obtido (BLUNDI; GADELHA, 2001 – item 5.6.2); ou ainda utilizando-se o resíduo final da análise de óleos e graxas extraídas em Soxhlet (item 5.6.3), conforme o procedimento descrito no *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

A concentração de lipídios presente na amostra, por sua vez, é determinada com o auxílio de uma curva de calibração previamente construída com óleo vegetal ou gordura animal.

5.2. MATERIAL

- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Banho termostático (37°C e 100°C)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Estufas a 60°C e 103-105°C
- Freezer (-20°C)
- Pipetas de vidro graduadas de 1,00 e 2,00 mL
- Micropipetas de 200 e 1.000 μ L
- Balões volumétricos de 100 e 500 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Tubos de ensaio (tipo Pyrex®) de 20-50 mL com tampas
- Cubetas de vidro com passo óptico de 1,0 cm
- Ácido Fosfórico concentrado – H_3PO_4 85% P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Vanilina – $C_8H_8O_3$ P.A.
- Clorofórmio – $CHCl_3$ P.A.
- Cloreto de Sódio – NaCl P.A.
- Éter Etílico – $C_4H_{10}O$ P.A.
- Lipídio a ser usado como referência

5.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE VANILINA 0,6%

Pesar 0,6 g de vanilina P.A. em balança analítica e transferir para balão volumétrico de 100 mL. Completar o volume com água deionizada e homogeneizar.

5.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1.000 – 15.000 MG/L)

Preparar uma solução mãe (1 g/L) do lipídio a ser usado como referência em clorofórmio. Podem ser utilizados óleos vegetais comerciais (como óleo de soja, por exemplo).

ATENÇÃO: O Clorofórmio é TÓXICO e potencialmente cancerígeno! Manusear cuidadosamente, evitando a inalação e o contato com a pele. Trabalhar na capela, com a exaustão ligada! **Cuidado!**

Tarar a balança analítica com balão volumétrico de 500 mL e adicionar, com auxílio de conta-gotas, 500 mg do óleo escolhido como padrão (caso não seja possível pesar esse valor, anotar a massa exata e calcular a concentração real da solução, corrigindo os valores da Tabela 9).

Em seguida, na capela e com a exaustão ligada, completar o volume do balão com clorofórmio. Homogeneizar a mistura até obter a completa dissolução do óleo, com ausência de duas fases.

Preparar sete padrões cobrindo a faixa de trabalho do método. Para isso, ainda na capela, transferir para tubos de DQO, com auxílio de pipeta de vidro graduada, os volumes da solução mãe indicados pela Tabela 9. Preparar os padrões em triplicatas (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração para efetuar a medida).

Incubar os tubos destampados em estufa a 60°C (ou em banho de água nessa temperatura) sob exaustão adequada, até a total evaporação do solvente (~ 15 min). Na sequência, adicionar 100 µL de água deionizada em cada tubo e seguir o procedimento descrito para as amostras a partir do item 5.5 (b) em diante.

A solução padrão de lipídios em clorofórmio pode ser armazenada em frasco âmbar de boca fina e mantida refrigerada, em freezer, a -20°C. Essa solução é estável por alguns meses.

Tabela 9: Relação das concentrações padrões e alíquotas da solução mãe para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Lipídios/L)	Alíquota (µL) da solução mãe (1.000 mg/L) a ser pipetada em tubos de ensaio
0 (branco)	0
1.000	100
2.000	200
5.000	500
8.000	800
11.000	1.100
14.000	1.400
15.000	1.500

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução de vanilina 0,6% for preparada ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

5.5. DETERMINAÇÃO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE LIPÍDIOS (> 1.000 MG/L)

(a) Transferir 100 µL das amostras ou de água deionizada (branco) para tubos de DQO;

- (b) com auxílio de pipeta de vidro ou dispensador automático, adicionar cuidadosamente 2,0 mL de H₂SO₄ concentrado, fechar os tubos e agitar cuidadosamente em vórtex, em velocidade baixa;
- (c) aquecer os tubos com a tampa semi-rosqueada por 10 min em banho de água em ebulição;
- (d) resfriar rapidamente os tubos em banho de água gelada;
- (e) com micropipeta, usando o modo de pipetagem reversa (ver observação*), transferir 100 µL de cada amostra para outro tubo de DQO contendo 2,0 mL de H₃PO₄ concentrado (usar pipeta de vidro graduada para transferir previamente o ácido fosfórico);
- (f) adicionar 0,5 mL de solução 0,6% de vanilina, tampar e agitar em vórtex;
- (g) aquecer as amostras em banho de água a 37°C por 15 min;
- (h) resfriar durante 10 min à temperatura ambiente, transferir para cubeta de vidro com passo ótico de 1,0 cm e efetuar a leitura da absorbância no espectrofotômetro em 537 nm, zerando com o branco.

***Observação:** Devido à alta viscosidade do ácido concentrado, para transferir a alíquota da amostra em questão (diluída em H₂SO₄), esvaziar totalmente a ponteira (pressionando o êmbolo da pipeta até o segundo estágio) e aspirar devagar a solução. Transferir o volume fixado pressionando o êmbolo apenas até o primeiro estágio. Descartar o volume restante.

5.6. AMOSTRAS COM BAIXAS CONCENTRAÇÕES (< 1.000 MG/L)

Se a concentração de lipídios estiver abaixo da sensibilidade do método proposto, uma etapa de pré-concentração das amostras será necessário, conforme um dos três procedimentos descritos a seguir:

5.6.1. MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM ÉTER ETÍLICO

ATENÇÃO: Por se tratar de um composto altamente volátil, inflamável e explosivo, o éter etílico deve ser manuseado em capela, com a exaustão ligada, longe de fontes de calor e chamas de fogo.

- (a) Transferir para tubos de ensaio com tampa um volume conhecido (V_{INICIAL}) de, no mínimo, 10 mL de amostra. Para o teste em branco, utilizar volume de água deionizada idêntico ao da amostra e submeter aos mesmos procedimentos;
- (b) para cada 10 mL de amostra adicionar, aproximadamente, 2 g de NaCl, seguidos de 100 µL de H₂SO₄ concentrado;
- (c) fechar o tubo, homogeneizar e resfriar em freezer por 20 min;
- (d) em seguida, com pipeta de vidro, adicionar 2,0 mL de éter etílico mantido resfriado em freezer;
- (e) fechar hermeticamente e agitar por 2 min em vórtex;
- (f) congelar a amostra em freezer;
- (g) transferir totalmente a camada etérea (líquida, superior) para tubo de DQO;
- (h) evaporar à temperatura ambiente até a secura, em capela, sob exaustão;
- (i) adicionar 100 µL de água deionizada e submeter ao procedimento colorimétrico, a partir do item 5.5 (b) em diante;
- (j) ao final da análise, corrigir o resultado obtido dividindo-o pelo fator de concentração empregado (fator = V_{INICIAL} em mL / 0,1);

- (k) recomenda-se preparar alguns padrões da curva de calibração (conforme a Tabela 9), secar em estufa e completar com água deionizada até próximo de 10 mL. Submeter ao mesmo procedimento em conjunto com as amostras e verificar a recuperação de lipídios.

5.6.2. UTILIZANDO O RESÍDUO SÓLIDO DA AMOSTRA APÓS SECAGEM EM ESTUFA

- (a) Transferir um volume conhecido de amostra (V_{INICIAL}) de, no mínimo, 10 mL para tubo de ensaio destampado. Preparar um tubo com cerca de 10 mL de água deionizada (branco);
- (b) manter em estufa a 103-105°C até a secura completa (deixar de um dia para o outro, no mínimo);
- (c) adicionar 100 μL de água deionizada e submeter ao procedimento colorimétrico, a partir do item 5.5 (b) em diante;
- (d) ao final da análise, corrigir o resultado obtido dividindo-o pelo fator de concentração empregado (fator = V_{INICIAL} em mL / 0,1);
- (e) recomenda-se preparar alguns padrões da curva de calibração (conforme a Tabela 9) e submeter ao mesmo procedimento em conjunto com as amostras para verificar a recuperação de lipídios.

5.6.3. UTILIZANDO O RESÍDUO DA ANÁLISE DE ÓLEOS E GRAXAS OBTIDO POR SOXHLET

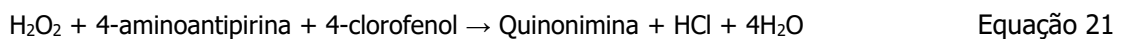
- (a) Extrair óleos e graxas das amostras em Soxhlet seguindo o procedimento descrito no *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Para o teste em branco, utilizar 100 mL de água deionizada e submeter ao mesmo procedimento;
- (b) lavar o resíduo da extração de óleos e graxas obtido por Soxhlet a partir das amostras com 3 porções de 2,0 mL de éter etílico;
- (c) misturar as três porções etéreas de cada amostra em um tubo de DQO e evaporar à temperatura ambiente até a secura, na capela, sob exaustão;
- (d) adicionar 100 μL de água deionizada e submeter ao procedimento colorimétrico, a partir do item 5.5 (b) em diante;
- (e) ao final da análise, corrigir o resultado obtido dividindo-o pelo fator de concentração empregado. Uma vez que o volume inicial da amostra a ser utilizada no ensaio de óleos e graxas é de 100 mL, o fator de concentração será: $100 \text{ mL} / 0,1 = 1.000$;
- (f) recomenda-se preparar alguns padrões da curva de calibração (conforme a Tabela 9), secar em estufa e completar com água deionizada até próximo de 100 mL. Submeter ao mesmo procedimento em conjunto com as amostras e verificar a recuperação de lipídios.

6. GLICEROL – MÉTODO ENZIMÁTICO (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(GREENHILL, 2003; VALDEZ et al., 2012)

6.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O glicerol (GOH) é um dos principais subprodutos da conversão de óleos vegetais em biodiesel em um processo conhecido como transesterificação. Este pode ser analisado por meio de um método enzimático baseado em Greenhill (2003), o qual é caracterizado como um procedimento foto-enzimático e não tóxico, uma vez que dispensa o uso do solvente piridina. De acordo com Valdez et al. (2012), tal método é preciso, podendo ser realizado em curto período de tempo. As reações enzimáticas envolvidas neste método são descritas a seguir:



O glicerol, na presença da adenosina trifosfato (ATP) e da enzima glicerol-quinase (GK), produz adenosina difosfato (ADP) e glicerol-3-fosfato (Equação 19) que, na presença de glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) e oxigênio, produz di-hidroxiacetona fosfato (DAP) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Equação 20). Tal peróxido, na presença de uma peroxidase (POD), de um acceptor de oxigênio (4-clorofenol) e da 4-aminoantipirina, formam água e a quinonimina (Equação 21), um composto colorido que pode ser determinado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 500 nm.

A solução enzimática comercial *Triglycerides FS Diasys* pode ser utilizada para a determinação de glicerol pela presente metodologia, adaptada para amostras aquosas (para análises de amostras mais complexas, por exemplo, derivadas da produção de biodiesel, verificar as etapas de pré-tratamento e extração do glicerol descritas na metodologia de Valdez et al. (2012)). O reagente enzimático apresenta a composição descrita na Tabela 10.

Tabela 10: Composição da solução enzimática comercial utilizada na análise de glicerol.

Componente	Concentração	Unidade
Tampão – pH 7,2	50	mmol/L
4-Clorofenol	4	mmol/L
ATP	2	mmol/L
Mg ²⁺	15	mmol/L
GK (Glicerol quinase)	≥ 4	kU/L
POD (Peroxidase)	≥ 2	kU/L
LPL (Lipase Lipoproteica)	≥ 2	kU/L
4-Aminoantipirina	0,5	mmol/L
GPO (Glicerol-3-fosfato oxidase)	0,5	kU/L

Fonte: Carneiro (2015).

6.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 µm de poro
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Espectrofotômetro
- Banho termostático (37°C)

- Cronômetro digital
- Micropipetas de 100, 1.000 e 5.000 μL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Balões volumétricos de 100 e 1.000 mL
- Béquer de 50 mL
- Solução enzimática *Triglycerides FS Diasys*
- Glicerina – $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ P.A.

6.3. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE GLICEROL (1.000 MG/L)

- (a) Em balança analítica, tarar um béquer de vidro de 50 mL e pesar 1,0 g de glicerina P.A. (o ideal é pesar exatamente esse valor para usar diretamente a Tabela 11; caso não seja possível, anotar a massa exata e calcular a concentração real da solução, corrigindo os valores da tabela);
- (b) transferir quantitativamente a massa de glicerina para balão volumétrico de 1.000 mL, repassando o béquer com várias porções de água deionizada e recolhendo no balão;
- (c) completar o balão volumétrico até próximo da marca, tampar e agitar vigorosamente para a completa dissolução do reagente;
- (d) aferir o volume do balão volumétrico com água deionizada e homogeneizar a solução;
- (e) estocar em frasco de vidro bem fechado, devidamente identificado.

6.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1,0 – 15,0 MG/L)

A partir da solução padrão de glicerol (1 g/L) preparar os padrões para o levantamento da curva de calibração, transferindo as alíquotas indicadas na Tabela 11 para balões volumétricos de 100 mL. Preparar os padrões em triplicatas (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração para efetuar a medida).

Tabela 11: Relação das alíquotas da solução mãe para a curva de calibração – faixa baixa.

Concentrações estimadas (mg GOH/L)	Alíquota da solução mãe (μL) para diluição em balão volumétrico de 100 mL
0,0*	0
1,0	100
2,5	250
5,0	500
7,5	750
10,0	1.000
12,5	1.250
15,0	1.500

*Zerar o espectrofotômetro com água deionizada sem adição da solução enzimática.

Fonte: Os autores.

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução enzimática for adquirida ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Transferir uma alíquota de 2,5 mL de cada solução padrão para tubos de DQO. Adicionar, em seguida, 1,0 mL da solução enzimática *Triglycerides FS Diasys* e homogeneizar.

Preparar um padrão consistindo de água deionizada (2,5 mL) e solução enzimática (1,0 mL) correspondendo à concentração de 0 mg GOH/L.

Após a adição da solução enzimática, as amostras devem permanecer em banho de água a 37°C, durante um tempo de reação de **10 min**.

Ao fim desse período, zerar o espectrofotômetro apenas com água deionizada (sem adição da enzima) e proceder à leitura dos padrões em comprimento de onda de 505 nm.

As médias das absorvâncias obtidas para cada padrão são, então, relacionadas às suas respectivas concentrações, possibilitando o traçado da curva de calibração (Absorvância MÉDIA X Concentração GLICEROL).

6.5. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICEROL

- (a) Filtrar um volume adequado de amostra em membrana de 0,45 µm para remover sólidos em suspensão e diluir em água deionizada, se necessário;
- (b) transferir 2,5 mL da amostra filtrada para tubo de DQO;
- (c) adicionar 1,0 mL da enzima *Triglycerides FS Diasys*;
- (d) para correção de cor e/ou turbidez da amostra, preparar um teste em branco consistindo de 2,5 mL da amostra em questão e 1,0 mL de água deionizada (omitir a adição da enzima);
- (e) tampar os tubos, agitar em vórtex e deixar em banho de água a 37°C durante 10 min;
- (f) após o período de reação, homogeneizar as amostras por inversão suave do tubo;
- (g) zerar o espectrofotômetro com o branco e efetuar a leitura da amostra tratada com adição da enzima em comprimento de onda de 505 nm.

7. ÁCIDO LÁTICO – MÉTODO DO P-FENILFENOL (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(TAYLOR, 1996)

7.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Os métodos de determinação colorimétrica de ácido láctico ($C_3H_6O_3$) baseiam-se em duas reações principais: 1) a conversão de ácido láctico em acetaldeído por ácido sulfúrico concentrado em meio quente, a qual foi reportada primeiramente por Denigès em 1909; e 2) a reação entre o acetaldeído formado e o p-fenilfenol (pPP), resultando em uma cor azul-violeta, a qual já havia sido observada por Eegriwe em 1933.

Quem primeiro recorreu a essas duas reações para determinação quantitativa de ácido láctico foram Miller e Muntz (1938). No entanto, no método proposto por Miller e Muntz (1938) o p-fenilfenol (ou 4-fenilfenol) é adicionado no estado sólido, o que torna o método demasiadamente trabalhoso. Barker & Summerson (1941), por sua vez, propuseram a utilização de uma solução aquosa de NaOH e pPP, incluindo a adição de sulfato de cobre aos reagentes, a fim de aumentar a intensidade da coloração obtida. Mas, devido à fácil precipitação do pPP, percebeu-se a necessidade de uma etapa de aquecimento adicional das amostras antes da leitura. Contornando esse inconveniente, Hadžija (1974) propôs o preparo de uma solução mais estável de pPP com etanol, o qual propicia uma melhor dissolução do reagente. Assim, a metodologia apresentada neste roteiro é a proposta por Taylor (1996), a qual se trata de uma modificação da metodologia anteriormente reportada por Hadžija (1974).

Para a realização da análise colorimétrica do ácido láctico em amostras complexas conforme o procedimento aqui apresentado, possíveis interferências relativas à presença de proteínas e carboidratos devem ser levadas em conta. Quando for necessário efetuar a remoção de altas concentrações de proteínas, pode-se empregar uma das estratégias já descritos no presente manual, na seção dedicada à análise de proteínas totais (itens 4.1.3 e 4.2.9). Ambos os procedimentos consistem na precipitação das proteínas por ácido tricloroacético e separação do material precipitado por centrifugação. Já para a remoção de outros contaminantes, especialmente carboidratos em excesso, o procedimento reportado por Barker e Summerson (1941) pode ser adotado, conforme detalhado no item 7.5.

7.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 µm de poro
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Banho termostático (30°C)
- Balão volumétrico de 500 mL
- Capela com exaustão
- Centrífuga de bancada
- Cronômetro digital
- Digestores de DQO (ajustados para 100°C)
- Espectrofotômetro
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 15 mL
- Dispensador automático ou pipeta de vidro graduada de 5,0 mL
- Micropipetas de 1.000 e 100 µL

- Pipeta de Pasteur
- Proveta de vidro graduada de 100 mL
- Espátula dosadora
- Ácido Lático – $C_3H_6O_3$ P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Sulfato de Cobre pentahidratado – $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ P.A.
- Etanol 96% – C_2H_5OH P.A.
- p-Fenilfenol (4-Fenilfenol) – $C_{12}H_{10}O$ P.A. (pPP)
- Hidróxido de Cálcio (cal hidratada) em pó – $Ca(OH)_2$ P.A.

7.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES REAGENTES

(a) Solução 1,5% de p-Fenilfenol: Dissolver 1,5 g de pPP em 100 mL de etanol 96%;

(b) Solução 4% de Sulfato de Cobre: Dissolver 4,0 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ em 100 mL de água deionizada. Agitar até a completa dissolução do reagente;

(c) Solução 20% de Sulfato de Cobre (para a remoção de interferentes, caso necessário): Dissolver 20,0 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ em 100 mL de água deionizada e manter em agitação magnética vigorosa até a dissolução completa do reagente.

7.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (2,5 – 30 MG/L)

Preparar, inicialmente, uma solução mãe com concentração de 2,0 g/L de ácido lático (pesar 1,0 g de ácido lático P.A. em balança analítica e dissolver em balão volumétrico de 500 mL com água deionizada).

ATENÇÃO: Caso seja utilizado o reagente líquido, considerar a porcentagem de pureza do ácido lático P.A. (85 – 90%), corrigindo a massa final a ser pesada.

Em seguida, transferir para balões volumétricos de 10 mL as alíquotas da solução mãe indicadas na Tabela 12 para a preparação dos padrões da curva de calibração. Aferir o volume com água deionizada, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Preparar sempre triplicatas para cada concentração padrão (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Tabela 12: Relação das concentrações padrões e alíquotas da solução mãe para a da curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Ácido Lático/L)	Alíquota da solução mãe (μ L) para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0 (branco)	0
2,5	50
5,0	100
10,0	200
15,0	300
20,0	400
25,0	500
30,0	600

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

7.5. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS COMPLEXAS (BARKER; SUMMERSON, 1941)

Quando as amostras apresentarem expressivo teor de proteínas, o mesmo deverá ser removido previamente, por meio da precipitação dessas substâncias conforme os procedimentos convencionais, baseados na adição de ácido tricloroacético seguida de centrifugação (itens 4.1.3 ou 4.2.9). O sobrenadante obtido é então submetido ao pré-tratamento descrito a seguir, com solução de sulfato de cobre e cal hidratada, para a remoção de carboidratos e outros interferentes.

Vale ressaltar que, para alguns tipos de amostras, apenas a aplicação do presente tratamento com cobre e cal pode ser suficiente para a remoção satisfatória das proteínas, dispensando a necessidade de um procedimento prévio, o que deverá ser verificado criteriosamente pelo analista.

Quando necessário, realizar a purificação das amostras seguindo os passos elencados a seguir:

- (a) Transferir 9 mL de amostra filtrada (ou um volume conhecido de amostra diluído para 9 mL com água deionizada) para tubo *falcon* de 15 mL;
- (b) adicionar 1 mL da solução de sulfato de cobre 20%;
- (c) com auxílio de uma espátula ou colher dosadora, adicionar cerca de 1,0 g de cal hidratada em pó, tampar e agitar vigorosamente;
- (d) manter a mistura em repouso à temperatura ambiente por 30 min, no mínimo, agitando algumas vezes ao longo desse intervalo de tempo;
- (e) na sequência, centrifugar por 10 min a 5.000 rpm;
- (f) com auxílio de micropipeta, mergulhar a ponteira na solução (abaixo da superfície do líquido) e coletar 0,5 mL do sobrenadante, tomando cuidado para não pipetar partículas em suspensão. Limpar a superfície da ponteira antes de transferir a amostra para o tubo de ensaio no qual será efetuada a análise colorimétrica;
- (g) para determinação de ácido láctico em amostras submetidas ao presente pré-tratamento, tratar os padrões empregando o mesmo procedimento aqui indicado antes de efetuar a análise e traçar uma curva de calibração específica para essas amostras.

Observação: Amostras excessivamente ácidas ou alcalinas devem ser convenientemente neutralizadas antes da aplicação do tratamento com cobre e cal. Caso não seja observada a formação de uma coloração azul brilhante (relativa ao hidróxido cúprico) quando a mistura for agitada, adicionar mais uma porção de cal hidratada.

7.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO

- (a) Filtrar previamente um volume adequado de amostra em membrana de 0,45 µm para remover os sólidos em suspensão e submeter aos pré-tratamentos indicados no item anterior (7.5), caso necessário;
- (b) adicionar 0,5 mL de amostra a tubo de DQO;
- (c) com auxílio de pipeta de vidro ou dispensador automático, adicionar 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido);
- (d) tampar adequadamente o tubo e agitar cuidadosamente por inversões sucessivas;
- (e) levar por 10 min ao digestor de DQO ajustado para a temperatura de 100°C;
- (f) resfriar em banho-maria a 30°C;

- (g) adicionar 50 μL da solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ seguidos de 100 μL da solução de pPP;
- (h) tampar e agitar cuidadosamente em vórtex;
- (i) aguardar, no mínimo, 30 min antes de efetuar a leitura da absorbância a 570 nm;
- (j) o branco é preparado com 0,5 mL de água deionizada no lugar da amostra. A absorbância do branco deverá ser da ordem de 0,2 a 0,5 quando comparada com água deionizada.

Observações:

- 1)** *A experiência prática do LPB recomenda o preparo de dois brancos, uma vez que pode ocorrer a precipitação eventual do pPP em um deles, interferindo no resultado da leitura. Nesse caso, zerar o espectrofotômetro com o branco de menor absorbância.*
- 2)** *Hadžija (1974) reportou que a partir de 5 min todo ácido láctico já havia sido convertido a acetaldeído. O aquecimento da amostra com ácido sulfúrico por um período superior a 10 min não apresentou efeito na quantidade de acetaldeído produzido. Todavia, deve-se evitar prolongar o aquecimento por mais de 30 min, uma vez que, decorrido esse tempo, caso a amostra contenha ácido murâmico, o mesmo também será quantificado.*
- 3)** *A cor formada é estável por várias horas. Taylor (1996) deixou as amostras de um dia para o outro e não observou modificação na leitura das absorbâncias.*
- 4)** *Uma vez que o pPP é bastante insolúvel em água, lavar as ponteiras e os recipientes utilizados com etanol e depois com água em abundância, repassando com água deionizada.*

IV. COMPOSTOS RECALCITRANTES²

- 8 Fenóis Totais – Método da 4-Aminoantipirina (Espectrofotométrico)
- 9 Taninos e Ligninas (Polifenóis Totais) – Método de Folin-Ciocalteu
- 10 Lignina – Método Gravimétrico (Lignina Klason)
- 11 Surfactantes Aniônicos – Método MBAS (Espectrofotométrico)



² As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

8. FENÓIS TOTAIS – MÉTODO DA 4-AMINOANTIPIRINA (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(BUCHANAN; NICELL, 1997)

8.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Fenóis, compostos definidos como hidróxidos derivados do benzeno, podem estar presentes em esgotos domésticos e efluentes industriais, inclusive em águas superficiais usadas para fins de potabilidade. Reagem com o cloro, formando clorofenóis, de odor e gosto desagradáveis. Altos teores de fenóis em corpos d'água podem indicar contaminação por efluentes ou descargas de processos industriais (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

O método analítico colorimétrico aqui apresentado se baseia na reação dos compostos fenólicos com a 4-aminoantipirina, em condições alcalinas e na presença de ferricianeto de potássio [$K_3Fe(CN)_6$], levando à formação de um complexo avermelhado (antipirina), capaz de ser lido em espectrofotômetro com comprimento de onda próximo dos 500 nm (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Tal procedimento analítico é capaz de ser aplicado à determinação de fenóis, bem como de suas formas orto- e meta-substituídos. Apenas sob condições adequadas de pH algumas formas para-substituídas reagirão com a 4-aminoantipirina. Fenóis para-substituídos em que o substituinte seja um grupo alquil, aril, nitro, benzonil, nitroso ou aldeído não são identificáveis (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Diante da grande diversidade de compostos fenólicos que podem estar presentes em uma mesma amostra (cresóis, xilenóis e catecóis, por exemplo), e sendo o fenol (hidroxibenzeno – C_6H_5OH) o mais simples de seu grupo, esse foi escolhido como o padrão a ser utilizado na calibração do método colorimétrico. Dessa forma, toda cor produzida pela reação de outros compostos fenólicos será reportada como fenol total.

Agentes oxidantes (principalmente o cloro) devem ser removidos imediatamente da amostra após sua coleta pela adição de sulfato ferroso ($FeSO_4$) ou sulfato ferroso amoniacal [$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$] em excesso. Caso contrário, os compostos fenólicos poderão sofrer oxidação parcial.

Óleos e graxas devem ser removidos com ajuste de pH em 12 – 12,5 com lentilhas de NaOH, seguido de extração em 50 mL de clorofórmio. A fase orgânica pode ser descartada e o excesso de clorofórmio deve ser removido por aquecimento em banho de água antes da análise.

No caso da presença de compostos reduzidos de enxofre, principalmente o sulfeto, exige-se a acidificação da amostra com ácido fosfórico (H_3PO_4) até pH < 4, aeração rápida por agitação e precipitação do sulfeto remanescente com dosagem de sulfato de cobre ($CuSO_4$) em excesso, previamente à destilação.

A etapa preliminar de destilação é usualmente recomendada para a separação dos compostos fenólicos de outros interferentes presentes na matriz da amostra (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1978; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). No entanto, além de demorado, tal procedimento demanda maior número de equipamentos e torna a análise de difícil execução.

Para contornar esses procedimentos laboriosos no tratamento de amostras contendo sulfeto, Gordon (1960) propôs um método mais simples, baseado na precipitação do H_2S em solução por meio da dosagem de nitrato de prata ($AgNO_3$), o qual precipita na forma de sulfeto de prata (Ag_2S). Os íons de prata (Ag^+) em excesso são removidos, por sua vez, com a adição de cloreto de sódio ($NaCl$), levando à precipitação do cloreto de prata ($AgCl$). Essa remoção de íons metálicos em excesso se faz necessária para evitar a precipitação do ferricianeto.

Uma vez resolvidos os problemas decorridos da presença de compostos reduzidos de enxofre, e desde que outros interferentes significativos estejam ausentes (cor, turbidez, agentes oxidantes, óleos, etc.), a etapa

de pré-tratamento por destilação pode ser omitida, minimizando-se as perdas de fenóis por volatilização ao longo do processo.

Observação: *O método aqui apresentado é válido para concentrações de fenol acima de 0,5 mg/L. Para amostras contendo baixas concentrações, uma etapa de extração com clorofórmio e pré-concentração do corante antipirina deverá ser empregada, tanto no preparo dos padrões da curva analítica quanto no tratamento das amostras. Essa metodologia está disponível no Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) bem como descrito no procedimento apresentado pela USEPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1978).*

8.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 µm de poro
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Balança semi-analítica (precisão ± 0,01 g)
- Capela com exaustão
- Centrífuga de bancada
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Béquer de vidro de 100 mL
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 50 mL
- Balões volumétricos de 50, 100, 1.000 e 2.000 µL
- Micropipetas de 200, 1.000 e 5.000 µL
- Proveta graduada
- Funil de vidro
- Fenol (Hidroxibenzeno) – C₆H₅OH P.A.
- Ferricianeto de Potássio – K₃Fe(CN)₆ P.A.
- 4-Aminoantipirina (*4-Amino-2,3-dimethyl-1-phenyl-3-pyrazolin-5-one*) P.A.
- Bicarbonato de sódio – NaHCO₃ P.A.
- Nitrato de Prata – AgNO₃ P.A. (pré-tratamento para a remoção de sulfetos – item 8.10)
- Cloreto de Sódio – NaCl P.A. (pré-tratamento para a remoção de sulfetos – item 8.10)

8.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE 4-AMINOANTIPIRINA (20,8 MM EM NAHCO₃ 0,25 M)

- (a) Em balança semi-analítica, pesar 42 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃);
- (b) transferir, com água deionizada, a massa de bicarbonato de sódio, por lavagens sequenciais, para balão volumétrico de 2.000 mL, completando o volume;
- (c) manter em agitação magnética para homogeneizar a solução;
- (d) pesar, em balança analítica, 4,2274 g do reagente 4-Aminoantipirina;
- (e) usando 1.000 mL da solução de bicarbonato de sódio 0,25 M, transferir quantitativamente a 4-Aminoantipirina para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume;

- (f) homogeneizar a solução e guardar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado: Não armazenar por período de tempo indeterminado, mas preparar volumes menores para uso imediato;
- (g) reservar o restante da solução de bicarbonato para o preparo da solução de ferricianeto.

8.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE FERRICIANETO DE POTÁSSIO (83,4 MM EM NAHCO₃ 0,25 M)

ATENÇÃO: O Ferricianeto de Potássio, embora relativamente inofensivo, pode emitir gás cianeto (extremamente tóxico) se aquecido ou em contato com ácidos e vapores ácidos. Manter longe de fontes de calor. **Cuidado!**

- (a) Em balança analítica, pesar 27,4586 g de ferricianeto de potássio [K₃Fe(CN)₆];
- (b) usando os 1.000 mL restantes da solução de bicarbonato de sódio 0,25 M anteriormente preparada, transferir quantitativamente, para balão volumétrico de 1.000 mL, a massa de ferricianeto de potássio pesado;
- (c) homogeneizar a solução e guardar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado;

8.5. PREPARO DA SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA (1 M)

ATENÇÃO: O Nitrato de Prata deve ser manuseado sempre com luvas e jaleco. Pode provocar queimaduras na pele. Em baixas concentrações provoca manchas escuras persistentes por alguns dias. Por ser inflamável e explosivo, manter longe de fontes de calor, e de outros reagentes, tais como etanol, hidróxido de sódio, água oxigenada, ácidos, etc. **Cuidado!**

- (a) Em balança analítica, pesar 16,9783 g de nitrato de prata (AgNO₃);
- (b) com água deionizada, transferir a massa de nitrato de prata para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume;
- (c) homogeneizar a solução, transferir para frasco com tampa e guardar devidamente identificada.

8.6. PREPARO DE ÁGUA DE DILUIÇÃO DESOXIGENADA

Para o preparo das soluções padrões (quando indicado), coletar previamente um volume razoável de água deionizada, ferver por cerca de 5 min e manter sob fluxo de nitrogênio ou argônio durante o resfriamento (cerca de 15 min).

8.7. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE FENOL (10 G/L)

Para o preparo da solução estoque de fenol (10 g/L) utilizar como reagente padrão o Hidroxibenzeno (Fenol ou Ácido Fênico) P.A. (C₆H₅OH – PM = 94,11 g/mol).

ATENÇÃO: Trabalhar em capela sob exaustão. Usar luvas nitrílicas, óculos de segurança e máscara contra compostos orgânicos voláteis! O fenol é extremamente TÓXICO!

- (a) Tarar a balança analítica com um frasco de vidro tampado, o qual será utilizado na pesagem da massa de fenol (colocar um aviso de reservado na balança para que outro usuário não altere a tara);
- (b) na capela, com a exaustão ligada, ir adicionando fenol ao frasco; transferir um pouco por vez, tampar o frasco e levá-lo para ser pesado na balança anteriormente tarada;
- (c) repetir o procedimento até a obtenção de 10 gramas de fenol (o ideal é pesar exatamente esse valor para usar diretamente a Tabela 13; caso não seja possível, anotar a massa exata e calcular a concentração real da solução, corrigindo os valores da tabela);
- (d) ainda na capela e sob exaustão, transferir, com a água deionizada e desoxigenada, a massa de fenol pesada para balão volumétrico de 1.000 mL, por meio de lavagens sequenciais (usar funil de vidro);
- (e) completar o volume do balão com a água desoxigenada e homogeneizar a solução;
- (f) guardar a solução estoque em recipiente âmbar bem fechado e devidamente identificado. O frasco deve ser mantido refrigerado e ao abrigo da luz.

Observação: Caso seja necessária uma maior precisão do método, padronizar a solução estoque de fenol com solução de bromato-brometo, conforme descrito no *Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)*.

8.8. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,5 – 12,5 MG/L)

Preparar uma solução intermediária (100 mg/L) diluindo 10 mL da solução estoque em balão volumétrico de 1.000 mL com água deionizada e desoxigenada.

Para a construção da curva de calibração, transferir as alíquotas indicadas na Tabela 13 da solução intermediária para balões volumétricos de 50 mL, completando o volume com água desoxigenada. Preparar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração). Usar os padrões dentro de 2 h.

Tabela 13: Relação das concentrações padrões e alíquotas da solução intermediária para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Fenol/L)	Alíquota da solução intermediária (µL) para diluição em balão volumétrico de 50 mL
0 (branco)	0
0,5	250
2,5	1.250
5,0	2.500
7,5	3.750
10,0	5.000
12,5	6.250

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

8.9. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS

- (a) Pipetar 2,0 mL da amostra filtrada em 0,45 μm (e já pré-tratada conforme o item 8.10, quando necessário) ou dos padrões da curva de calibração e transferir para tubo de DQO;
- (b) adicionar 2,0 mL de água deionizada (não considerar esse volume no fator de diluição);
- (c) adicionar 200 μL da solução de Ferricianeto de Potássio;
- (d) adicionar 200 μL da solução da 4-aminoantipirina;
- (e) tampar o tubo, misturá-lo por inversão e acionar o cronômetro;
- (f) após 7 min, zerar o espectrofotômetro com o branco (água deionizada no lugar da amostra) e efetuar a leitura das amostras (ou padrões) em comprimento de onda de 500 nm.

Observação: *Uma vez que a concentração de fenol obtida é baseada no padrão hidroxibenzeno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), o presente método fornece uma aproximação, representando uma concentração mínima de fenol presente na amostra. Isto se deve ao fato da reatividade do fenol com a 4-aminoantipirina variar dependendo dos compostos fenólicos em questão.*

8.10. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS CONTENDO SULFETOS (ADAPTADO DE GORDON (1960))

- (a) Transferir 20 mL de amostra com pH próximo de 7,0 para balão volumétrico de 25 mL;
- (b) dosar 0,5 mL da solução de nitrato de prata 1 M e observar se ocorre a formação de uma suspensão branca (cloreto de prata coloidal);
- (c) havendo sulfeto na amostra, antes da suspensão branca, uma coloração marrom deverá aparecer, com a deposição de um precipitado escuro, relativo ao sulfeto de prata precipitado (Ag_2S);
- (d) continuar dosando, gota a gota, a solução de nitrato de prata, até que comece a aparecer uma suspensão branca ou comece a se formar um precipitado branco/acinzentado, indicando a formação do cloreto de prata (AgCl);
- (e) adicionar, em seguida, cerca de 0,5 g de NaCl ($\frac{1}{2}$ espátula dosadora) para precipitar os íons Ag^+ em excesso;
- (f) diluir a amostra para 25 mL (completando o volume do balão com água deionizada) e homogeneizar;
- (g) transferir a amostra para tubo *falcon* e centrifugar a 3.500 – 5.000 por, no mínimo, 5 min;
- (h) filtrar o sobrenadante em membrana de 0,45 μm para ser analisado;
- (i) levar em consideração o fator de diluição empregado (1,25 x) para corrigir o resultado final da determinação de fenol total (além das diluições adicionais, caso tenham sido necessárias);
- (j) descartar adequadamente o precipitado.

Observação: *Volumes menores ou maiores de amostra podem ser submetidos ao pré-tratamento, desde que seja observada a mesma proporção na dosagem dos outros reagentes.*

9. TANINOS E LIGNINAS (POLIFENÓIS TOTAIS) – MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

(FOLIN; CIOCALTEU, 1927; SINGLETON; ROSSI, 1965)

9.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Taninos e ligninas estão entre os constituintes das plantas mais comumente encontrados em despejos de águas residuárias da indústria do papel, bem como em corpos d'água nos quais se originam pela degradação de matéria vegetal. Pertencem ao grupo dos polifenóis, substâncias caracterizadas por possuírem um ou mais grupos fenólicos por molécula. Podem apresentar mais de uma hidroxila ligada ao anel aromático, ou ainda mais de um anel aromático (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

O método aqui apresentado permite a determinação da concentração de polifenóis totais através da utilização do reagente de Folin-Ciocalteu (Ácido Tungstofosfórico e Molibdofosfórico), o qual reage com compostos contendo grupos hidroxilo-aromáticos, levando à redução do molibdênio e do tungstênio em meio alcalino com a formação de uma coloração azul que apresenta absorvância em comprimento de onda próximo dos 700 nm (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Devido à natureza química dos compostos fenólicos, estes podem ser simples ou altamente polimerizados, tais como taninos, ligninas, antocianinas e ácidos fenólicos, com possíveis interações fenol-carboidratos-proteínas. A interação dos polifenóis com outros compostos pode resultar ainda na formação de complexos insolúveis, o que exige uma etapa de extração dos polifenóis em um solvente orgânico polar previamente à realização da análise colorimétrica.

A utilização de metanol acidificado com HCl permite a extração de taninos, ligninas e polifenóis totais simultaneamente, sendo uma alternativa mais eficiente quando comparada ao uso exclusivo de metanol ou acetona, principalmente para altas concentrações de polifenóis totais (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Apesar de ser um dos métodos mais amplamente empregados para a quantificação de compostos fenólicos, o método de Folin-Ciocalteu não é específico para fenóis. Outros agentes redutores também poderão promover a redução do reagente de Folin, levando à geração de um falso resultado positivo. Entre as principais substâncias orgânicas potencialmente causadoras de interferências estão: Proteínas, substâncias húmicas, bases de ácidos nucleicos, frutose, aminas e ácido ascórbico. Já entre as substâncias inorgânicas que interferem na análise por seu caráter redutor têm-se: Ferro (II), manganês (II), nitrito, cianeto, sulfeto, sulfeto, hidrazina e cloridrato de hidroxilamina, entre outras.

Os resultados obtidos através da presente análise devem ser reportados em termos de substâncias redutoras do reagente de Folin em mg equivalentes de Ácido Gálico/L, uma vez que este reagente é utilizado como padrão para a construção da curva de calibração.

9.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 1,2 µm de poro
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Banho termostático (45°C)
- Chapa aquecedora
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Tubos de DQO (padrão HACH®)

- Balões volumétricos de 100 e 1.000 mL
- Béquer de vidro de 1.000 mL
- Pipeta de vidro graduada de 10,0 mL
- Micropipetas de 1.000 e 5.000 μ L
- Erlenmeyer de 1.000 mL
- Reagente comercial de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sódio – Na_2CO_3 P.A.
- Metanol – CH_3OH P.A.
- Ácido Gálico – $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ P.A.
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A.

9.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE METANOL ACIDIFICADO (HCl 1% v/v)

ATENÇÃO: Os vapores emanados pelo metanol são inflamáveis e tóxicos. A chama resultante da queima do metanol é invisível. Manter o reagente longe de fontes de calor! Trabalhar em capela, com exaustão ligada, evitando inalação e contato com a pele e os olhos! Utilizar jalecos, luvas nitrílicas e óculos de segurança! **Cuidado!**

Na capela, sob exaustão, e com auxílio de pipeta de vidro, transferir **cuidadosamente** 10 mL de ácido clorídrico concentrado para frasco de vidro contendo 1.000 mL de metanol (utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido).

9.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE CARBONATO DE SÓDIO 7,5% (M/V)

- (a) Dissolver 75 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em cerca de 750 mL de água deionizada;
- (b) transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) após a completa dissolução do reagente, transferir para erlenmeyer de 1.000 mL e aquecer em chapa até 70–80°C, deixando descansar, em seguida, por 12 h;
- (d) após o período de descanso, filtrar a solução em membrana de 1,2 μm e completar novamente em balão volumétrico de 1.000 mL com água deionizada;
- (e) homogeneizar e transferir para frasco de plástico devidamente identificado.

9.5. PREPARO DE ÁGUA DE DILUIÇÃO DESOXIGENADA

Para o preparo das soluções (quando indicado), coletar previamente um volume razoável de água deionizada (cerca de 3,5 litros), ferver por cerca de 5 min e manter sob fluxo de Nitrogênio ou Argônio durante o resfriamento por aproximadamente 15 min.

9.6. PREPARO DA SOLUÇÃO DE FOLIN-CIOCALTEU 10% (V/V)

- (a) Diluir 10 vezes o reagente comercial de Folin-Ciocalteu transferindo 10 mL para balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água deionizada e desoxigenada;
- (b) homogeneizar e transferir para um frasco de vidro âmbar devidamente identificado;
- (c) armazenar em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por até 1 mês.

Observação: Ao invés da utilização do reagente comercial de Folin-Ciocalteu (recomendada pela praticidade e maior confiabilidade do reagente) o mesmo poderá ser preparado pelo analista, caso necessário, conforme o procedimento apresentado pelo Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) na seção referente à determinação de Taninos e Ligninas.

9.7. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (5 – 50 MG EQ. ÁCIDO GÁLICO/L)

Preparar uma solução mãe contendo 1.000 mg/L de ácido gálico dissolvendo 1.000 mg de ácido gálico (C₇H₆O₅) P.A. em 750 mL de água deionizada e desoxigenada.

Transferir, em seguida, para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume também com água deionizada e desoxigenada.

Para a construção da curva de calibração, transferir as alíquotas indicadas na Tabela 14 da solução mãe para balões volumétricos de 100 mL, completando o volume com água desoxigenada. Preparar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Tabela 14: Relação das concentrações e alíquotas da solução mãe para a construção da curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Ácido Gálico/L)	Alíquota da solução intermediária (µL) para diluição em balão volumétrico de 100 mL
0 (Branco)	0
5,0	500
10,0	1.000
20,0	2.000
30,0	3.000
40,0	4.000
50,0	5.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou adquiridas, e sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

9.8. DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS

- (a) Pipetar 0,5 mL da amostra ou dos padrões da curva de calibração e transferir para tubo de DQO;
- (b) adicionar 4,5 mL de metanol acidificado, tampar e homogeneizar em vórtex;
- (c) retirar 0,5 mL da mistura e transferir para outro tubo de DQO;
- (d) adicionar 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu 10% seguidos de 2,0 mL da solução de carbonato de sódio 7,5%;
- (e) tampar o tubo, misturá-lo por inversão e mantê-lo em banho termostático a 45°C durante 15 min;
- (f) esfriar à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por cerca de 15 min;
- (g) zerar o espectrofotômetro com o branco (água deionizada no lugar da amostra) e efetuar a leitura da absorbância das amostras (ou padrões) em comprimento de onda de 765 nm.

10. LIGNINA – MÉTODO GRAVIMÉTRICO (LIGNINA KLASON)

(SLUITER et al., 2012)

10.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Ligninas são complexos poliméricos aromáticos (polifenóis) presentes na parede celular de plantas superiores, sendo encontrada em combinação com carboidratos estruturais (celulose, hemicelulose e pectina), proporcionando rigidez às fibras vegetais (COSTA et al., 2013). A lignina também atua como uma barreira física, oferecendo impermeabilidade e proteção ao tecido vegetal contra ataques enzimáticos, o que afeta diretamente a biodegradabilidade de materiais lignocelulósicos (COSTA et al., 2013).

De natureza amorfa, composição química e tamanho molecular indefinidos, os métodos usualmente empregados para estimar o teor de lignina em materiais sólidos de origem vegetal consistem, principalmente, de técnicas gravimétricas (Lignina Klason, Lignina Detergente Ácido e Lignina Permanganato de Potássio) e do método espectrofotométrico do brometo de acetila. Os métodos citados geralmente apresentam resultados conflitantes entre si, de forma que cada metodologia pode ser mais indicada para um tipo específico de material vegetal (VELÁSQUEZ, 2013; BACHA, 2006).

O método da Lignina Detergente Ácido (LDA), proposto por Van Soest (1963), consiste na utilização de uma solução de detergente ácido para obter uma amostra do material lignocelulósico livre de proteínas, um dos principais contaminantes do método Klason. Na sequência, a amostra isenta de proteínas é submetida à hidrólise ácida em solução de ácido sulfúrico a 72%, para remoção dos constituintes da parede celular, com exceção da lignina, a qual é determinada gravimetricamente. Uma das desvantagens desse método se deve à solubilização de lignina na solução de detergente ácido, com subestimação do teor real de lignina do material, o que é mais expressivamente notado no tratamento de gramíneas (VELÁSQUEZ, 2013; BACHA, 2006).

O método da Lignina Klason (THEANDER; WESTERLUND, 1986), por sua vez, foi desenvolvido primeiramente para a estimativa do teor de lignina em madeira. O método consiste na hidrólise ácida do material de interesse em solução de ácido sulfúrico a 72% para solubilização dos componentes da parede celular, restando ao fim um material insolúvel, o qual é seco e calcinado para determinação da lignina (Lignina insolúvel em ácido). A aplicação dessa metodologia em amostras de leguminosas e plantas forrageiras, por sua vez, é desencorajada pelo fato do alto teor de proteínas interferirem no resultado final da análise, com superestimação do teor de lignina (VELÁSQUEZ, 2013; BACHA, 2006). Para a análise de materiais contendo proteínas, portanto, recomenda-se a determinação do conteúdo proteico da amostra para correção do resultado final da análise.

No método da Lignina Permanganato de Potássio (VAN SOEST; WINE, 1968) a oxidação da lignina é efetuada por meio da aplicação de uma solução concentrada de permanganato de potássio. Geralmente, os resultados desse método são significativamente mais elevados que os obtidos pelo método LDA, por exemplo, uma vez que o permanganato pode atacar também outros componentes da parede celular, sendo esta técnica mais utilizada no âmbito da indústria do papel e celulose (BACHA, 2006).

Por fim, o método espectrofotométrico da Lignina Brometo Acetila (MORRISON, 1972a; 1972b) consiste da solubilização da lignina em uma solução 25% de brometo de acetila e 75% de ácido acético glacial, seguido da leitura da densidade óptica da amostra em 280 nm. A ausência de um padrão analítico de referência para a lignina, por sua vez, é reportado como um dos pontos fracos do método em questão, ainda que algumas estratégias para contornar esse inconveniente já tenham sido apresentadas com sucesso (FUKUSHIMA; HATFIELD, 2001; 2004).

Neste manual optou-se por descrever o método da Lignina Klason conforme a metodologia descrita por Sluiter (2012), o qual é usualmente utilizado no LPB para a estimativa da lignina presente no bagaço da cana-de-açúcar e outros substratos de origem vegetal. Nesse método, além da lignina Klason (insolúvel em ácido), uma etapa de leitura espectrofotométrica do hidrolisado ácido remanescente pode ser acrescentada para estimativa da fração de lignina solúvel. Ademais, amostras desse hidrolisado também podem ser utilizadas para determinação cromatográfica dos carboidratos estruturais, removidos e hidrolisados pela solução de ácido sulfúrico a 72%.

10.2. INTERFERENTES

Amostras com um teor de umidade acima de 10% podem não ser adequadas para o presente procedimento, já que o excesso de umidade pode interferir na concentração final de ácido aplicada. As amostras devem ser secas (à temperatura ambiente ou em estufa a menos de 40°C) antes de serem analisadas. Amostras secas em temperaturas superiores (45°C ou mais) não são adequadas para análise de lignina pelo presente método.

Amostras contendo proteínas acarretarão em erros na determinação de lignina insolúvel, a menos que o teor de proteínas da amostra seja contabilizado e posteriormente descontado da determinação gravimétrica do resíduo insolúvel em ácido. Para isso, uma análise independente de nitrogênio ("Proteína bruta") se faz necessária, por exemplo, conforme o item 4.3. Nesse caso, o teor de proteína estimada na amostra seca deve ser descontado do teor de lignina insolúvel em ácido.

Amostras contendo extrativos não são adequadas. Os extrativos podem ser particionados de maneira irreprodutível, resultando em um alto erro na análise de lignina.

10.3. MATERIAL

- Aparato de filtração a vácuo (Bomba a vácuo, kitassato, alongas de borracha) adaptado para os cadinhos filtrantes
- Agitador magnético e barra magnética
- Autoclave
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Banho termostático 30°C
- Cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18
- Espectrofotômetro (UV-Vís)
- Estufa a 103-105°C
- Forno tipo mufla a 550°C
- Micropipetas de 1,0 e 5,0 mL
- Pipeta de vidro graduada de 5 mL ou dispensador automático
- Balão volumétrico de 1.000 mL
- Bastões de vidro
- Béquer de vidro de 2.000 mL
- Cadinhos filtrantes de porcelana refratária com fundo poroso (ou cadinhos de vidro tipo Pyrex® com placa porosa), apropriados para filtração e calcinação (Cadinhos de Gooch)
- Cubetas de quartzo com passo óptico de 1,0 cm (para leitura na região do UV)
- Dessecador com sílica anidra

- Filtros de seringa de 0,2 μm
- Luvas para forno
- Membranas de microfibras de vidro com poros de 1,0 a 1,2 μm
- Proveta de vidro graduada de 100 mL
- Tubos tipo *falcon* de 15 mL
- Tubos de pressão de 100 mL com tampas de teflon (ou frascos de antibiótico)
- Pinças metálicas (tenazes) para os cadinhos de porcelana (com comprimento de 20 cm para uso na estufa e de 50 cm para uso na mufla)
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Carbonato de Cálcio – CaCO_3 P.A.

10.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 72% (M/M)

ATENÇÃO: A dissolução de H_2SO_4 em água é extremamente exotérmica; por isso é necessário ter muito cuidado com o aquecimento do recipiente. Adicionar lentamente o ácido à água, e nunca o oposto, sempre trabalhando em capela, com a exaustão ligada. Manusear o frasco de ácido concentrado usando jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança.

Na capela, com a exaustão ligada, preparar um béquer de vidro de 2.000 mL contendo cerca de 300 mL de água deionizada e colocar em agitação magnética moderada. Em seguida, com auxílio de proveta de vidro graduada, adicionar **devagar e cuidadosamente** a quantidade requerida de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando em seguida o volume com água deionizada.

A quantidade de ácido sulfúrico necessária para o preparo de 1.000 mL da solução a 72% (m/m), com densidade de 1,634 g/cm^3 , deverá ser calculada levando-se em conta a pureza (em %) e a densidade (em g/cm^3) do reagente utilizado, conforme equação a seguir:

$$\text{Volume de H}_2\text{SO}_4 \text{ requerido (ml)} = \frac{1000 \times 1,634 \times 72}{[\text{Densidade (g/cm}^3\text{)} \times \text{Pureza (\%)}]} \quad \text{Equação 22}$$

Armazenar a solução em frasco de vidro fechado e devidamente identificado. Manter em geladeira (refrigerado entre 10 a 15°C) previamente à utilização.

10.5. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras que serão submetidas à análise gravimétrica de lignina Klason deverão ser previamente picotadas ou trituradas em pequenos pedaços e espalhadas em camadas finas para secagem à temperatura ambiente (ou a 40°C, no máximo), visando à perda da maior parcela de umidade possível. O material deverá ser revolvido ao menos uma vez por dia para garantir uma secagem uniforme e inibir o crescimento microbiano. O ideal é acompanhar o peso do material e considerar o final da secagem quando a variação de massa for menor que 1% após 24 h de secagem à temperatura ambiente.

Em seguida, as amostras deverão ser moídas e peneiradas, utilizando-se, respectivamente, um moinho ou liquidificador de bancada seguido de uma peneira com, no máximo, 2,5 mm de abertura de malha. Cuidado com o aquecimento excessivo do material durante a moagem!

Se a amostra preparada não for analisada imediatamente após o peneiramento, acondicioná-la em recipiente hermeticamente fechado ou em saco de polietileno selado, e armazenar em freezer a -20°C.

10.6. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA KLASON

ATENÇÃO: *Abrir e manusear a mufla apenas quando ela já tiver atingido temperatura próxima dos 300°C, usando luvas apropriadas para evitar queimaduras. **Cuidado!***

- (a) Inicialmente, colocar uma membrana de fibra de vidro (1,0 a 1,2 μm) em cada cadinho filtrante e calcinar em mufla a 550°C por 3 h. Aguardar a mufla atingir a temperatura de segurança antes da abertura (300°C) e transferir os cadinhos, com auxílio de tenaz, para estufa a 103-105°C, na qual deverão permanecer por tempo suficiente para a estabilização da temperatura (por cerca de 30 min);
- (b) resfriar os cadinhos calcinados em dessecador até a temperatura ambiente (por cerca de 30 min), verificando sempre o estado da sílica (azul quando anidra, e marrom ou rosada quando úmida, necessitando ser trocada). Em seguida, determinar a massa do conjunto (cadinho filtrante + membrana) em balança analítica, anotando o peso (P0, em mg) (utilizar pinça ou tenaz, evitando manipular o cadinho com as mãos);
- (c) pesar cerca de 300 mg de amostra previamente seca (à temperatura ambiente ou a 40°C, no máximo) em tubo de pressão (ou em frasco de antibiótico), anotando a massa exata do material (P1, em mg);
- (d) na sequência, usando pipeta de vidro ou dispensador automático, adicionar 3 mL de ácido sulfúrico 72% previamente resfriado (entre 10 e 15°C) em cada tubo e mexer vigorosamente com bastão de vidro por alguns minutos até que todo material sólido seja embebido pelo ácido;
- (e) manter os tubos em banho termostático a 30°C durante 1 h, mexendo com bastão de vidro frequentemente (a cada 10 ou 15 min) sem tirar os tubos do banho (utilizar um bastão de vidro para cada tubo em separado);
- (f) após esse período de incubação, remover os tubos do banho e diluir a solução de ácido até uma concentração final de 4%. Isso é realizado adicionando-se 84 mL de água deionizada em cada tubo (adicionar o volume de água com precisão!);
- (g) tampar os tubos de pressão ou vedar os frascos de antibiótico com papel alumínio;
- (h) homogeneizar as amostras e autoclavar a 120°C por 1 h (ver as orientações do item 22.1);
- (i) retirar os tubos da autoclave e aguardar resfriar até a temperatura ambiente antes de remover as tampas;
- (j) filtrar a vácuo as soluções obtidas nos cadinhos filtrantes previamente calcinados e pesados contendo as membranas de fibra de vidro;
- (k) coletar o líquido filtrado e reservar para posterior determinação de lignina solúvel e, caso necessário, para determinação dos carboidratos estruturais (não utilizar água para lavar o material nesse passo, para não diluir indevidamente a amostra);
- (l) na sequência, prosseguir com a filtração repassando o tubo de pressão com água deionizada e recolhendo no cadinho filtrante (repetir até garantir que todos os sólidos tenham sido retidos na membrana do cadinho);

- (m) levar os cadinhos filtrantes para estufa a 103-105°C e incubar durante cerca de 24 h;
- (n) transcorrido o tempo necessário, transferir os cadinhos para dessecador e aguardar a estabilização da temperatura (cerca de 20 min);
- (o) pesar os cadinhos contendo o material seco em balança analítica e anotar o valor (P2, em mg);
- (p) para determinação da massa de cinzas insolúveis no resíduo, colocar os cadinhos filtrantes na mufla a 550°C por, no mínimo, 3 h;
- (q) aguardar a temperatura de segurança antes da abertura da mufla (300°C) e transferir os cadinhos com auxílio de tenaz para estufa a 103-105°C até a estabilização da temperatura (cerca de 30 min), resfriando em dessecador até a temperatura ambiente (por cerca de 30 min);
- (r) finalmente, determinar a massa do cadinho filtrante com material calcinado em balança analítica, anotando o peso (P3, em mg);
- (s) calcular o teor de lignina insolúvel em ácido (Lignina Klason) conforme a equação a seguir:

$$\text{Lignina Klason (\%)} = \frac{[(P2 - P0) - (P3 - P0)]}{P \text{ seco em estufa}} \times 100 \quad \text{Equação 23}$$

Na qual:

P0 = Peso do cadinho calcinado (mg);

P2 = Peso do cadinho contendo a fração insolúvel da amostra seca em estufa (mg);

P3 = Peso do cadinho contendo as cinzas insolúveis da amostra (mg). Usualmente, a massa de cinzas insolúveis é baixa, da ordem de 10 mg ou menos;

P seco em estufa = Peso da amostra (P1, em mg) corrigido pelo teor de sólidos (descontando a umidade residual), conforme a Equação 24 (ver observação a seguir).

Observação: Paralelamente à determinação de lignina deve ser realizada também a determinação do teor de sólidos totais da amostra em questão, de forma a corrigir o resultado final da análise, estimando a porcentagem de lignina Klason em referência à massa seca do material. Dessa forma, calcinar previamente uma cápsula de porcelana em mufla a 550°C por 20 min, resfriar em estufa seguida de dessecador, aferindo o peso da cápsula em balança analítica. Na sequência, pesar na cápsula uma massa (em mg) da mesma amostra (nas mesmas condições de umidade que a amostra utilizada na análise de lignina) e anotar o valor. Secar o material em estufa a 103-105°C por 24 h e aferir a massa seca dessa amostra (Peso do conjunto – Peso da cápsula). Por fim, calcular o teor de sólidos totais da amostra (teor ST = Peso da amostra após secagem na estufa/ Peso original da amostra) e corrigir a massa de amostra utilizada no teste de lignina Klason (P1 medida no item 10.6 (c)) conforme a equação a seguir:

$$P \text{ seco em estufa (mg)} = P1 \text{ (mg)} \times \text{teor ST (em formato decimal)} \quad \text{Equação 24}$$

No qual:

teor ST = Teor de sólidos totais em formato decimal. Usualmente, o teor de ST costuma variar de 0,90 a 1,00.

10.7. DETERMINAÇÃO DE LIGNINA SOLÚVEL EM ÁCIDO

- (a) Transferir 1 mL do líquido filtrado (item 10.6 (k)) para cubeta de quartzo com passo ótico de 1,0 cm;
- (b) efetuar a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 240 nm (adequado para o extrato originado do bagaço da cana-de-açúcar), zerando com água deionizada;
- (c) caso a absorvância ultrapasse o valor de 1,0, efetuar a diluição da amostra com água deionizada, diluindo igualmente o branco, e repetir a leitura. Valores de absorvância entre 0,7 e 1,0 são recomendados;
- (d) efetuar a análise de cada amostra, no mínimo, em duplicatas;
- (e) calcular o teor de lignina solúvel conforme a equação a seguir e corrigir o resultado final da análise aplicando o fator de diluição utilizado.

$$\text{Lignina solúvel em ácido (\%)} = \frac{[\text{ABS}_{240\text{nm}} \times \text{Vol (ml)} \times f \times 100]}{[\text{Absortividade} \times \text{P seco em estufa (mg)} \times \text{Passo ótico (cm)}]} \quad \text{Equação 25}$$

Na qual:

$\text{ABS}_{240\text{ nm}}$ = Absorvância obtida no comprimento de onda (240 nm) especificado;

Vol = Volume de amostra filtrada (mL);

f = Fator de diluição empregado;

Absortividade = Coeficiente de extinção da lignina no comprimento de onda empregado (25 L/g.cm a 240 nm);

Peso seco em estufa = Peso da amostra corrigido pelo teor de sólidos (descontando a umidade residual), conforme a Equação 24, anteriormente apresentada (mg);

Passo ótico = Caminho ótico da cubeta de quartzo utilizada (recomendável 1 cm).

Observações:

1) A análise de lignina solúvel no líquido filtrado deverá ser realizada em até 6 h após o término da etapa de hidrólise da amostra na autoclave.

2) O comprimento de onda (240 nm) e o coeficiente de extinção da lignina (absortividade = 25 L/g cm) adotados na metodologia acima são indicados para a determinação da lignina solúvel em ácido extraída do bagaço da cana-de-açúcar. Outros materiais podem requerer comprimentos de onda diferentes, assim como apresentarem valores de absortividade diversos, conforme reportado por Sluiter et al. (2012).

3) Para estimativa do teor de lignina total na amostra, basta somar as frações de lignina Klason e solúvel obtidas nos cálculos anteriores (Equação 23 + Equação 25).

10.8. PREPARO DA AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS ESTRUTURAIS

- (a) Para análise cromatográfica de carboidratos estruturais extraídos da amostra sólida pela solução de H_2SO_4 , coletar 5 mL do filtrado em tubo *falcon* contendo cerca de 0,3 g de carbonato de cálcio (CaCO_3);
- (b) adicionar vagarosamente o líquido ao tubo, tampar e agitar em vórtex;

- (c) checar o pH da amostra, o qual deverá estar entre 5,0 e 6,0. Caso necessário, dosar um pouco mais de carbonato de cálcio. Não permitir que o pH da amostra ultrapasse o valor de 9,0, para evitar a degradação dos carboidratos;
- (d) em seguida, centrifugar a amostra por 10 min a 3.000 rpm e coletar o sobrenadante;
- (e) amostras que apresentem cor nesse passo deverão ser tratadas por cartucho de extração em fase sólida (Sep-Pak C18) para amenizar as interferências e evitar a saturação prematura da coluna cromatográfica. Solicitar orientação das técnicas responsáveis!
- (f) filtrar a amostra resultante em filtro de seringa de 0,2 µm, recolhendo o filtrado em vial de HPLC;
- (g) caso necessário, armazenar as amostras em freezer a -20°C;
- (h) seguir as recomendações do procedimento detalhado por Sluiter et al. (2012) e observar as condições usualmente empregadas no LPB para efetuar a análise cromatográfica utilizando as colunas *Biorad Aminex HPX-87P* ou *Biorad Aminex HPX-87H* (ver observação a seguir).

Observação: Para realizar a análise de carboidratos estruturais deve-se preparar previamente uma solução de recuperação de açúcares (SRS) com concentrações de açúcares similares ao esperado na amostra em questão. A SRS é utilizada para corrigir as perdas devidas à degradação dos açúcares durante a hidrólise ácida ao qual a amostra foi submetida. O ideal é que a solução SRS seja preparada contendo todos os analitos de interesse, dentre os quais: glicose ($C_6H_{12}O_6$), xilose ($C_5H_{10}O_5$), arabinose ($C_5H_{10}O_5$), manose ($C_6H_{12}O_6$), galactose ($C_6H_{12}O_6$) e celobiose ($C_{12}O_{22}H_{11}$). Para isso, dissolver os reagentes em água deionizada e transferir 10 mL da SRS para dois tubos de pressão. Adicionar 348 µL da solução de H_2SO_4 72% aos tubos contendo a SRS e levar para a autoclave em conjunto com as amostras no passo do item 10.6 (h) em diante. Ao final da análise cromatográfica, corrigir o resultado da concentração de carboidratos nas amostras hidrolisadas dividindo-o pelo coeficiente de recuperação de carboidratos (em formato decimal) observado na solução SRS hidrolisada, calculado como indicado a seguir:

$$\text{Recuperação de açúcares} = \frac{\text{Concentração determinada no HPLC (mg/l)}}{\text{Concentração original na SRS (mg/l)}} \quad \text{Equação 26}$$

Além de carboidratos estruturais, a análise de compostos originários da degradação de açúcares, tais como furfural e 5-hidroximetilfurfural, são de grande interesse no estudo da hidrólise de materiais lignocelulósicos. Dessa forma, verificar junto às técnicas responsáveis a possibilidade de determinar também esses analitos nas amostras em questão.

11. SURFACTANTES ANIÔNICOS – MÉTODO MBAS (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

11.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

As substâncias ativas ao azul de metileno (*Methylene Blue Active Substances – MBAS*) são aquelas capazes de reagir com esse corante catiônico, formando um complexo estável e pouco solúvel em água, podendo ser facilmente transferido da solução aquosa para uma fase orgânica. O complexo formado consiste no estabelecimento de um par iônico entre o ânion das MBAS e o cátion do azul de metileno. A intensidade da cor azul na fase orgânica, por sua vez, pode ser relacionada com a concentração das MBAS (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Este método é relativamente simples e preciso. Ele compreende a extração do azul de metileno que reagiu com as MBAS em clorofórmio (CHCl_3) seguida da determinação da absorvância do corante em espectrofotômetro com comprimento de onda próximo de 650 nm (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Dentre diversas substâncias sintéticas e naturais, o azul de metileno reage principalmente com surfactantes aniônicos, de forma que o presente método pode ser empregado para estimar a concentração desses elementos em corpos d'água e em águas residuárias. Todavia, a presença de outros tipos de substâncias com reatividade ao azul de metileno deve ser sempre considerada.

Compostos orgânicos, tais como sulfonatos, carboxilatos, fenóis, assim como substâncias inorgânicas aniônicas, tais como tiocianatos, cianatos, sulfatos, nitratos e cloretos, podem interferir positivamente. Aminas e proteínas competem com o azul de metileno, interferindo negativamente. Sulfetos descoloram o azul de metileno, interferindo negativamente, mas podem ser eliminados previamente à análise, pela adição de água oxigenada (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Sabões, obtidos a partir de ácidos carboxílicos de cadeia longa (ácidos graxos), não respondem ao método das MBAS por serem fracamente ionizáveis, não sendo capazes de formar um par iônico sob as condições do teste. Já os surfactantes aniônicos sem base saponácea, comumente utilizados na composição de detergentes, reagem fortemente com o azul de metileno, podendo ser quase que completamente recuperados com uma única etapa de extração com CHCl_3 .

O Alquilbenzeno Linear Sulfonado (LAS) é o surfactante aniônico mais amplamente utilizado, sendo empregado na padronização do método MBAS. O LAS não se trata de um composto único, mas compreende um grupo de 26 isômeros e homólogos de estrutura $[\text{R}'\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_3]^- \text{Na}^+$, na qual R' é um grupo alquil linear secundário, variando em seu comprimento de 10 a 14 átomos de carbono. O processo da manufatura define a composição do LAS, que em seguida pode ser modificada no processo de tratamento de águas residuárias.

Os surfactantes dos tipos sulfonados e sulfatados respondem simultaneamente à análise MBAS, mas podem ser diferenciados por outros meios. Os de tipo sulfatado, por exemplo, decompõe-se mediante hidrólise ácida. Assim, o decréscimo na concentração de MBAS após a hidrólise ácida corresponderia ao teor do grupo sulfatado, enquanto a concentração de MBAS remanescente corresponderia ao teor do grupo sulfonado.

Uma vez que o procedimento analítico originalmente reportado pelo *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) (descrita no item 11.3) consiste de uma metodologia excessivamente trabalhosa, demorada e que resulta na geração de altos volumes de resíduos tóxicos (isto é, resíduos de clorofórmio), diversas foram as alternativas propostas com o intuito de simplificar a marcha analítica, reduzir os volumes de amostra e soluções reagentes requeridas, bem como o tempo gasto na execução da análise (HAYASHI, 1975; CHITIKELA; DENTEL; ALLEN, L 1995; KOGA et al., 1999). No presente manual optou-se por descrever a metodologia adaptada por Jurado et al. (2006), de mais simples execução (item 11.2).

Observação: Quando houver a necessidade de minimizar interferências devidas à presença em excesso de compostos não surfactantes ou interferentes, ou para concentrar amostras muito diluídas, uma etapa preliminar de sublação será exigida, consistindo na extração dos surfactantes da fase aquosa por arraste com fluxo gasoso de N_2 até uma camada de acetato de etila. Após a evaporação do solvente, os surfactantes são re-dissolvidos em metanol e, na sequência, novamente em água. Essa amostra purificada e concentrada pode ser, então, submetida à análise. O procedimento em detalhes é apresentado no *Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)*.

11.2. MÉTODO MBAS SIMPLIFICADO

(JURADO et al., 2006)

11.2.1. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 μm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Espectrofotômetro
- Medidor de pH de bancada (pHmetro)
- Balões volumétricos de 100 e 1.000 mL
- Copos de bquer de 100 e 1.000 mL
- Pipeta de vidro graduada de 5,0 mL ou dispensador automático
- Micropipetas de 200, 5.000 e 10.000 μL
- Provetas de vidro graduadas de 100 e 1.000 mL
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas
- Tubos de DQO padrão HACH®
- LAS padrão P.A. com massa molar conhecida
- Azul de Metileno – $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{S}$ P.A.
- Clorofórmio – CHCl_3 P.A.
- Tetraborato de sódio decahidratado – $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Bórax) P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Peróxido de Hidrogênio – H_2O_2 30% P.A.
- Indicador Fenolftaleína: Dissolver 1 g de Fenolftaleína P.A. [$\text{C}_6\text{H}_4\text{COO} \cdot \text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$] em 60 mL de álcool etílico 96%, diluindo com água deionizada até os 100 mL em balão volumétrico.

Observações:

1) Toda a vidraria a ser utilizada na análise de surfactantes deve estar livre de resíduos de detergentes, gorduras e solventes orgânicos. Para limpeza pesada, ou antes de colocar a vidraria em uso, lavar com água quente e sabão, enxaguando abundantemente. Borrifar com etanol e

finalizar repassando com três porções de água deionizada. Não utilizar detergentes comerciais. De preferência, reservar em separado a vidraria para análise de surfactantes.

2) *Para remover resíduos de azul de metileno aderidos à vidraria, borrifar com solução alcoólica de ácido clorídrico (diluir 50 mL de HCl conc. com 450 mL de etanol 96%) e enxaguar abundantemente com água quente. Em seguida, repassar com três porções de água deionizada.*

11.2.2. SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (NaOH) 1,0 M

Dissolver **cuidadosamente** 4,0 g de NaOH em cerca de 80 mL de água deionizada. Após a completa dissolução do reagente e o resfriamento da solução, transferir para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água deionizada.

11.2.3. SOLUÇÃO TAMPÃO BORATO-ALCALINO (0,05 M)

Dissolver 19,0 g de bórax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) em aproximadamente 800 mL de água deionizada. Manter em agitação até a completa dissolução do reagente. Ajustar o pH para 10,5 com algumas gotas da solução de NaOH 1,0 M e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL. Completar o volume com água deionizada.

11.2.4. SOLUÇÃO DE BÓRAX (0,01 M) PARA DILUIÇÃO DO AZUL DE METILENO

Em balão volumétrico de 1.000 mL, dissolver completamente 3,8 g de bórax em água deionizada.

11.2.5. SOLUÇÃO REAGENTE DE AZUL DE METILENO

Em béquer de 100 mL, pesar cuidadosamente 1,0 g de azul de metileno, evitando a fácil dispersão do reagente. Com auxílio de funil de vidro, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL por meio de lavagens sucessivas com pequenas porções da solução de bórax 0,01 M. Repassar o béquer e o funil com a solução e recolher no balão volumétrico até que não reste nenhum resíduo do reagente. Transferir o restante da solução de bórax até completar o volume do balão e homogeneizar. Essa solução deverá apresentar pH na faixa de 5,0 a 6,0. Armazenar em frasco âmbar devidamente identificado, ao abrigo da luz e refrigerado.

Observação: *O preparo de uma nova solução reagente de azul de metileno exige o levantamento de uma nova curva de calibração!*

11.2.6. SOLUÇÃO ESTOQUE DE LAS (1 g/L)

Dissolver, precisamente, 1,0 g do LAS de referência (por exemplo: Dodecilbenzeno Sulfonato de Sódio, $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NaO}_3\text{S}$, P.M. 348,48 g/mol) em béquer de 1.000 mL com cerca de 700 mL de água deionizada. Agitar lentamente, evitando ao máximo a formação de espuma. Ajustar o pH da solução para 7,0 dosando algumas gotas da solução de NaOH 1,0 M, se necessário. Na sequência, transferir vagarosamente para balão volumétrico de 1.000 mL e repassar o béquer com algumas porções de água deionizada, recolhendo no balão. Se ocorrer formação de espuma, borrifar um pouco de etanol na superfície da solução para romper a emulsão e aferir o volume do balão. Homogeneizar por inversões sucessivas. Armazenar sob refrigeração para minimizar a biodegradação. Usar em uma semana, no máximo.

11.2.7. SOLUÇÃO PADRÃO DE LAS (10 MG/L)

Diluir 10 mL da solução estoque de LAS em balão volumétrico de 1.000 mL, completando com água deionizada. Preparar no dia em que for usar.

11.2.8. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,25 – 2,5 MG/L)

Preparar a curva de calibração partindo da solução padrão de 10 mg LAS/L (item 11.2.7) e realizando as diluições proposta na Tabela 15, com água deionizada, em balões volumétricos de 100 mL. Preparar cada padrão, no mínimo, em triplicatas (Lembrar que a triplicata consiste em preparar três soluções de mesma concentração para efetuar a medida).

Transferir 5 mL de cada solução padrão de LAS para tubos de DQO e seguir os passos descritos a seguir para as amostras (item 11.2.10).

Ao fim da análise, zerar o espectrofotômetro com clorofórmio puro na cubeta de DQO e efetuar a leitura dos padrões. Plotar a absorbância obtida pelo teste em branco (água deionizada no lugar da amostra) como ponto inicial da curva de calibração (0 mg LAS/L). Traçar a curva da absorbância versus concentração de LAS padrão, especificando o peso molecular do LAS utilizado como referência.

Tabela 15: Relação das concentrações e alíquotas da solução padrão para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg LAS/L)	Alíquota da solução mãe (mL) para diluição em balão volumétrico de 100 mL
0,0 (branco)	0,0
0,25	2,5
0,50	5,0
1,00	10,0
1,50	15,0
2,00	20,0
2,50	25,0

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que uma nova solução de azul de metileno for preparada ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

Observação: Os resultados do presente método poderão diferir quando expressos em termos de massa, mas não quando apresentados em termos de quantidades molares. Quantidades equimolares de dois surfactantes aniônicos com pesos moleculares diferentes deverão resultar em uma coloração da fase orgânica (CHCl_3) substancialmente igual, embora os valores em massa possam diferir significativamente. Se os resultados forem expressos em massa, como o são geralmente, o peso molecular médio do surfactante medido deve ser conhecido ou uma curva de calibração feita com esse composto particular deverá ser utilizada.

11.2.9. TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂ – 30%)

Caso necessário, para evitar a perda da coloração do azul de metileno por sulfetos dissolvidos na amostra, adicione algumas gotas de água oxigenada 30% (cerca de 5 gotas para cada 100 mL de amostra), agite por alguns segundos e utilize uma alíquota dessa amostra pré-tratada para efetuar a análise.

11.2.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SURFACTANTES ANIÔNICOS (COMO MBAS)

ATENÇÃO: O Clorofórmio é TÓXICO e potencialmente cancerígeno! Manusear cuidadosamente, evitando a inalação e o contato com a pele. Trabalhar na capela, com a exaustão ligada! **Cuidado!**

- (a) Filtrar previamente a amostra em membrana de 0,45 µm para remover materiais em suspensão;
- (b) transferir 5 mL da amostra filtrada ou solução padrão para tubo de DQO;
- (c) adicionar 1 gota do indicador fenolftaleína;
- (d) adicionar 200 µL da solução tampão borato-alcálico (0,05 M) e homogeneizar;
- (e) caso não ocorra o aparecimento da coloração rosada devida à fenolftaleína, adicionar mais solução tampão (dosando 50 µL ou 1 gota por vez) até a viragem da cor (pH > 8,3);
- (f) na sequência, adicionar 100 µL da solução reagente de azul de metileno e homogeneizar;
- (g) na capela, sob exaustão, e com auxílio de pipeta de vidro graduada (ou dispensador automático), adicionar 4 mL de clorofórmio;
- (h) tampar hermeticamente o tubo e agitar vigorosamente em vórtex por 1 min, tomando cuidado para não provocar respingos ou o derramamento da amostra;
- (i) deixar o tubo em repouso por 5 min para a separação das fases;
- (j) zerar o espectrofotômetro com uma cubeta de DQO contendo uma porção de clorofórmio puro e ler a absorvância da fase orgânica da amostra (na parte inferior da cubeta) em comprimento de onda de 650 nm;
- (k) descartar adequadamente, em recipientes próprios, o resíduo de clorofórmio da análise;
- (l) é recomendável reportar os resultados obtidos como "mg MBAS/L, calculado como LAS aparente (peso molecular ____)".

Observação: Caso a cor azul na camada aquosa desapareça por completo, é possível que a quantidade de surfactante na amostra tenha ultrapassado (em termos molares) a quantidade disponível de azul de metileno. Nesse caso, repita todo o procedimento utilizando um volume menor de amostra diluída em água deionizada.

11.3. MÉTODO MBAS ORIGINAL

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

11.3.1. MATERIAL

- Balança analítica
- Espectrofotômetro
- Agitador e barra magnética
- Funis de separação de 500, 250 e 100 mL
- Balões volumétricos de 100, 250, 500 e 1.000 mL
- Béquer de 1.000 mL
- Pipeta de vidro graduada
- Proveta de vidro graduada
- Cubetas de vidro com passo ótico de 1,0 cm
- LAS padrão
- Azul de Metileno ($C_{16}H_{18}ClN_3S$) P.A.
- Clorofórmio ($CHCl_3$) P.A.
- Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) P.A.
- Hidróxido de Sódio ($NaOH$) P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado (H_2SO_4) P.A.
- Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) 30% P.A.
- Álcool Isopropílico (Isopropanol – C_3H_8O) P.A.
- Indicador Fenolftaleína: Dissolver 1 g de Fenolftaleína P.A. [$C_{20}H_{14}O_4$] em 60 mL de álcool etílico 96%, diluindo com água deionizada até os 100 mL em balão volumétrico.
- Lã de vidro: Antes de usar, lavar com um pouco de clorofórmio para evitar interferências.

Observações:

1) *Toda a vidraria a ser utilizada na análise de surfactantes deve estar livre de resíduos de detergentes, gorduras e solventes orgânicos. Para limpeza pesada, ou antes de colocar a vidraria em uso, lavar com água quente e sabão, enxaguando abundantemente. Borrifar com etanol e finalizar repassando com três porções de água deionizada. Não utilizar detergentes comerciais. De preferência, reservar em separado a vidraria para análise de surfactantes.*

2) *Para remover resíduos de azul de metileno aderidos à vidraria, borrifar com solução alcoólica de ácido clorídrico (diluir 50 mL de HCl conc. com 450 mL de etanol 96%) e enxaguar abundantemente com água quente. Em seguida, repassar com três porções de água deionizada.*

11.3.2. SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO (H_2SO_4) 1 N

Usando pipeta de vidro, transferir 27 mL de H_2SO_4 concentrado (**lentamente e com cuidado!**) para balão volumétrico de 1.000 mL contendo aproximadamente 500 mL de água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas para manusear o ácido. Em seguida, completar o volume do balão.

11.3.3. SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO (H₂SO₄) 6 N

Usando proveta de vidro graduada, transferir 163 mL de H₂SO₄ concentrado (**lentamente e com cuidado!**) para béquer de vidro de 1.000 mL contendo aproximadamente 500 mL de água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas para manusear o  cido. Após o resfriamento da soluço, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada.

11.3.4. SOLUÇO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1N

Pesar 40 g de NaOH e dissolver, em béquer de vidro, com cerca de 500 mL de água deionizada. Após a completa dissolu o e resfriamento, transferir a soluço para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada.

11.3.5. SOLUÇO REAGENTE DE AZUL DE METILENO

Dissolver 100 mg de azul de metileno com 100 mL de água deionizada. Transferir 30 mL dessa soluço para balão volumétrico de 1.000 mL. Adicionar 500 mL de água deionizada, 41 mL da soluço de H₂SO₄ 6 N e 50 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O). Manter sob agita o até a completa dissolu o. Completar o volume do balão com água deionizada.

***Observa o:** Sempre que uma nova soluço reagente de azul de metileno for preparada, uma nova curva de calibra o deverá ser levantada.*

11.3.6. SOLUÇO ESTOQUE DE LAS

Dissolver, precisamente, 1 g de LAS em aproximadamente 800mL de água deionizada. Transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar vagarosamente o volume com água deionizada evitando a forma o excessiva de espuma. Se ocorrer, borrifar um pouco de etanol na superfície da soluço para romper a emulsão e aferir o volume do balão. Homogeneizar por inversões sucessivas. Armazenar sob refrigera o para minimizar a biodegrada o. Armazenar sob refrigera o para minimizar a biodegrada o. Usar em uma semana, no máximo.

11.3.7. SOLUÇO PADRÃO DE LAS (10 MG/L)

Diluir 10 mL da soluço estoque de LAS em balão volumétrico de 1.000 mL, completando com água deionizada. Preparar no dia em que for usar.

11.3.8. SOLUÇO DE LAVAGEM

Dissolver 50 g de fosfato de sódio monobásico monohidratado (NaH₂PO₄.H₂O) em aproximadamente 500 mL de água deionizada. Manter sob agita o até a completa dissolu o. Adicionar 41 mL da soluço de H₂SO₄ 6 N e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água deionizada.

11.3.9. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRA O (0,025 – 2,0 MG LAS/L)

Preparar uma curva de calibra o com, no mínimo, 5 concentra es padrões igualmente espaçadas e cobrindo a faixa de interesse (variando de 0,025 a 2,0 mg LAS/L). Preparar cada padrão, no mínimo, em

duplicatas, partindo da solução de 10 mg LAS/L (item 11.3.7) e realizando as diluições adequadas com água deionizada em balões volumétricos de 100, 250 ou 500 mL (de acordo com as recomendações da Tabela 16). Lembrar que a duplicata consiste em preparar duas soluções de mesma concentração para efetuar a medida, e não utilizar duas alíquotas da mesma solução!

Reservar uma série de funis de separação para o branco e os padrões selecionados. Transferir as soluções padrões de LAS para os funis de separação. Seguir os passos descritos logo mais (no item 11.3.11) e plotar a curva da absorbância versus microgramas de LAS padrão (em massa e não concentração!), especificando o peso molecular do LAS utilizado. É recomendável um ajuste linear com $R^2 \geq 0,995$.

Para análise direta, selecione o volume da amostra com base na concentração de MBAS esperada, conforme indicado na tabela abaixo:

Tabela 16: Volume de amostra a ser utilizada em função da concentração original de LAS na amostra.

Concentração de MBAS esperada (mg/L)	Volume de amostra (mL)	Massa final de MBAS na alíquota (μg)
0,025 – 0,080	400	10 – 32
0,080 – 0,400	250	32 – 100
0,400 – 2,000	100	100 – 200

Fonte: Adaptado de: American Public Health Association (2005).

Se a concentração esperada estiver acima de 2 mg/L, dilua uma alíquota da amostra contendo de 40 a 200 μg de MBAS em 100 mL de água deionizada.

Observação: *Os resultados do presente método poderão diferir quando expressos em termos de massa, mas não quando apresentados em termos de quantidades molares. Quantidades equimolares de dois surfactantes aniônicos com pesos moleculares diferentes deverão resultar em uma coloração da fase orgânica (CHCl_3) substancialmente igual, embora os valores em massa possam diferir significativamente. Se os resultados forem expressos em peso, como o são geralmente, o peso molecular médio do surfactante medido deve ser conhecido ou uma curva de calibração feita com esse composto particular deverá ser utilizada.*

11.3.10. TRATAMENTO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2 – 30%)

Caso necessário, para evitar a perda da coloração do azul de metileno por sulfetos dissolvidos na amostra, adicione algumas gotas de água oxigenada 30% (cerca de 3 gotas para cada 100 mL de amostra).

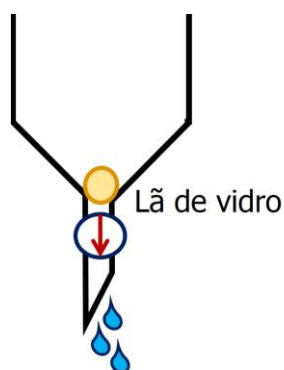
11.3.11. PROCEDIMENTO

ATENÇÃO: *O Clorofórmio é TÓXICO e potencialmente cancerígeno! Manusear cuidadosamente, evitando a inalação e o contato com a pele. Trabalhar na capela, com a exaustão ligada! **Cuidado!***

- (a) Filtrar previamente as amostras que serão analisadas para a remoção dos materiais em suspensão (membrana de 1,2 μm);

- (b) transferir a amostra filtrada ou a solução de LAS padrão para um funil de separação;
- (c) adicionar cerca de 6 gotas do indicador Fenolftaleína;
- (d) adicionar, se necessário, algumas gotas da solução de Hidróxido de Sódio 1 N até formação de coloração rosa;
- (e) neutralizar com algumas gotas da solução de ácido sulfúrico 1 N até o desaparecimento da cor;
- (f) adicionar 10 mL de clorofórmio e 25 mL da solução reagente de azul de metileno. Tampar adequadamente e agitar o funil vigorosamente por 30 segundos, deixando depois em descanso para a separação das fases. Algumas amostras podem requerer um maior tempo para separação;
- (g) caso ocorra formação de emulsão, adicionar um pouco de álcool isopropílico (< 10 mL), tampar e agitar novamente o funil, deixando descansar em seguida;
- (h) drenar a fase orgânica (CHCl_3) para um segundo funil de separação e reservar;
- (i) adicionar mais 10 mL de clorofórmio ao primeiro funil de separação. Tampar, agitar e deixar descansar; drenar novamente a fase de CHCl_3 para o segundo funil de separação. Repetir essa etapa mais uma vez. Se a cor azul na fase aquosa desaparecer, descarte a presente amostra e repita todo o procedimento utilizando um volume menor de amostra;
- (j) adicionar 50 mL da solução de lavagem ao segundo funil de separação (contendo a mistura dos três extratos de clorofórmio obtidos) e agitar vigorosamente por 30 segundos;
- (k) deixar novamente em descanso para a separação das fases;
- (l) drenar a fase de CHCl_3 fazendo-a passar por um funil contendo um tampão de lã de vidro (conforme mostrado na Figura 1) e recolher o filtrado em um balão volumétrico de 100 mL;
- (m) extrair a solução de lavagem mais duas vezes com 10 mL de CHCl_3 cada vez, passando a fase orgânica pelo mesmo funil com o tampão de lã de vidro e recolher as porções filtradas no balão;
- (n) enxaguar o funil e o tampão de lã de vidro com um pouco de CHCl_3 e transferir o líquido para o balão. A mistura final deverá apresentar um aspecto límpido;
- (o) completar o volume do balão com CHCl_3 e homogeneizar;
- (p) transferir uma alíquota da solução para uma cubeta de vidro adequada e efetuar a leitura da absorbância em comprimento de onda de 652 nm, utilizando um branco de CHCl_3 .

Figura 1: Esquema de um funil de separação contendo um tampão de lã de vidro para a filtração da fase orgânica.



Fonte: Os autores.

ATENÇÃO: A lã de vidro é perigosa. Manuseie sob exaustão, na capela, usando luvas adequadas, jalecos de mangas compridas e óculos de segurança. Descarte as luvas logo após o uso. Evite o contato da lã de vidro com a pele, especialmente com o rosto. **CUIDADO!**

11.3.12. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE LAS APARENTE

A partir da curva de calibração, a concentração de LAS aparente (mg/L) poderá ser calculada conforme a seguinte equação:

$$\text{mg MBAS / L} = \frac{\mu\text{g LAS}_{\text{APARENTE}}}{\text{mL}_{\text{DA AMOSTRA ORIGINAL}}} \quad \text{Equação 27}$$

É aconselhável reportar os resultados obtidos como "mg MBAS/L, calculado como LAS aparente (peso molecular ___)".

Observação: Quando houver a necessidade de minimizar interferências devidas à presença de compostos não surfactantes, uma etapa de sublação deverá ser previamente aplicada, conforme apresentado no *Standard Methods (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)*.

V. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS³

12 pH – Método Potenciométrico

13 Condutividade e Salinidade – Método Condutimétrico

14 Alcalinidade e Ácidos Voláteis Totais (Métodos Titulométricos)

15 Cor – Método do Registro do Espectro



³ As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

12. PH – MÉTODO POTENCIOMÉTRICO

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

12.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O pH (potencial hidrogeniônico) é uma grandeza que indica o grau de acidez (H^+) ou de alcalinidade (OH^-) de uma solução aquosa, sendo definido como o logaritmo negativo da atividade dos íons hidrogênio.

De fato, não é a simples concentração dos íons hidrogênio em solução o fator determinante da acidez ou da basicidade do meio, mas sim a sua atividade, o que depende das interações eletrostáticas e covalentes entre os diversos íons presentes em uma mesma solução. Já em soluções muito diluídas, em que as interações iônicas podem ser consideradas desprezíveis, a atividade do íon se iguala à sua concentração, de modo que o valor do pH, nesse caso ideal, pode ser expresso conforme a seguinte aproximação:

$$pH = -\log[H^+] \quad \text{Equação 28}$$

Uma vez que a atividade individual do íon H^+ não pode ser medida, o valor do pH é definido numa escala baseada numa série de soluções tampão, a qual foi introduzida como referencial.

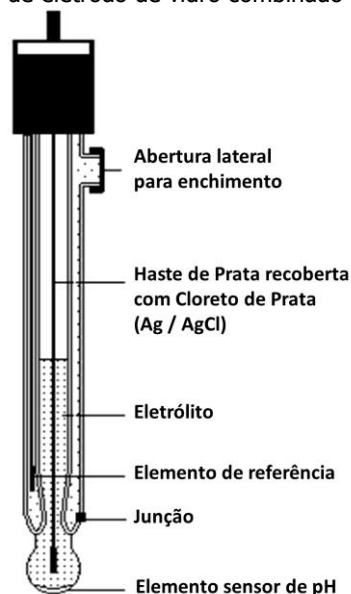
O princípio básico da medição do pH pelo método potenciométrico é a determinação da atividade dos íons hidrogênio usando um eletrodo de referência e um eletrodo de medida.

Quando os dois eletrodos estão alocados em uma mesma unidade, tem-se um eletrodo combinado, conforme mostrado na Figura 2. Nesse caso, o eletrodo de medida consiste de uma fina película de vidro especial (bulbo), que age como uma membrana seletiva aos íons. Quando a membrana de vidro entra em contato com a amostra, um potencial elétrico se forma pela troca de cátions na superfície do vidro.

Já o eletrodo de referência consiste de um elemento (por exemplo $Ag/AgCl$) imerso no eletrólito interno (geralmente uma solução de KCl 3 M), sendo capaz de manter um potencial constante.

Uma vez que a diferença de potencial (em mV) produzida no sistema varia linearmente com o pH, este pode ser determinado pelo instrumento de medida (pHmetro), o qual é calibrado por soluções tampão com valores de pH conhecidos.

Figura 2: Exemplo de eletrodo de vidro combinado para medição do pH.



Fonte: Adaptado de: Fernandes (2013)

O eletrodo de vidro tem ainda a vantagem de ser relativamente livre de interferências devidas à cor, turbidez, matéria coloidal, salinidade e agentes oxidantes ou redutores.

No tratamento de águas residuárias por sistemas biológicos, o pH do meio líquido deve permanecer em faixas adequadas (o mais próximo possível do valor ótimo de pH para o processo em questão) visando a manutenção da biomassa ativa e o desenvolvimento das reações bioquímicas, principalmente as que envolvem atividade enzimática. Pequenas mudanças no pH podem ocasionar grandes alterações na eficiência dos processos biológicos, sendo de fundamental importância o monitoramento desse parâmetro.

12.2. MATERIAL

- Medidor de pH de bancada com eletrodo (pHmetro)
- Agitador magnético e barra magnética
- Balança semi-analítica (precisão $\pm 0,01$ g)
- Copos de béquer de 250 e 500 mL
- Balão volumétrico de 500 mL
- Colher dosadora
- Cloreto de Potássio – KCl P.A.
- Ácido Clorídrico – HCl P.A.
- Hidróxido de Amônio – NH_4OH P.A.
- Soluções tampão com pH 4,00, 7,00 e 10,00
- Papel higiênico

12.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ACONDICIONAMENTO (KCL 3 M)

- (a) Em balança sem-analítica pesar 112 g de cloreto de potássio (KCl) em béquer de 250 mL;
- (b) em seguida, transferir cerca de 400 mL de água deionizada para béquer de 500 mL e colocar em agitação magnética vigorosa;
- (c) transferir, com colher dosadora, a massa de KCl pesada para o béquer com água, pouco a pouco;
- (d) lavar o copo da pesagem com um pouco de água deionizada e transferir para o béquer da solução;
- (e) manter em agitação magnética vigorosa até a completa dissolução do reagente e aguardar que a solução atinja a temperatura ambiente (**a dissolução do KCl em água é endotérmica**);
- (f) transferir a solução para balão volumétrico de 500 mL, completar o volume com água deionizada e homogeneizar;
- (g) armazenar à temperatura ambiente em frasco devidamente identificado;
- (h) preparar uma nova solução com frequência.

12.4. PROCEDIMENTO PARA MEDIÇÃO DO PH

- (a) Verificar se o pHmetro já foi calibrado antes de efetuar a medição das amostras;
- (b) caso necessário, calibrar o pHmetro com soluções tampão de pH 7,00 e 4,00 à temperatura ambiente, observando as instruções no manual do fabricante (para efetuar a análise de amostras expressivamente alcalinas, isto é, com pH acima de 9,0, calibrar o aparelho utilizando as soluções tampão de pH 7,00 e 10,00);

- (c) antes de mergulhar o eletrodo em amostras ou nas soluções tampão, lavar com água deionizada e secar, **cuidadosamente**, com papel higiênico;
- (d) mergulhar o eletrodo na amostra à temperatura ambiente e aguardar a estabilização da leitura para anotar o valor;
- (e) **cuidado** quando for colocar a amostra em agitação, para que a barra magnética não bata no eletrodo (utilize velocidades baixas de agitação e escolha uma barra de tamanho compatível com o recipiente);
- (f) após o uso, lavar e secar com cuidado o eletrodo, colocando-o novamente na solução de acondicionamento (KCl 3 M).

Observações:

1) *As amostras coletadas para determinação do pH devem ser analisadas imediatamente, não podendo ser armazenadas.*

2) *Variações de temperatura implicam em mudanças no valor do pH, uma vez que a temperatura altera as constantes de dissociação dos íons em solução, bem como a resistência do eletrodo, que é um condutor iônico. O aconselhável é utilizar sensores de temperatura acoplados ao pHmetro para a compensação automática do pH medido. Caso contrário, aguardar a amostra atingir a temperatura ambiente antes de efetuar a medição.*

3) *Para verificar a qualidade do eletrodo, configurar o equipamento para o modo de medição absoluta (em mV) e observar o valor medido nas soluções de calibração: Com o eletrodo no tampão de pH 7,00, a medida obtida deverá ser da ordem de 0 ± 30 mV. No tampão de pH 4,00, o valor medido deverá ser de 160 a 180 mV **acima** do valor obtido em pH 7,00. Por fim, usando a solução tampão de pH 10,00, a medida deverá ser de 160 a 180 mV **abaixo** do valor obtido em pH 7,00.*

12.5. CUIDADOS COM O PHMETRO

- Tenha bastante cuidado ao manusear o sensor analítico, ele é construído em vidro e possui partes, como o bulbo, que são muito sensíveis a ação mecânica. Uma batida no fundo de um béquer, por exemplo, é o suficiente para danificar a peça;
- Nunca raspe ou lixe a superfície do vidro (bulbo) do eletrodo;
- **Nunca deixe o eletrodo seco!** Não deixe o sensor de pH fora da solução de acondicionamento por período superior a 6 h. Isto poderá comprometer a velocidade de resposta da peça ou ainda inutilizá-la;
- Trocar com frequência a solução de acondicionamento, principalmente em caso de contaminação;
- **Nunca armazene o eletrodo de pH em água deionizada!** Se armazenado em água, o cloreto de prata (AgCl) do sistema de referência pode precipitar no diafragma e bloqueá-lo;
- Não deixe restos de papel aderidos ao eletrodo ou na solução de acondicionamento;
- **Evite condições extremas:** Temperaturas elevadas, assim como medições constantes em ácidos fortes ou soluções cáusticas, diminuem a vida útil do sensor;
- Nunca exponha o eletrodo a temperaturas abaixo de -12°C ;
- **Mantenha o nível do eletrólito interno** sempre próximo ao orifício de preenchimento;
- Trocar o eletrólito interno sempre que o equipamento passar a apresentar *slope* inferior a 95%.

12.6. LIMPEZA DO ELETRODO DE PH

Sempre que o pHmetro apresentar problemas na medição, demora no tempo de resposta ou não estabilizar, realizar os procedimentos de limpeza abaixo indicados:

- **Regeneração do eletrodo:** Deixar o eletrodo por, no mínimo, 3 min em uma solução de HCl 10% (diluir 27 mL de HCl concentrado para 100 mL), seguida de uma solução de NH₄OH 5% (diluir 17 mL de NH₄OH concentrado para 100 mL) por, no máximo, 2 min. Caso não for notada melhora, repetir o procedimento utilizando uma solução de HCl 25% (diluir 68 mL de HCl concentrado para 100 mL) por 10 min, seguida da solução de NH₄OH 5% por, no máximo, 7 min. Lavar abundantemente com água deionizada e deixar repousar em KCl 3 M por 30 min;

- **Limpeza geral:** Deixar o eletrodo por 15 min em solução morna (no máximo 50°C) de hipoclorito de sódio (água sanitária comercial diluída 10 x em água deionizada) com algumas gotas de detergente e sob vigorosa agitação magnética. Esperar o eletrodo esfriar naturalmente e lavar abundantemente com água deionizada. Deixar repousar em KCl 3 M por 30 min antes do uso;

- **Slope inferior a 95%:** Remover o eletrólito interno através do orifício de recarga, com o auxílio de uma seringa. Enxaguar a peça, internamente, com água deionizada por 3 vezes. Com o sistema de referência interno limpo, preencher o eletrodo com um novo eletrólito interno. Repetir este procedimento por 3 vezes e deixar o eletrodo repousar em KCl 3 M por 30 min antes do uso;

- **Depósito de sais:** Dissolva os depósitos imergindo o eletrodo em água deionizada por 10 a 15 min em agitação magnética vigorosa (cuidado para não quebrar a sonda!). Em seguida, deixar repousar em KCl 3 M por 30 min antes do uso;

- **Óleos e graxas:** Lave o bulbo do eletrodo cuidadosamente com detergente neutro biodegradável e água ou com solução de metanol até que toda gordura seja removida. Enxaguar abundantemente com água deionizada e deixar repousar em KCl 3 M por 30 min;

- **Junção de referência entupida por ressecamento de sal:** Aqueça uma solução de KCl 3 M até, no máximo, 50°C, e mantenha o sensor imerso por até 10 min. Aguardar o eletrodo esfriar naturalmente. Em seguida, deixar a peça repousar em KCl 3 M por 30 min antes do uso;

- **Contaminação por proteínas:** Usar solução de Pepsina a 5% em HCl 0,1 M (dissolver 5 g de pepsina em 80 mL de água deionizada, adicionar 0,84 mL de HCl concentrado e completar o volume para 100 mL). Deixar o eletrodo na solução por até 15 min, enxaguar abundantemente com água deionizada e deixar repousar em KCl 3 M por 1 h antes do uso;

- **Escurecimento do diafragma:** Usar solução de 1 M de Tiourea (CH₄N₂S) em HCl 0,1 M (dissolver 7,61 g de tiourea em 80 mL de água deionizada, adicionar 0,84 mL de HCl concentrado e completar o volume para 100 mL). Deixar o eletrodo imerso na solução por 30 min, enxaguar abundantemente com água deionizada e deixar repousar em KCl 3 M por 1 h antes do uso.

Observação: Após cada um dos procedimentos acima indicados, realizar uma nova calibração do aparelho com as soluções tampão adequadas.

13. CONDUTIVIDADE E SALINIDADE – MÉTODO CONDUTIMÉTRICO

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

13.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Condutividade é a medida da capacidade de uma solução aquosa em transportar uma corrente elétrica. Essa capacidade depende da presença de íons em solução (cátions e ânions), variando de acordo com a mobilidade, valência e concentração desses íons, assim como em função da temperatura da solução. A quantificação da condutividade de uma amostra é uma determinação indireta do seu teor de sólidos dissolvidos. Soluções contendo compostos inorgânicos geralmente se apresentam como bons condutores de corrente. Moléculas de compostos orgânicos que não se dissociam em solução aquosa, por sua vez, diminuem a condutividade do meio (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Um medidor de condutividade elétrica (condutímetro) é composto basicamente de dois eletrodos de platina combinados em uma célula com geometria definida, sendo um eletrodo responsável por detectar a corrente elétrica emitida pelo outro, o que ocorre alternadamente (corrente alternada). Dessa forma, o medidor de condutividade realiza, na verdade, a medição da condutância elétrica da amostra, a qual é uma propriedade da medida, ou seja, depende do aparelho de medição.

A condutância elétrica (G) é definida como sendo o inverso da resistência ($G = 1/R$) de uma substância. Uma vez que a condutância é diretamente proporcional à área superficial do eletrodo (A) e inversamente proporcional à distância entre os eletrodos (L) (Equação 29), a constante de proporcionalidade k é definida como sendo a condutividade da amostra (também conhecida como condutância específica). A condutividade, por sua vez, é uma propriedade característica da solução na qual a medida é efetuada.

$$G = k \times \left(\frac{A}{L} \right) \quad \text{Equação 29}$$

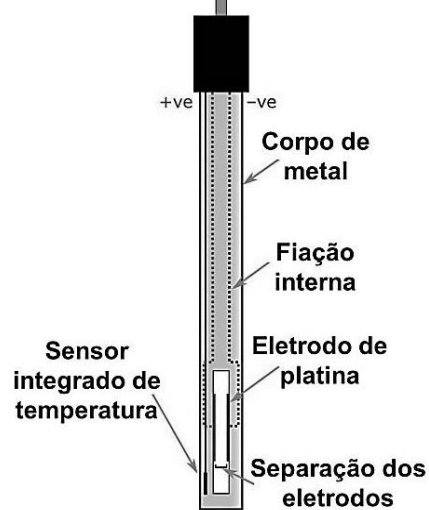
Usualmente os equipamentos de medição de condutividade expressam a leitura da condutância já convertida para termos de condutividade. Caso contrário, a condutividade da amostra pode ser determinada multiplicando-se o valor da condutância pela constante de célula do equipamento (razão L/A), a qual é função da geometria da célula de condutividade instalada. Cada faixa de condutividade a ser medida exige o emprego de uma célula de condutividade com constante adequada. Para a maioria das amostras, constantes de célula da ordem de 1-2 cm⁻¹ são suficientes para medidas de condutividade intermediárias, encontradas em águas residuárias. O ideal é utilizar células com constantes menores (da ordem de 0,1 cm⁻¹) para amostras de água pura, enquanto que para amostras com alta salinidade, células com constantes de até 10 cm⁻¹ são recomendadas.

Uma vez que a unidade no SI da condutância é o siemens (S), medidas de condutividade costumam ser expressas em siemens, milisiemens ou micro-siemens por centímetro (S/cm, mS/cm ou µS/cm, respectivamente).

A temperatura também é um fator preponderante nas medidas de condutividade. Dessa forma, a maioria dos condutímetros comerciais apresenta um sensor de temperatura integrado, realizando a compensação da medida automaticamente. Caso contrário, a temperatura da solução deverá ser aferida e o cálculo da compensação efetuado manualmente (verifique o manual do fabricante). A temperatura padrão para a expressão dos valores de condutividade é de 25°C.

Um esquema geral de um sensor de condutividade composto de dois eletrodos de platina é apresentado na figura a seguir:

Figura 3: Exemplo de sensor utilizado na medição de condutividade.



Fonte: Adaptado de: Connelly (2017).

A condutividade da água ultrapura ideal, isto é, isenta de quaisquer outras substâncias que não moléculas de H_2O , seria praticamente nula ($0 \mu S/cm$), indicando que a água nesse grau de pureza é um isolante elétrico. Água deionizada, obtida em laboratórios, geralmente apresenta uma condutividade na faixa de $0,5$ a $5 \mu S/cm$. Enquanto que a água ultrapura (Milli-Q®) deve apresentar valor de condutividade de até $0,1 \mu S/cm$. Para efeitos comparativos, a condutividade da água do mar pode chegar a $50.000 \mu S/cm$.

A medida de condutividade também pode ser empregada para determinação indireta da salinidade de amostras aquosas. Para isso, preparar algumas soluções padrões de KCl ou NaCl com diversos níveis de concentração (em mg/L ou ppm) cobrindo a faixa de interesse e determinar a condutividade de cada solução. Estabelecer, em seguida, uma relação linear (curva de calibração) entre a condutividade e a salinidade das amostras. Por fim, medir a condutividade das amostras em questão e expressar o resultado em termos de salinidade. A tabela a seguir apresenta alguns valores típicos de condutividade relacionados com soluções de sal em concentrações conhecidas:

Tabela 17: Relação típica entre condutividade ($\mu S/cm$ a $25^\circ C$) e soluções padrões de NaCl.

Condutividade aproximada ($\mu S/cm$ a $25^\circ C$)	NaCl (ppm)
2,2	1
21,4	10
210	100
1.000	500
1.413	700
1.990	1.000
17.600	10.000

Fonte: Os autores.

13.2. MATERIAL

- Medidor de condutividade de bancada (condutímetro)

- Solução de calibração (KCl 0,0100 M)
- Papel higiênico

13.3. PROCEDIMENTO PARA MEDIDA DE CONDUTIVIDADE

- (a) Verificar a calibração do condutivímetro antes de efetuar a medição das amostras;
- (b) caso necessário, calibrar o aparelho com a solução padrão obtida comercialmente (ou preparada conforme o item 13.4) e seguir as instruções no manual do fabricante;
- (c) se for o caso, aguardar a temperatura da amostra atingir a temperatura ambiente;
- (d) antes de mergulhar o eletrodo em amostras ou na solução padrão, lavar com água deionizada e secar cuidadosamente com papel higiênico;
- (e) mergulhar o eletrodo na amostra garantindo que o nível de líquido tenha ultrapassado o nível mínimo de submersão;
- (f) fazer movimentos circulares com a sonda para eliminar bolhas de ar eventualmente presentes (cuidado para não bater o sensor no recipiente da amostra);
- (g) manter a sonda mergulhada por cerca de 1 min até que a leitura digital se estabilize. Tenha bastante calma na medição, pois a estabilidade térmica da sonda e dos sensores nem sempre é rápida!
- (h) anotar o resultado verificando se a correção de temperatura foi efetuada automaticamente;
- (i) lavar e secar a sonda entre uma amostra e outra;
- (j) após o uso, lavar e secar com cuidado o eletrodo, acondicionando-o novamente em água deionizada.

Observação: *O ideal é efetuar a análise de amostras o mais rápido possível. Caso necessário, armazenar a amostra refrigerada (não congelar) em frasco bem fechado, sem deixar headspace. Antes de proceder à análise, manter essa amostra em repouso por tempo adequado, até que atinja a temperatura ambiente.*

13.4. CALIBRAÇÃO DO SENSOR DE CONDUTIVIDADE

É recomendada a realização de, no mínimo, uma calibração semanal de sensores que estejam em uso frequente. Sensores utilizados de forma pontual devem ser calibrados no mesmo dia, previamente à realização da medida. Para calibração de sensores com constante de célula da ordem de $1,0 \text{ cm}^{-1}$, preparar uma solução padrão de cloreto de potássio (KCl) 0,0100 M conforme os passos elencados a seguir:

- (a) Secar uma massa adequada de KCl P.A. em estufa a $103\text{-}105^\circ\text{C}$ por cerca de 2 h, no mínimo, resfriando em dessecador antes do uso;
- (b) coletar em um frasco Duran® um pouco mais de 1.000 mL de água ultrapura (Milli-Q®) e manter por cerca de 20 min sob ultrassom;
- (c) em balança analítica, pesar, com o máximo de exatidão, 745,6 mg de KCl;
- (d) transferir quantitativamente a massa do reagente para balão volumétrico de 1.000 mL, dissolvendo o sal com a água Milli-Q® recém-coletada e submetida ao ultrassom;
- (e) homogeneizar a solução por inversões sucessivas do balão até a dissolução completa do reagente;

- (f) armazenar em frasco de vidro bem fechado, com *headspace* livre de CO₂;
- (g) a 25°C essa solução deverá apresentar uma condutividade de 1.413 µS/cm;
- (h) efetuar a calibração do equipamento utilizando uma porção suficiente da solução padrão e seguindo as instruções no manual do fabricante;
- (i) por fim, descartar a alíquota da solução utilizada.

13.5. CUIDADOS COM O SENSOR DE CONDUTIVIDADE

- Tenha bastante cuidado ao manusear o sensor analítico, ele possui partes frágeis, que são sensíveis a ação mecânica;

- **Não deixe o sensor seco!** Não deixe a célula de condutividade fora do compartimento com água deionizada por período superior a 6 h. Isto poderá comprometer a velocidade de resposta da peça ou ainda inutilizá-la;

- Trocar com frequência a água deionizada utilizada para acondicionamento da peça;

- Não deixe restos de papel aderidos ao sensor ou na solução de acondicionamento;

- **Evite condições extremas:** Temperaturas elevadas ou abaixo de -12°C diminuem a vida útil do sensor, podendo inclusive inutilizá-lo;

- Para a limpeza do sensor, água deionizada com detergente neutro geralmente é o suficiente;

- Para limpeza mais específica, utilizar uma mistura de uma parte de álcool isopropílico, uma parte de éter etílico e uma parte de HCl 0,1 M. Após a limpeza, enxaguar abundantemente a célula com água deionizada.

14. ALCALINIDADE E ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS (MÉTODOS TITULOMÉTRICOS)

14.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A alcalinidade é uma variável importante no tratamento de efluentes quando há evidências de que a redução do pH pode afetar o metabolismo dos microrganismos responsáveis pela depuração anaeróbia (VON SPERLING, 1996a; 1996b).

Basicamente, a digestão anaeróbia de efluentes orgânicos consiste no equilíbrio entre as etapas denominadas acidogênese e metanogênese. O pH de águas residuárias, sob tratamento anaeróbio, deve ser mantido em valores levemente acima de 7,0 para impedir a inibição do metabolismo de microrganismos metanogênicos, pelo desequilíbrio entre as duas etapas. Entretanto, como as bactérias acidogênicas desenvolvem-se mais rapidamente que as metanogênicas, aumentos na concentração ou na vazão do afluente podem elevar as concentrações de ácidos voláteis produzidos. Por esse motivo, o reator deve apresentar a característica de absorver possíveis perturbações, caracterizada pela capacidade de tamponamento do sistema que, quanto maior, mais estável e seguro será (ANDERSON; YANG, 1992). Afluentes ricos em nitrogênio orgânico e sulfato geralmente produzem efluentes com alcalinidade elevada.

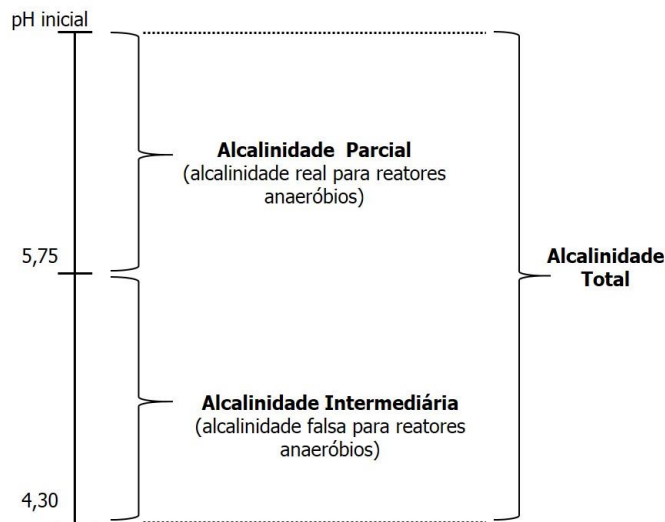
A alcalinidade de uma solução é a medida da sua capacidade de neutralizar ácidos, resistir às mudanças de pH ou tamponar o sistema. E isso devido à presença de bases (hidróxidos), de sais de ácidos inorgânicos fracos (bicarbonato, borato, silicato, fosfato e sulfeto) e de sais de ácidos orgânicos voláteis (acetato, propionato, butirato, entre outros) e não voláteis (benzoato, lactato, humato, entre outros).

De fato, o monitoramento da alcalinidade em reatores biológicos é muito mais eficaz que medida do pH, pois enquanto a escala do pH é logarítmica, a escala da alcalinidade é linear. Assim, um pequeno abaixamento do pH implica num grande consumo de alcalinidade, resultando em diminuição significativa da capacidade tampão do sistema. Geralmente, o valor da alcalinidade é expresso em **mg CaCO₃/L**.

A alcalinidade total de uma amostra é composta por dois tipos diferentes (Figura 4):

- **Alcalinidade parcial (5,75 < pH inicial < 8,00):** Ânions de ácidos fracos (bicarbonato, borato, silicato, fosfato e bissulfeto) denominada alcalinidade real para reatores anaeróbios.
- **Alcalinidade intermediária (4,30 < pH < 5,75):** Ânions de ácidos orgânicos (acetato, propionato, butirato, lactato, etc.) denominada alcalinidade falsa para reatores anaeróbios.

Figura 4: Frações da alcalinidade total presente em reatores anaeróbios.



Fonte: Os autores.

A Alcalinidade devida a hidróxidos, que ocorre exclusivamente pela presença de íons OH^- (hidroxila), é típica para efluentes com $\text{pH} > 10$, não sendo observada em efluentes de reatores anaeróbios. Já alcalinidade devida a carbonatos (CO_3^{2-}) ocorre apenas em efluentes com $\text{pH} > 8,3$.

A relação **Ai/Ap**, por sua vez, é considerada um parâmetro extremamente útil para indicar a ocorrência de distúrbios do processo anaeróbio, uma vez que o desbalanceamento na produção e no consumo de ácidos voláteis provoca o aumento dessa relação. Em seus experimentos, Ripley, Boyle e Converse (1986) notaram que em valores Ai/Ap próximos de 0,3 o processo se mantinha estável. Já valores superiores a 0,3 estiveram sempre associados a certa instabilidade na digestão anaeróbia. Vale lembrar que é possível que a estabilidade do processo ocorra em valores de Ai/Ap diferentes, devendo ser verificado caso a caso. Esse valor, no entanto, permanece uma referência importante para o monitoramento imediato de reatores anaeróbios.

Substâncias como sabões, óleos, sólidos suspensos ou precipitados podem causar interferências na medida do pH por depositarem-se no eletrodo. Processos de filtração, diluição, concentração ou qualquer outra alteração na amostra são desaconselhados (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Não são registrados valores de precisão devido à grande variação nas características das amostras, considerando-se apenas dados em amostras sintéticas:

- 1 mg CaCO_3/L de desvio padrão em amostras de 10-500 mg CaCO_3/L em amostras cuja alcalinidade é devida a carbonatos e bicarbonatos;
- 5 mg CaCO_3/L de desvio padrão, e média 9 mg CaCO_3/L abaixo do valor real em amostras de 120 mg CaCO_3/L cuja alcalinidade é devida a bicarbonato;
- 8 e 5 mg CaCO_3/L de desvio padrão em amostras de 80 e 65 mg CaCO_3/L , respectivamente, em amostras cuja alcalinidade é devida a carbonato de sódio;
- 40 mg CaCO_3/L de desvio padrão em amostras de 1.000 mg CaCO_3/L em amostras cuja alcalinidade é devida a carbonatos e bicarbonatos, em várias razões de concentrações.

14.2. MATERIAL

- Agitador magnético e barra magnética
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Medidor de pH (precisão $\pm 0,01$ unidade de pH)
- Bureta digital de 10,00 mL ou buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Estufa a 103-105°C
- Chapa aquecedora
- Centrífuga de bancada
- Cronômetro digital
- Proveta graduada de 50 mL
- Balão volumétrico de 100 mL
- Erlenmeyer de 125 mL
- Béquer de 100 mL
- Pipeta de vidro graduada de 5,0 mL
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A. (em lentilhas)
- Hidrogenoftalato de Potássio (KHP) – $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})\text{COOK}$ (202,22 g/mol) P.A.
- Tetraborato de sódio decahidratado – $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (Bórax) P.A.

- Fenolftaleína – $C_6H_4COO.C(C_6H_4OH)_2$ P.A.
- Azul de Bromotimol – $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ P.A.
- Etanol 96% – C_2H_5OH P.A.
- Pérolas de vidro
- Vidros de relógio

14.3. PREPARO E PADRONIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES

ATENÇÃO: *As dissoluções de NaOH e H_2SO_4 em água são muito exotérmicas; por isso é necessário ter muito cuidado com o aquecimento do recipiente. Deve-se adicionar lentamente o ácido à água, e nunca o oposto, sempre trabalhando em capela, com a exaustão ligada. Manusear o frasco de ácido concentrado usando jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança.*

As concentrações do ácido e da base envolvidos nos métodos titulométricos devem ser modificados para se adequarem ao tipo de efluente, de modo a serem consumidos volumes adequados de ácido e de base, evitando-se titulações muito prolongadas com soluções muito diluídas ou volumes muito pequenos de reagentes mais concentrados, o que poderão comprometer os resultados. Dessa forma, caso seja necessário, variar convenientemente a molaridade das soluções de NaOH e H_2SO_4 ao longo dos procedimentos de preparo e padronização das soluções apresentados nos itens a seguir.

14.3.1. SOLUÇÃO DE NaOH 0,05 M (0,05 N)

Solução de NaOH 0,05 M = 0,05 N (Normalidade = K x Molaridade)

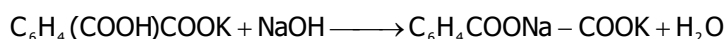
Massa molecular = 40,0 g/mol

K = 1 (número de hidroxilas OH^- ionizáveis)

Portanto, C = 0,05 mol/L x 40 g/mol = 2,00 g/L

Assim, para preparar 1 litro de solução NaOH 0,05 M, dissolver **com cuidado** cerca de 2 g de NaOH P.A. em água deionizada, aguardar esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água deionizada. **Levar em conta que a solução de NaOH é instável: a reação com o CO_2 atmosférico exige padronização frequente (se possível, semanal)!**

A padronização da solução de NaOH deve ser feita utilizando o padrão primário hidrogenoftalato de potássio – KHP (P.A.), através da reação:



Equação 30

MM: 204,22 g

M.M: 40,0g

O KHP deve ser mantido continuamente em estufa a 60°C para evitar absorção de umidade. Caso contrário, secar o KHP em estufa a 103-105°C por 2 h antes do uso e resfriar em dessecador. A padronização deve ser feita em triplicatas. Massas de KHP próximas de **0,1000 g** devem ser determinadas em balança analítica, anotando-se o valor exato de cada uma e dissolvendo-as em cerca de 25 mL de água deionizada, usando frascos de erlenmeyer de 125 mL. Adicionar cerca de 3 gotas de solução indicadora de Fenolftaleína e trabalhar sobre um **fundo branco**. Com auxílio de uma bureta, adicionar a solução de NaOH até uma **leve** coloração rosada **persistente** e anotar o volume gasto na titulação de cada padrão.

A solução indicadora de Fenolftaleína é preparada dissolvendo-se 1,0 g de Fenolftaleína P.A. $[\text{C}_6\text{H}_4\text{COO.C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2]$ em 60 mL de álcool etílico 96% (Etanol P.A.), diluindo em seguida com água deionizada até 100 mL em balão volumétrico. Quando o indicador utilizado for a Fenolftaleína, tem-se uma solução transparente para a região ácida e levemente rosada no ponto final.

A molaridade da solução de NaOH é calculada pela Equação 31 (considerar a média das triplicatas):

$$M_{\text{NaOH}} = \frac{\text{massa KHP(g)} \times 1000}{\text{volume NaOH(mL)} \times 204,22} \quad \text{Equação 31}$$

14.3.2. SOLUÇÃO DE H_2SO_4 0,05 M (0,1 N)

Solução de H_2SO_4 0,05 M = 0,1 N (Normalidade = K x Molaridade)

K = 2 (número de íons H^+ ionizáveis)

Massa molecular H_2SO_4 = 98 g/mol

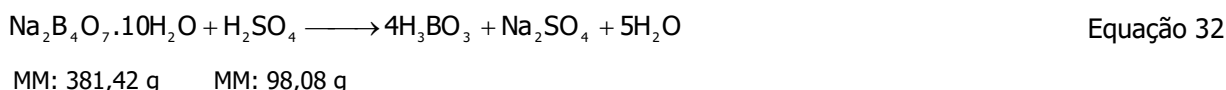
d (densidade) = 1,84 kg/L = 1,84 g/mL

Porcentagem de H_2SO_4 no reagente concentrado = 97,5%

1 mL do reagente concentrado corresponde a $1,84 \times 0,975 = 1,794$ g de H_2SO_4

Portanto, C = 0,05 mol/L x 98 g/mol = 4,9 g/L, equivalentes a 2,73 mL do reagente concentrado.

Logo, para preparar 1 litro de solução H_2SO_4 0,05 M adicionar, **com cuidado**, 2,75 mL de solução concentrada de H_2SO_4 P.A. (usando pipeta de vidro) em cerca de 100 mL água deionizada e, após o resfriamento, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água deionizada. A padronização da solução de H_2SO_4 deve ser feita utilizando-se o padrão primário tetraborato de sódio decahidratado (bórax), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, através da seguinte reação:



O bórax deve ser armazenado em dessecador a vácuo com sílica anidra, e não na estufa, para evitar a desidratação da molécula. A padronização deve ser feita em triplicatas, com massas conhecidas do padrão em torno de **0,1000 g** (anotar a massa exata). Dissolver completamente o reagente com cerca de 50 mL de água deionizada em frascos de erlenmeyer de 125 mL. Cerca de 3 a 5 gotas de solução de Azul de Bromotimol são usadas como indicador de ponto final. Com auxílio de uma bureta, titular com a solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 0,01$ M, anotando o volume requerido para a viragem da coloração.

A solução indicadora de Azul de Bromotimol é preparada dissolvendo-se 100 mg de Azul de Bromotimol P.A. ($\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{Br}_2\text{O}_5\text{S}$) em 20 mL de álcool etílico 96% quente. Após o resfriamento, diluir a solução com água deionizada até 100 mL em balão volumétrico. Conservar em frasco âmbar, ao abrigo da luz. Quando o indicador utilizado for o Azul de Bromotimol, tem-se uma solução azul para a região básica e amarela no ponto final.

Por fim, calcular a molaridade da solução pela Equação 33 (considerar a média das triplicatas):

$$M_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{\text{massa Bórax (g)} \times 1000}{\text{volume H}_2\text{SO}_4 \text{ (mL)} \times 381,42} \quad \text{Equação 33}$$

14.4. DETERMINAÇÃO DE ALCALINIDADE – MÉTODO DE RIPLEY**(RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986)**

- (a) Calibrar o pHmetro com soluções padrões de pH 7,00 e pH 4,00 à temperatura ambiente;
- (b) se necessário, centrifugar a amostra por 5 min a 3.500 rpm (esse passo pode ser omitido quando a amostra não apresentar teor considerável de sólidos em suspensão);
- (c) transferir 50,0 mL da amostra bruta ou centrifugada para béquer de 100 mL;
- (d) lavar o eletrodo do pHmetro com água deionizada, secar cuidadosamente com papel higiênico e medir o pH inicial da amostra;
- (e) titular a amostra, em agitação magnética moderada, adicionando a solução padronizada de H₂SO₄ ~ 0,05 M (0,1 N), até pH = 5,75. Anotar o volume V₁; essa alcalinidade é denominada parcial, podendo ser aproximada à alcalinidade a bicarbonato, uma vez que compreende 80% de bicarbonato e 20% de sais de ácidos orgânicos voláteis;
- (f) zerar a bureta automática (quando for o caso) e continuar a adição da solução de H₂SO₄ até pH = 4,3. Anotar o volume V₂; Essa alcalinidade é denominada intermediária, podendo ser aproximada àquela devida aos sais de ácidos orgânicos voláteis. Reservar a amostra para determinação da concentração de ácidos orgânicos totais (item 14.5);
- (g) tem-se então o volume V₃ = V₁ + V₂, o qual é referente à alcalinidade total;
- (h) calcular as alcalinidades parcial, intermediária e total pelas equações que seguem:

14.4.1. ALCALINIDADE PARCIAL (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

$$A_{\text{PARCIAL}} \text{ (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = \frac{V_1 \times N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 50.000}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 34}$$

14.4.2. ALCALINIDADE INTERMEDIÁRIA (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

$$A_{\text{INTERMEDIÁRIA}} \text{ (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = \frac{V_2 \times N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 50.000}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 35}$$

14.4.3. ALCALINIDADE TOTAL (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

$$A_{\text{TOTAL}} \text{ (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = \frac{V_3 \times N_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 50.000}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 36}$$

Observação: O valor 50.000 é o equivalente-grama do CaCO₃ em mg/L, cuja massa molecular é de 100,0 g/mol e o número de valência é 2.

14.5. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS – MÉTODO DE DILALLO & ALBERTSON

(DILALLO; ALBERTSON, 1961)

A alcalinidade utilizável em reatores anaeróbios é devida, principalmente, à alcalinidade a bicarbonato ($A_{\text{BICARBONATO}}$), geralmente na forma de bicarbonato de amônio. Ânions de ácidos inorgânicos fracos, como fosfatos e sulfetos, também contribuem com a alcalinidade real do sistema. Por outro lado, sais de ácidos orgânicos gerados na degradação da matéria orgânica também serão titulados como alcalinidade (AAV), devendo ser monitorados a fim de se acompanhar o equilíbrio da digestão anaeróbia.

Na presente metodologia para determinação da concentração de ácidos voláteis totais (AVT) e da alcalinidade a bicarbonato ($A_{\text{BICARBONATO}}$) utiliza-se a mesma amostra já titulada anteriormente na determinação da alcalinidade total (item 14.4), acrescentando-se os passos a seguir:

- (a) Reduzir o pH da amostra de 4,30 para 3,30 com $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 0,05 \text{ M}$ (0,1 N) e manter sob fervura por cerca de 3 min, para remoção do dióxido de carbono da solução;
- (b) antes de iniciar o aquecimento da amostra, adicionar pérolas de vidro ao fundo do béquer para amenizar a turbulência da ebulição e cobrir a boca do béquer com vidro de relógio de tamanho compatível e lado côncavo para cima;
- (c) esfriar a amostra em banho de água até a temperatura ambiente;
- (d) colocar a amostra novamente em agitação magnética moderada, medindo o pH;
- (e) adicionar solução padronizada de NaOH $\sim 0,05 \text{ M}$ até pH 4,00 e desprezar esse volume;
- (f) titular a amostra ($\text{pH}_{\text{INICIAL}} = 4,00$) com solução padronizada de NaOH $\sim 0,05 \text{ M}$ até pH 7,00 e anotar esse volume (V). Essa adição permitirá, principalmente, a neutralização dos ácidos orgânicos presentes na amostra;
- (g) efetuar os cálculos apresentados a seguir:

14.5.1. ALCALINIDADE A ÁCIDOS VOLÁTEIS (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO_3)

$$\text{AAV (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = \frac{V \times N_{\text{NaOH}} \times 50.000}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 37}$$

14.5.2. ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS (MG/L, EXPRESSA COMO ÁCIDO ACÉTICO – HAC)

14.5.2.1. MÉTODO ORIGINAL DE DILALLO & ALBERTSON

O fator de conversão (f) para determinar a concentração de ácidos voláteis totais (AVT) a partir da alcalinidade devida aos ácidos (AAV) depende da quantidade de ácidos que é titulada entre pH 4,0 e 7,0. O pH de equilíbrio dos ácidos orgânicos é menor que 4,0, mas variável com a concentração de ácidos. Além disso, o pH final da titulação de ácidos fracos com base forte é sempre maior que 7,00. Logo, experimentalmente, DiLallo e Albertson (1961) propuseram um fator de conversão igual a 1,5 para alcalinidade devida a ácidos (AAV) superior a 180 mg CaCO_3/L e 1,0 para valores inferiores:

$$\text{AVT (mg HAc /L)} = \text{AAV} \times f \quad \text{Equação 38}$$

Sendo: $f = 1,5$ caso $\text{AAV} \geq 180 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ ou

$f = 1,0$ caso $\text{AAV} < 180 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$.

14.5.2.2. MÉTODO DE DiLALLO & ALBERTSON MODIFICADO

O método modificado de DiLallo e Albertson (CAVALCANTI; VAN HAANDEL, 2001) consiste em aplicar o fator 1,41 para converter a alcalinidade a ácidos voláteis (AAV – dada em mg CaCO₃/L) em concentração de ácidos voláteis totais (AVT – expressa em mg HAc/L). Esse fator leva em conta que 1 mg/L de AAV (como CaCO₃) corresponde a 1,2 mg/L de AVT (como HAc), assumindo-se também que, até pH = 4,0, apenas 85% dos ácidos voláteis totais são detectados (MCCARTY, 1964a; 1964b; 1964c; 1964d):

$$AVT \text{ (mg HAc /L)} = \frac{1,2 \times AAV}{0,85} = 1,41 \times AAV \quad \text{Equação 39}$$

Observação: O fator de conversão de 1,2 é obtido pela razão entre o equivalente-grama do ácido acético (60.000) pelo equivalente-grama do CaCO₃ (50.000) em mg/L.

14.5.3. ALCALINIDADE A BICARBONATO (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

$$A_{\text{BICARBONATO}} \text{ (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = A_{\text{TOTAL}} - AAV \quad \text{Equação 40}$$

Observação: As concentrações do ácido e da base envolvidos nestes métodos titulométricos devem ser modificadas para se adequarem ao tipo de efluente, de modo a serem consumidos volumes adequados de ácido e de base, evitando-se titulações muito prolongadas com soluções muito diluídas ou volumes muito pequenos de reagentes mais concentrados, que poderão comprometer os resultados.

14.6. ALCALINIDADE E ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS – MÉTODO DE KAPP

(KAPP, 1984 apud BUCHAUER, 1998)

14.6.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O método de Kapp (KAPP, 1984 apud BUCHAUER, 1998), desenvolvido inicialmente para monitoramento de digestores de lodo, considera a interação entre a alcalinidade conferida pelos ácidos voláteis, entre pH 5 e 4, e o sistema tampão carbonato $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ sobre a quantificação dos ácidos e da alcalinidade a bicarbonato. Baseado em uma abordagem empírica e teórica, além da quantificação dos ácidos graxos voláteis, o método também se aplica à determinação da alcalinidade total, alcalinidade devida aos ácidos voláteis e alcalinidade a bicarbonato.

O procedimento do método de Kapp envolve a titulação das amostras partindo do pH original até os valores de pH equivalente a 5,0; 4,3 e 4,0 com uma solução de H_2SO_4 com normalidade conhecida.

Segundo Ribas, Moraes e Foresti (2007) a premissa básica desse método é a de que entre os valores de pH 5,0 e 4,0, exceto o sistema acetato/ácido acético, nenhum outro sistema ácido/base afeta o consumo de ácidos. Além disso, os valores de pKa dos ácidos acético, propiônico, butírico e valérico situam-se em torno de 4,75. O sistema considerado no método de Kapp é o sistema carbonato ($\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$) com pKa de 6,3. Os sistemas $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ e $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ não afetam o método por terem pKa de 8,95 e 7,2, respectivamente. Portanto, os compostos de ácidos voláteis e carbônicos, como HCO_3^- e H_2CO_3 , podem ser detectados por esse método.

Os mesmos autores (RIBAS; MORAES; FORESTI, 2007) compararam diferentes metodologias para determinação de ácidos graxos voláteis com diferentes concentrações de ácidos orgânicos e bicarbonato, e constataram que o método de Kapp (1984) apresentou os melhores resultados quando comparados aos valores obtidos por cromatografia. Essa observação poderia ser explicada pela minimização das perdas dos ácidos orgânicos voláteis, o que ocorreria durante o processo de fervura da amostra acidificada, conforme proposto pelo método de DiLallo e Albertson (1961).

Quanto à determinação de alcalinidade a bicarbonato, o método de Kapp (1984) também se destacou, juntamente com a metodologia proposta por Jenkins, Richard e Daigger (1983), sendo estes os métodos que apresentaram valores medidos mais próximos dos teóricos (RIBAS; MORAES; FORESTI, 2007).

Mota et al. (2015) não encontraram diferenças significativas entre os resultados de ácidos voláteis totais obtidos pelas metodologias de Kapp (1984) e DiLallo e Albertson (1961), tendo o método de Kapp se mostrado, inclusive, menos sensível à interferências devidas a altas concentrações de bicarbonato na determinação de baixas concentrações de ácidos voláteis (MOTA et al., 2015).

Por fim, o método de Kapp é recomendado para o monitoramento de processos anaeróbios tanto pela equivalência observada entre os diversos métodos clássicos usualmente empregados, como também pelo menor tempo demandado e a simplicidade de execução dessa metodologia (CAVALCANTI; VAN HAANDEL, 2001).

14.6.2. MATERIAL

- Agitador magnético e barra magnética
- Bureta digital de 10,00 mL ou buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Medidor de pH (precisão $\pm 0,01$ unidade de pH)
- Béquer de 100 mL

- Ácido Sulfúrico concentrado – H₂SO₄ P.A.

14.6.3. PROCEDIMENTO

- Calibrar o pHmetro com soluções padrões de pH 7,00 e pH 4,00 à temperatura ambiente;
- se necessário, centrifugar a amostra por 5 min a 3.500 rpm (esse passo pode ser omitido quando a amostra não apresentar teor considerável de sólidos em suspensão);
- registrar o pH inicial da amostra;
- titular a amostra em agitação magnética com solução de ácido sulfúrico de normalidade conhecida (0,1 N, por exemplo), reduzindo o pH até 5,0; anotar esse volume ($V_{pH\ 5}$);
- continuar a titulação com H₂SO₄ até pH = 4,3; registrar o volume acumulado ($V_{pH\ 4,3}$);
- concluir a titulação com pH = 4,0, anotando o volume acumulado final ($V_{pH\ 4}$);
- proceder aos cálculos conforme as equações que seguem (CAVALCANTI; VAN HAANDEL, 2001):

14.6.4. ALCALINIDADE TOTAL (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

$$AT\ (mg\ CaCO_3/L) = \frac{V_{pH4,3} \times N_{H_2SO_4} \times 50.000}{V_{Amostra}} \quad \text{Equação 41}$$

14.6.5. ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS (MG/L, EXPRESSA COMO ÁCIDO ACÉTICO – HAc)

$$AVT\ (mg\ HAc\ /L) = \frac{V_{pH4-pH5} \times N_{H_2SO_4} \times 131.340}{V_{Amostra}} - (0,0616 \times AT) - 10,9 \quad \text{Equação 42}$$

14.6.6. ALCALINIDADE A ÁCIDOS VOLÁTEIS (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

Uma vez que na titulação até pH = 4,3 pressupõe-se que apenas 60% do acetato (CH₃COO⁻) está presente sob a forma de ácido acético (CH₃COOH), considera-se que a AAV corresponde a 60% da concentração de AVT:

$$AAV\ (mg\ CaCO_3\ /L) = 0,6 \times AVT \times \frac{50}{60} = 0,5 \times AVT \quad \text{Equação 43}$$

14.6.7. ALCALINIDADE A BICARBONATO (MG/L, EXPRESSA COMO CaCO₃)

$$AB\ (mg\ CaCO_3/L) = AT - AAV \quad \text{Equação 44}$$

Em que:

$V_{pH\ 4 - pH\ 5}$ = Volume da solução de H₂SO₄ gasto para titular do pH 5 ao 4. Em outras palavras, o volume de solução gasto até o pH 4 menos o volume gasto apenas até o pH 5 (mL);

$N_{H_2SO_4}$ = Normalidade da solução de H₂SO₄ (N);

$V_{Amostra}$ = Volume inicial da amostra (mL);

$V_{pH\ 4,3}$ = Volume da solução de H₂SO₄ gasto para titular até o pH 4,3 (mL);

Observação: O preparo e padronização da solução de ácido sulfúrico devem ser efetuados conforme descrito no item 14.3, variando o volume de H_2SO_4 dependendo da normalidade desejada.

14.7. ALCALINIDADE E ÁCIDOS VOLÁTEIS TOTAIS – MÉTODO CONDUTIMÉTRICO

(MORAES et al., 2001)

14.7.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

As determinações de alcalinidades total e parcial realizadas através de métodos potenciométricos ou adaptações propostas por DiLallo e Albertson (1961), Kapp (1984), Ripley, Boyle e Converse (1986), Jenkins et al. (1991), Anderson e Yang (1992), entre outras, quantificam também parte dos ácidos voláteis, uma vez que a substância utilizada na titulação (ácido forte) reage tanto com íons bicarbonato, quanto com ânions dos ácidos orgânicos gerados durante a degradação anaeróbia. Resultados determinados através de métodos titulométricos com ácido forte e cromatográfico são relativamente diferentes.

O fato do ácido carbônico ser diprotonado e o bicarbonato de sódio ser um sal formado pela neutralização de apenas um de seus prótons, confere a natureza anfótera ao íon bicarbonato, a qual é explorada pela metodologia condutimétrica. É importante ressaltar ainda que todos os ácidos orgânicos usados para monitorar os processos anaeróbios são ácidos monopróticos, não geradores de sais anfóteros, cujos ânions não reagem com íons OH^- . Sendo assim, a quantificação da concentração de íons bicarbonato em solução poderá ocorrer pela adição controlada de solução de concentração conhecida de base forte.

A condutividade k é uma medida da habilidade de uma solução aquosa em conduzir corrente elétrica, relacionada com a presença de íons, suas concentrações, valências e mobilidades, bem como com a temperatura da solução. Os valores de Condutância Equivalente (λ^0), em $\text{MHO}\cdot\text{cm}^2/\text{equivalente}$, em água a 25°C , de alguns íons envolvidos na determinação da alcalinidade real de amostras de reatores anaeróbios, são os seguintes: HCO_3^- (44,5); $\frac{1}{2} \text{CO}_3^{2-}$ (72); H_2PO_4^- (33); $\frac{1}{2} \text{HPO}_4^{2-}$ (57); OH^- (198,6).

A adição de solução de NaOH em amostras, transformando íons HCO_3^- em CO_3^{2-} , íons H_2PO_4^- e HPO_4^{2-} em PO_4^{3-} , entre outros, e, posteriormente, em excesso, é responsável pela variação da condutividade da solução, tornando possível sua quantificação.

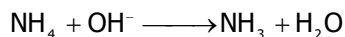
A quantificação de alcalinidade total, por meio da titulação com solução padronizada de H_2SO_4 , sinalizada por medidas de condutividade elétrica da solução, permite determinações mais exatas de pontos finais, independentes de pH pré-estabelecidos, que não devem ser coincidentes, para diferentes amostras, e que dificilmente são realmente atingidos no final da titulação.

O método baseia-se, então, no acompanhamento da condutividade elétrica de duas amostras durante a adição de solução padronizada de hidróxido de sódio (alcalinidade parcial ou a bicarbonato) ou de ácido sulfúrico (alcalinidade total).

O método proposto pode fornecer valores muito mais próximos de alcalinidade real de reatores anaeróbios do que os métodos que utilizam titulações com ácidos fortes. Através desta metodologia, titulam-se também outras espécies geradores de alcalinidade, como íons HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , silicatos, HS^- , S^{2-} , presentes em águas residuárias. Além destes, o íon amônio, quando presente, também será titulado, antes mesmo do íon bicarbonato, gerando uma reta com inclinação específica, que pode ser usada para quantificá-lo.

Uma reação que poderia interferir, quando uma base forte é usada como titulante, seria a reação com o $\text{CO}_2(g)$ presente na amostra. Porém, o $\text{CO}_2(g)$ pode ser eliminado, não por aquecimento, pois a concentração do íon HCO_3^- também seria afetada, mas em banho ultrassônico que, aplicado à amostra, expulsa os gases nela dissolvidos.

Íons NH_4^+ , se presentes, interferem positivamente no resultado, gerando uma reta específica para a reação:

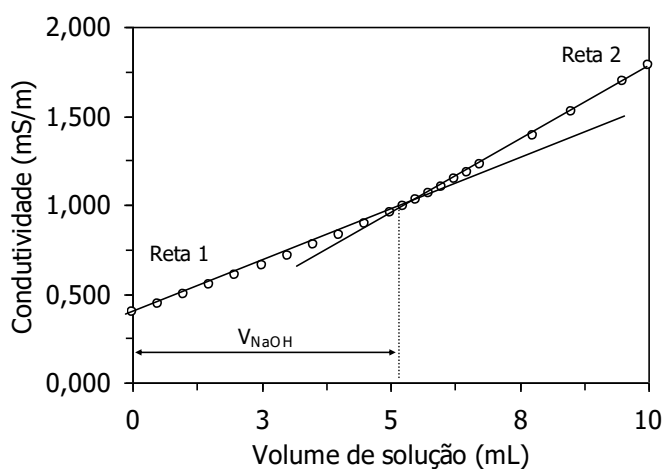


Equação 45

a qual precede a formação de carbonato, permitindo, em uma mesma titulação, as determinações de N-amoniacoal e de alcalinidade devida a bicarbonato.

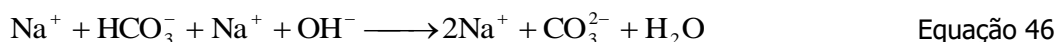
A Figura 5 ilustra o comportamento da condutividade corrigida de amostra durante a adição da solução de hidróxido de sódio, observado durante a titulação de amostra em ausência de íons amônio. Observa-se claramente que a curva da condutividade elétrica apresenta duas inclinações distintas, representadas, então, separadamente através de duas retas independentes.

Figura 5: Variação da condutividade corrigida da amostra contendo bicarbonato, durante adição de solução de NaOH.



Fonte: Moraes et al. (2001).

A **Reta 1** representa a variação da condutividade elétrica da amostra, obtida, principalmente, pela reação entre os íons HCO_3^- e OH^- , representada pela seguinte reação:



Equação 46

A **Reta 2** representa a variação da condutividade elétrica da solução da amostra, em presença de excesso crescente dos íons Na^+ e OH^- .

Igualando-se as duas equações das retas, determina-se o ponto onde ocorre a mudança de inclinação, ou seja, onde as duas retas se encontram, representando o volume da solução de hidróxido de sódio necessário para reagir com todo o bicarbonato presente no meio.

Assim, a partir do volume e da concentração molar da solução de hidróxido de sódio e volume de amostra, determina-se a alcalinidade real devida ao bicarbonato a partir da Equação 47.

$$\text{mgHCO}_3^- = 61.000 \times \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}}}{V_{\text{Amostra}}}$$

Equação 47

Na qual:

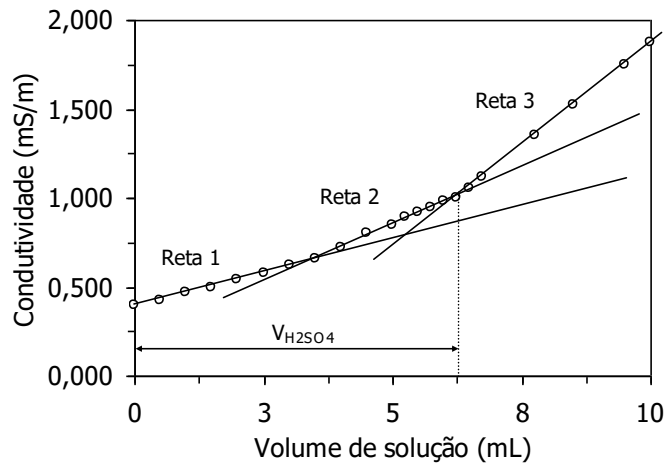
V_{NaOH} = Volume gasto para atingir o ponto final de titulação (mL).

M_{NaOH} = Concentração molar da solução (M).

V_{Amostra} = Volume inicial da amostra (mL).

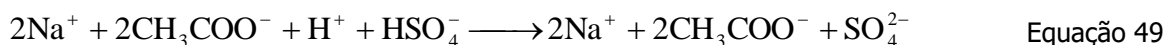
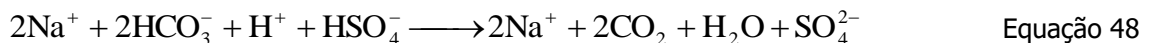
Para a determinação da alcalinidade total, realiza-se procedimento idêntico ao anterior, utilizando-se, entretanto, solução padronizada de ácido sulfúrico. Durante a adição da solução de ácido sulfúrico, a condutividade corrigida da amostra pode apresentar o comportamento mostrado na Figura 6.

Figura 6: Variação da condutividade corrigida da amostra durante adição de solução de H_2SO_4 .



Fonte: Moraes et al. (2001).

Os dois trechos iniciais na curva de calibração estão relacionados às reações do ácido sulfúrico com: bicarbonato de sódio (Reta 1) e acetato de sódio (Reta 2), de acordo com as seguintes reações:



Assim, o volume de solução de ácido sulfúrico que reagiu com todo bicarbonato e acetato presentes é representado pelo encontro das Retas 2 e 3, esta última, gerada pelo excesso de H_2SO_4 adicionado à amostra. Deve-se salientar que, na ausência de bicarbonato ou acetato, a curva de condutividade pode apresentar comportamento semelhante ao da Figura 5. Nessa condição, o volume de ácido sulfúrico é determinado pelo encontro das Retas 1 e 2, como citado anteriormente.

A concentração da alcalinidade total, expressa em mg/L de HCO_3^{-1} , é calculada a partir da Equação 50.

$$\text{mg/L alcalinidade total } (\text{HCO}_3^-) = 122.000 \times \frac{V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times M_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 50}$$

Na qual:

$V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = Volume gasto para atingir o ponto final de titulação (mL).

$M_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ = Concentração molar da solução (M).

V_{Amostra} = Volume inicial da amostra (mL).

A diferença entre a alcalinidade a bicarbonato e a alcalinidade total fornece a alcalinidade devida aos ânions de ácidos voláteis.

Para convertê-la em mg/L de acetato, o valor em mg/L de bicarbonato deve ser multiplicado pela razão 59/61 ($\approx 0,967$).

14.7.2. MATERIAL

- Agitador magnético e barra magnética
- Condutímetro
- Medidor de pH (precisão $\pm 0,01$ unidades de pH)
- Banho de ultrassom
- Béquer de 150 mL
- Bureta digital de 10,00 mL ou buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Solução padronizada de Ácido Sulfúrico – H_2SO_4
- Solução padronizada de Hidróxido de Sódio – NaOH

14.7.3. DETERMINAÇÃO DA ALCALINIDADE REAL

A amostra (25,0 mL), contida em béquer, deve ser submetida ao ultrassom durante 10 min. Após este período, titula-se com solução padronizada de NaOH (0,02 M), acompanhando-se a variação da condutividade elétrica. A titulação deve ser processada até garantir várias adições em excesso de solução de hidróxido de sódio. As diluições da amostra, provocadas pelas adições da solução titulante, exigem que sejam feitas correções dos valores de condutividade, a partir da Equação 51.

$$\text{Condutividade}_{\text{CORRIGIDA}} = \text{Condutividade}_{\text{MEDIDA}} \times \frac{V_{\text{Amostra}} + V_{\text{Titulante}}}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 51}$$

Na qual:

V_{Amostra} = Volume inicial da amostra (mL).

$V_{\text{Titulante}}$ = Volume adicionado de titulante (mL).

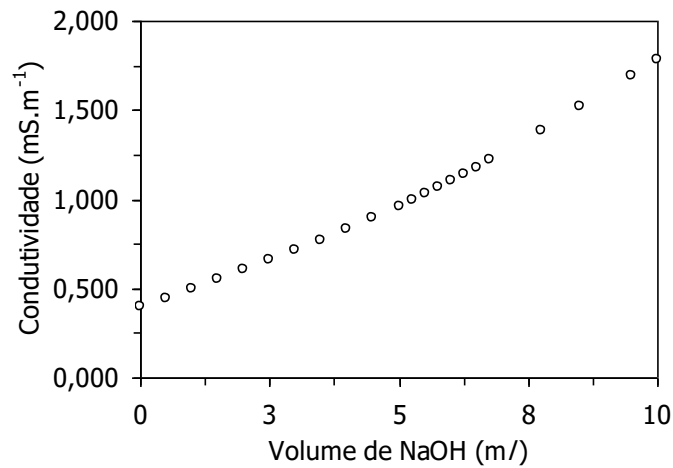
A partir dos valores determinados experimentalmente (por exemplo, Tabela 18), elabora-se um gráfico (Figura 7), lançando-se os volumes adicionados de solução de NaOH, contra os valores corrigidos da condutividade elétrica da amostra.

Tabela 18: Volumes adicionados de NaOH e valores de condutividades medida e corrigida durante titulação de 25,0 mL de amostra de efluente de reator anaeróbio com solução de 0,020 M de NaOH.

Volume de NaOH (mL)	Condutividade medida (mS/cm)	Condutividade corrigida (mS/cm)
0,00	0,400	0,400
0,50	0,436	0,445
1,00	0,480	0,499
1,50	0,520	0,551
2,00	0,558	0,603
2,50	0,598	0,658
3,00	0,636	0,712
3,50	0,676	0,771
4,00	0,715	0,829
4,50	0,756	0,892
5,00	0,797	0,956
5,25	0,819	0,991
5,50	0,842	1,027
5,75	0,865	1,064
6,00	0,888	1,101
6,25	0,913	1,141
6,50	0,936	1,179
6,75	0,962	1,222
7,75	1,059	1,387
8,50	1,133	1,518
9,50	1,227	1,693
10,00	1,274	1,784

Fonte: Moraes et al. (2001).

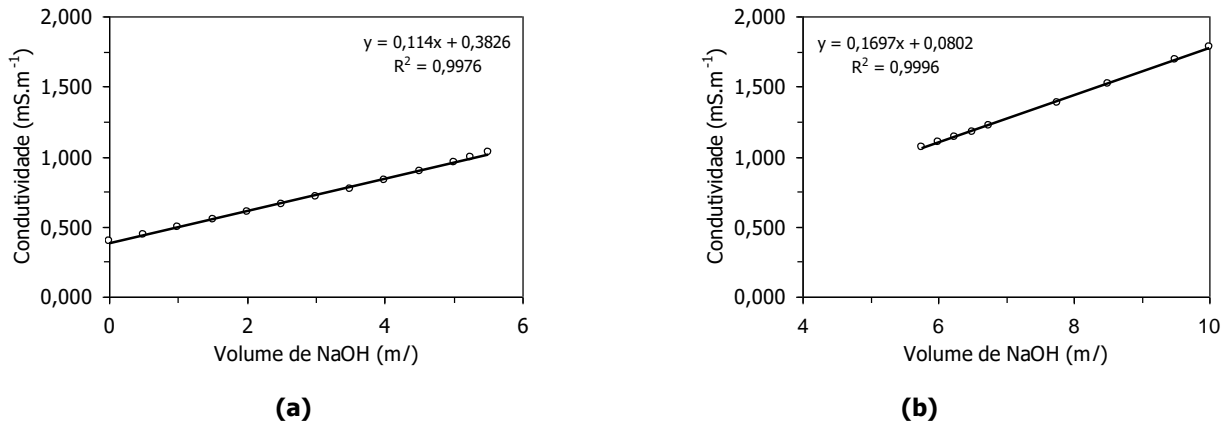
Figura 7. Variação da condutividade corrigida da amostra durante adição de solução de NaOH.



Fonte: Moraes et al. (2001).

Verifica-se, a partir da Figura 7, que duas retas compõem o gráfico. Sendo assim, elaboram-se dois gráficos, considerando-se as duas direções obtidas (Figura 8 (a) e (b)).

Figura 8. Retas obtidas de acordo com as diferentes inclinações observadas na variação da condutividade corrigida da amostra durante a adição de solução de NaOH.



Fonte: Moraes et al. (2001).

Igualando-se as duas equações ($y_1 = 0,114x + 0,3826$ e $y_2 = 0,1697x + 0,0802$), encontramos o ponto de intersecção, valor que indica o volume da solução padronizada de NaOH usado para atingir o ponto final de titulação. Assim, para o exemplo, o volume de NaOH foi de 5,43 mL.

A alcalinidade da solução pode ser determinada a partir da Equação 52.

$$\text{mgHCO}_3^-/\text{L} = 61.000 \times \frac{V_{\text{NaOH}} \times M_{\text{NaOH}}}{V_{\text{Amostra}}} \quad \text{Equação 52}$$

Na qual:

V_{NaOH} = Volume gasto para atingir o ponto final de titulação (mL).

M_{NaOH} = Concentração molar da solução (M).

V_{Amostra} = Volume inicial da amostra (mL).

Assim,

$$\text{mgHCO}_3^-/\text{L} = 61.000 \times \frac{5,43 \times 0,02}{25} = 265 \text{mgHCO}_3^-/\text{L} \quad \text{Equação 53}$$

Para transformar-se a alcalinidade a bicarbonato em alcalinidade a CaCO_3 , deve-se dividir o valor obtido por 1,22.

14.7.4. DETERMINAÇÃO DA ALCALINIDADE TOTAL

A determinação da alcalinidade total é realizada com os mesmos procedimentos realizados no item 14.7.3, utilizando-se solução de ácido sulfúrico. A partir da determinação do volume de ácido sulfúrico gasto para atingir o ponto final de titulação, calcula-se a alcalinidade total a partir da Equação 54.

$$\text{mg/L (HCO}_3^-) = 122.000 \times \frac{V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times M_{\text{H}_2\text{SO}_4}}{V_{\text{amostra}}} \quad \text{Equação 54}$$

Na qual:

$V_{H_2SO_4}$ = Volume gasto para atingir o ponto final de titulação (mL).

$M_{H_2SO_4}$ = Concentração molar da solução (M).

$V_{Amostra}$ = Volume inicial da amostra (mL).

14.7.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS VOLÁTEIS

A partir da alcalinidade real e alcalinidade total, a concentração de ácidos voláteis, expressa como ácido acético, é determinada a partir da Equação 55.

$$\text{mg/L (como HAc)} = 60.000 \times \frac{(V_{H_2SO_4} \times M_{H_2SO_4}) - (V_{NaOH} \times M_{NaOH})}{V_{amostra}} \quad \text{Equação 55}$$

14.7.6. PREPARO E PADRONIZAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO E DE ÁCIDO SULFÚRICO

As soluções utilizadas devem ser preparadas como descrito anteriormente (item 14.3), variando a massa de NaOH ou o volume de H_2SO_4 dependendo da molaridade final desejada.

14.8. ALCALINIDADE A BICARBONATO DE RESERVA

(SPEECE, 1996)

14.8.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Alcalinidade de reserva é definida por Speece (1996) como sendo a concentração de bicarbonato disponível para neutralizar os ácidos voláteis livres restantes no processo. Num processo anaeróbio o operador está muito interessado na alcalinidade de reserva antes que o pH do sistema alcance valores menores que 6,5. Assim, o conceito de alcalinidade de reserva representa o aumento na concentração de ácidos voláteis que pode ser tolerado pelo sistema antes que a queda do valor do pH ocasione a interrupção do processo, pela acidificação do meio. A alcalinidade de reserva indica somente a alcalinidade a bicarbonato, já que a alcalinidade produzida por sais de ácidos orgânicos não promove a neutralização dos ácidos voláteis gerados.

O método proposto por Speece (1996) para determinar a concentração de bicarbonato de reserva consiste na titulação de 50,0 mL da amostra com solução padronizada de ácido acético (5,0 g/L) até o valor mínimo de pH de 6,5. Cada adição de 1,0 mL de ácido acético corresponde ao aumento de 100 mg/L de ácidos voláteis que pode ser tolerado pelo sistema, antes que o pH atinja um valor indesejado. Cada mol de ácido acético titulado gerará um mol de CO₂ a partir da neutralização pela alcalinidade a bicarbonato.

14.8.2. MATERIAL

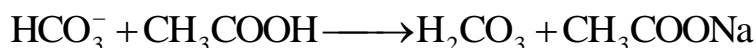
- Agitador magnético e barra magnética
- Bureta digital de 10,00 mL ou buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Medidor de pH (precisão ± 0,01 unidades de pH)
- Béquer de 100 mL
- Ácido Acético glacial – C₂H₃OOH P.A.

14.8.3. PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO ACÉTICO (5 G/L)

- Transferir, com exatidão, 4,96 mL de ácido acético (99,5%; d=106 g/mL; C=1,007 g de ácido acético/mL) para balão volumétrico contendo uma quantia inicial de água deionizada;
- completar o volume para 1.000 mL com água deionizada.

14.8.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA ALCALINIDADE A BICARBONATO DE RESERVA

- Transferir 50 mL de amostra para béquer de 100 mL;
- titular com solução padrão de ácido acético (5 g/L) até atingir pH de 6,5 a 6,2;
- determinar a concentração de bicarbonato na amostra a partir da seguinte reação:



Equação 56

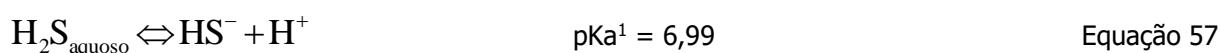
considerando que 61,0 g de bicarbonato reagem com 60,0 g de ácido acético.

14.9. ALCALINIDADE DEVIDA A SULFETO

(GODOI et al., 2017)

14.9.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Em sistemas anaeróbios o sulfeto é originário do processo de redução biológica do sulfato, podendo ser encontrado no efluente final de reatores sob as formas de H₂S aquoso (sulfeto de hidrogênio dissolvido), HS⁻ (íon bissulfeto) e S₂⁻ (íon dissulfeto), além da fração de H₂S gasoso e dos sulfetos metálicos insolúveis. O sulfeto de hidrogênio em solução, por sua vez, se comporta como um ácido fraco, dissociando-se conforme as equações a seguir (Lewis, 2010):



Uma vez que o par H₂S/HS⁻ tem constante de dissociação (pKa¹) próxima de 6,99, o ânion HS⁻, quando presente em concentrações elevadas (caso de reatores sulfetogênicos, por exemplo) poderá ser responsável por uma parcela significativa da alcalinidade total do sistema, devido à sua capacidade de neutralizar o próton H⁺ (Equação 57), gerando H₂S molecular. Já a fração de S₂⁻, por sua vez, pelo alto valor da constante da segunda dissociação (pKa²) do sulfeto, pode ser considerada desprezível na faixa de pH na qual se situam os sistemas de tratamento anaeróbios.

No monitoramento de reatores anaeróbios tratando efluentes ricos em sulfato também é usual proceder à determinação da alcalinidade total do sistema por meio de métodos titulométricos convencionais (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005; RIPLEY; BOYLE; CONVERSE, 1986). Esse resultado, embora útil para expressar a capacidade tampão global do sistema, não leva em conta a parcela devida ao íon bissulfeto (HS⁻), que também é medida como alcalinidade em conjunto com o bicarbonato.

Para a determinação da real contribuição do sulfeto total dissolvido para com a alcalinidade do meio líquido, foram propostos os cálculos apresentados a seguir.

14.9.2. ROTEIRO DE CÁLCULO

14.9.2.1. ESPECIAÇÃO DO SULFETO TOTAL DISSOLVIDO

Partindo da definição da constante de dissociação (K_{pa}¹) do par H₂S/HS⁻ (Equação 59), igualou-se o logaritmo negativo dessa expressão ao pKa¹ (Equação 60). Para resolução do equacionamento foi assumida a simplificação de que pH = - log [H⁺]. A concentração molar de sulfeto total dissolvido [STD], determinada analiticamente, também foi considerada como sendo a soma das concentrações molares de ambas as espécies dissolvidas em questão (Equação 61). Após algumas manipulações algébricas, baseadas nas propriedades matemáticas do logaritmo, chegou-se à Equação 62, a qual permite determinar a parcela de sulfeto dissolvido na forma ionizada.

$$K_{p_{a^1}} = \frac{[HS^-] \times [H^+]}{[H_2S]} \quad \text{Equação 59}$$

$$pK_{a^1} = -\log\left(\frac{[HS^-] \times [H^+]}{[H_2S]}\right) \quad \text{Equação 60}$$

$$[STD] = [HS^-] + [H_2S] \quad \text{Equação 61}$$

$$[HS^-] = \frac{[STD]}{1 + 10^{(pK_{a^1} - pH)}} \quad \text{Equação 62}$$

Onde [STD] é a concentração molar de sulfeto total dissolvido no efluente do reator (mol/L); [HS⁻] é a concentração molar do íon bissulfeto (mol/L); e [H₂S] é a concentração molar de sulfeto de hidrogênio dissolvido (mol/L).

A concentração de sulfeto total dissolvido (STD) no efluente de reatores pode ser determinada por meio das metodologias apresentadas nos itens 20.1 e 20.2.

14.9.2.2. ALCALINIDADE DEVIDA A SULFETO

Considerando que 1 mol do ânion HS⁻ é capaz de neutralizar 1 mol de íons H⁺ para produzir o sulfeto de hidrogênio molecular (H₂S), a concentração molar de HS⁻ (Equação 62) foi utilizada para estimar a alcalinidade devida ao sulfeto total dissolvido (A_{HS-}) no efluente do reator, conforme o cálculo apresentado pela equação a seguir:

$$A_{HS^-} \text{ (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = [HS^-] \times 50.000 \quad \text{Equação 63}$$

Na qual 50.000 é o equivalente-grama (massa molar/valência) do CaCO₃, utilizado como referência nas medidas de alcalinidade; e [HS⁻] é a concentração molar do íon bissulfeto (mol/L).

Já para a determinação da alcalinidade a bicarbonato real do sistema (A_{BIC^{REAL}}), descontam-se as contribuições do íon HS⁻ (A_{HS-}) e dos ácidos voláteis totais (AAV) da alcalinidade total medida, conforme indicado na equação mostrada a seguir:

$$A_{BIC}^{REAL} \text{ (mg CaCO}_3 \text{ /L)} = A_T - AAV - A_{HS^-} \quad \text{Equação 64}$$

Onde qual A_T é a alcalinidade total no efluente do reator (mgCaCO₃.L⁻¹) medida por titulação ácida até pH = 4,30; AAV é a alcalinidade devida aos ácidos voláteis totais (mgCaCO₃.L⁻¹); e A_{HS-} é a alcalinidade a sulfeto estimada pela Equação 63 (mgCaCO₃.L⁻¹).

As alcalinidades total (A_T), parcial (A_P), intermediária (A_I) e devida a ácidos voláteis totais (AAV), por sua vez, são determinadas de acordo com os procedimentos habituais, propostos por Ripley, Boyle e Converse (1986) e Dilallo e Albertson (1961), conforme apresentado nos itens 14.4 e 14.5 deste manual.

15. COR – MÉTODO DO REGISTRO DO ESPECTRO

(WU; EITEMAN; LAW, 1998)

15.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A cor em corpos d'água pode ser o resultado tanto de fenômenos naturais, tais como a presença de substâncias húmicas, íons metálicos e plâncton, quanto ser causada artificialmente pela descarga de corantes e pigmentos presentes nos despejos de efluentes de indústrias têxteis, químicas ou farmacêuticas, por exemplo (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Em geral, a cor na água é classificada em termos de cor verdadeira, quando a amostra apresenta cor livre de turbidez, ou aparente, quando a cor da amostra é medida sem tratamento prévio para remoção do material em suspensão (filtração ou centrifugação) (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Os métodos mais comuns para determinação da cor em amostras aquosas consistem na comparação visual ou na medição espectrofotométrica, a qual pode ser efetuada em um único comprimento de onda, na associação de medidas obtidas em vários comprimentos diferentes, ou ainda na varredura de uma faixa de absorção (BISSCHOPS; SPANJERS, 2003), faltando, no entanto, um método universal para classificação de cor em águas residuárias.

Por comparação visual, a cor é quantificada pela comparação da amostra com as concentrações conhecidas de padrões coloridos (normalmente uma solução de platina-cobalto) ou com discos de cor adequadamente calibrados (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Este método é utilizado frequentemente em estações de tratamento de água como um parâmetro de controle, especialmente devido à sua simplicidade, mas não é aplicável para águas residuárias complexas, principalmente se tratando de efluentes industriais com elevados índices de cor (SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007).

O método colorimétrico de registro do espectro, por sua vez, é uma das alternativas ao procedimento convencional, consistindo no registro do espectro da amostra na faixa de comprimentos de ondas da luz visível (de 400 a 700 nm) ou dentro de uma faixa específica (BISSCHOPS; SPANJERS, 2003; SANTOS; CERVANTES; VAN LIER, 2007). A área sob a curva das absorbâncias é integrada e pode ser utilizada para fins de comparação, desde que a medição das amostras em questão tenha sido efetuada para um mesmo valor de pH. A cor obtida por registro do espectro, por sua vez, é dada em unidades de absorbância integrada (*Integrated Absorbance Units - IAU*), conforme Wu, Eiteman e Law (1998).

15.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,22 µm de poro
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Espectrofotômetro com saída de dados
- Medidor de pH de bancada (pHmetro)
- Balão volumétrico de 1.000 mL
- Béquer de 100 mL
- Pipeta de vidro graduada de 10,0 mL
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas
- Cubeta de vidro com passo ótico de 1 cm
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A.

- Fosfato de Sódio monobásico – NaH_2PO_4 P.A.
- Fosfato de Sódio bibásico – Na_2HPO_4 P.A.

15.1. PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AJUSTE DO PH DA AMOSTRA

ATENÇÃO: *Sempre manusear e efetuar a dissolução de ácidos concentrados e hidróxidos na capela, sob exaustão, usando jalecos, luvas nitrílicas e óculos de segurança.*

(a) **Solução de HCl 0,1 M:** Com pipeta de vidro graduada, transferir 8,4 mL de HCl concentrado para béquer de vidro de 100 mL contendo cerca de 80 mL de água deionizada. Após esfriar, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar com água deionizada;

(b) **Solução de NaOH 0,1 M:** Em béquer de 100 mL contendo cerca de 80 mL de água deionizada, dissolver totalmente 4,0 g de NaOH. Após esfriar, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL, completando com água deionizada;

(c) **Solução tampão fosfato (pH 6,40):** Pesar 10,86 g de fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) e 5,98 g de fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4) e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água deionizada e agitando até a dissolução completa dos reagentes. Ajustar o pH da solução por dosagem das soluções de HCl ou NaOH, se necessário.

15.2. PRÉ-TRATAMENTO DA AMOSTRA

15.2.1. REMOÇÃO DE TURBIDEZ

A turbidez da amostra é um interferente na leitura da cor verdadeira sendo removida previamente por filtração da amostra em membrana de 0,22 μm .

15.2.2. DILUIÇÃO DA AMOSTRA

A Lei de Lambert-Beer estabelece uma relação entre a absorvância de uma amostra e a concentração da substância absorvente. Entretanto, esta relação não é linear para altas concentrações. Considera-se que é apropriado diluir uma amostra de maneira tal que a sua absorvância nos comprimentos de onda (λ) utilizados não exceda o valor de 1,000. O fator de diluição f deve ser utilizado para corrigir a absorvância final da amostra, sendo f a razão entre o volume final (V_{FINAL}) da amostra diluída sobre o volume inicial ($V_{INICIAL}$) da amostra concentrada utilizada ($f = V_{FINAL} / V_{INICIAL}$).

15.2.3. AJUSTE DO PH

A absorvância de uma amostra num determinado valor de λ é dependente do pH. Deste modo, deve-se padronizar um valor de pH previamente à medição no espectrofotômetro. Um recurso adequado seria diluir a amostra em solução tampão fosfato com o pH desejado. A experiência prática do LPB recomenda a utilização de uma solução tampão fosfato com pH final de 6,40.

15.3. PROCEDIMENTO PARA LEITURA DAS AMOSTRAS

- (a) Filtrar 2 mL de amostra em filtro de 0,22 μm ;
- (b) diluir a amostra em tampão fosfato pH 6,4 utilizando um fator de diluição f adequado;

- (c) aferir o pH final da amostra, corrigindo-o com algumas gotas das soluções de NaOH ou HCl (0,1 M) se necessário. Caso o volume da amostra for alterado em valor superior a 10%, deve-se considerar este valor como acréscimo do fator de diluição f ;
- (d) transferir a amostra para cubeta de vidro com caminho ótico de 1 cm;
- (e) zerar o espectrofotômetro com água deionizada e utilizar a função **varredura** (*scan*) para registrar a absorbância da amostra no intervalo de 400 a 700 nm (espectro visível);
- (f) calcular a área da curva sob o espectro visível;
- (g) multiplicar o valor encontrado pelo fator de diluição f utilizado. O valor obtido, em unidades de absorbância integrada (IAU), representa a cor da amostra.

Observação: *As amostras podem ser armazenadas após filtração por até 24 h em refrigerador à temperatura de 4°C previamente à análise.*

VI. **MACRO-NUTRIENTES E COMPOSTOS RELACIONADOS**⁴

- 16** Nitrogênio Orgânico e Amoniacal
- 17** Nitrito – Método da Sulfanilamida (Espectrofotométrico)
- 18** Nitrato – Métodos Espectrofotométricos
- 19** Sulfato – Métodos Turbidimétricos
- 20** Sulfeto
- 21** Enxofre Elementar – Método Turbidimétrico
- 22** Fósforo – Método do Ácido Ascórbico (Espectrofotométrico)



⁴ As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

16. NITROGÊNIO ORGÂNICO E AMONIAL

16.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

NITROGÊNIO AMONIAL

A amônia representa parte da matéria nitrogenada inorgânica geralmente presente em águas superficiais e residuárias. Nas estações de tratamento, por exemplo, a amônia encontra-se presente no esgoto afluente, pois já no sistema de coleta e interceptação, as reações de hidrólise e amonificação têm início (desaminação de compostos contendo nitrogênio orgânico e pela hidrólise da ureia). A amônia é utilizada por bactérias heterotróficas e autotróficas.

Os principais fatores que influenciam na seleção de um método para a quantificação da amônia são: a sua concentração na amostra e a presença de interferentes na análise. Quando interferências estão presentes ou uma maior precisão é necessária, uma etapa preliminar de destilação é requerida.

A determinação de amônia por método *titulométrico* (item 16.2.11), o qual sempre exige uma etapa prévia de destilação, é aplicável para amostras contendo concentrações maiores que 5 mg N-NH₄⁺/L.

O método *espectrofotométrico* do fenol-hipoclorito (item 16.3) é mais aplicável para águas limpas que apresentam concentrações menores que 5 mg N-NH₄⁺/L. Amostras mais contaminadas, todavia, também podem ser previamente destiladas para a remoção dos interferentes e então submetidas ao teste colorimétrico.

NITROGÊNIO ORGÂNICO

O nitrogênio orgânico inclui tanto os materiais naturais, como proteínas, peptídeos, ácidos nucléicos e ureia, assim como numerosos materiais orgânicos sintéticos. Concentrações típicas de nitrogênio orgânico variam de 100 µg/L, em alguns lagos oligotróficos, a 20 mg/L em águas naturais.

Para determinação da concentração de compostos orgânicos de nitrogênio, os seguintes procedimentos podem ser empregados:

- conversão do nitrogênio orgânico a nitrogênio amoniacal seguido de destilação da amostra e determinação titulométrica de nitrogênio amoniacal (*método Kjeldahl – itens (b) e 16.2.11*);
- conversão do nitrogênio orgânico a nitrogênio amoniacal seguido de destilação da amostra (*método Kjeldahl – itens (b) e 16.2.11*) e método espectrofotométrico para determinação de nitrogênio amoniacal (*método do fenol-hipoclorito – item 16.3*);
- ou ainda conversão do nitrogênio orgânico e amoniacal para a forma de nitrato (*pelo método da digestão simultânea com persulfato – item 22.4*), seguido de análise espectrofotométrica de nitrato (*método da absorção ultravioleta – item 18.1; método do ácido cromotrópico – item 18.2; ou método da redução por cádmio seguido da determinação do nitrito total formado – item 18.3*). Vale ressaltar que a determinação de N-total na forma de nitrato, em amostra cuja matéria orgânica foi digerida, é facilmente realizada conforme a metodologia descrita no item 18.1, a qual consiste em leitura da amostra em espectrofotômetro a 220 nm, em cubeta de quartzo (GROSS; BOYD; SEO, 1999). A interferência da matéria orgânica, se persistir, é eliminada por leitura a 275 nm, comprimento de onda não absorvido pelo nitrato.

16.2. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL KJELDAHL (NTK) E NITROGÊNIO AMONIACAL – MÉTODO TITULOMÉTRICO

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

Analicamente, nitrogênio orgânico e amônia podem ser determinados juntos e têm sido referidos como “nitrogênio total Kjeldahl” (NTK), um termo que reflete a técnica utilizada em sua determinação. O processo Kjeldahl é muito usado por ser uma técnica bastante confiável e com rotinas bem estabelecidas. O método é baseado na digestão da amostra por ácido sulfúrico concentrado em presença de um catalisador, a fim de converter o nitrogênio orgânico em íon amônio. Após alcalinização da mistura, a amônia é destilada e recebida em solução de ácido bórico e titulada por solução padronizada de ácido (VOGEL, 1989). Para a determinação do nitrogênio amoniacal, a etapa de digestão deve ser eliminada. Assim, o nitrogênio orgânico poderá ser determinado pela diferença entre o nitrogênio total Kjeldahl (obtido após as etapas de digestão, destilação e titulação) e o nitrogênio amoniacal (obtido após as etapas de destilação e titulação).

Tal método prevê a adoção de agente catalisador para a etapa de digestão. O mercúrio foi o primeiro composto a ser testado como catalisador da digestão da amostra para determinação de nitrogênio total. Entretanto, devido à elevada toxicidade, outros compostos foram testados. Sulfato de cobre e óxido de selênio apresentaram resultados semelhantes aos do mercúrio e, considerando as toxicidades e os custos dos reagentes, o primeiro foi proposto como catalisador da digestão. O sulfato de potássio é utilizado para aumentar a temperatura de ebulição da solução e o sulfato de cobre atua como catalisador da reação.

Algumas interferências ao método titulométrico de determinação do NTK são:

- *Nitrato*: Durante a digestão, nitrato em concentração superior a 10 mg/L pode oxidar uma porção da amônia liberada durante a digestão do nitrogênio orgânico, produzindo N_2O e resultando em interferência negativa. Por outro lado, se uma quantidade suficiente de matéria orgânica em baixo estado de oxidação estiver presente, nitrato pode ser reduzido a amônia, resultando em uma interferência positiva. As condições sob as quais essas interferências ocorrem de forma significativa não estão bem definidas e não são conhecidas maneiras de eliminá-las previamente à aplicação do método aqui descrito;
- *Sais e sólidos inorgânicos*: O ácido e os sais utilizados na digestão geram “temperaturas de digestão” que variam entre 360°C e 370°C. Se a amostra contiver uma grande quantidade de sais ou sólidos orgânicos que se dissolverão durante a digestão, a temperatura poderá ser superior a 400°C, com perda pirolítica de nitrogênio. Para prevenir um elevado aumento da “temperatura de digestão”, deve-se adicionar mais H_2SO_4 . Entretanto, um excesso de ácido poderá abaixar a temperatura para menos de 360°C, impedindo a completa digestão da matéria nitrogenada. Para contornar esse problema, a recomendação do *Standard Methods* é a de adicionar 1 mL de H_2SO_4 / g de sal na amostra. Lembrar de adicionar a mesma dosagem extra de ácido sulfúrico ao teste em branco;
- *Matéria orgânica*: Durante a digestão, H_2SO_4 oxida matéria orgânica a CO_2 e H_2O . Se uma grande quantidade de matéria orgânica estiver presente, uma grande quantidade de ácido será consumida e a temperatura de digestão aumentará, causando a perda pirolítica do nitrogênio, como no caso anterior. Para evitar esse problema, acrescentar 3,3 mL de H_2SO_4 / g DQO na amostra. Adicionar ao branco a mesma dosagem extra de ácido sulfúrico que a amostra;

- *Outros:* A determinação de nitrogênio amoniacal pode sofrer influência de glicina, ureia, ácido glutâmico, cianatos e acetamida, que hidrolisam-se muito lentamente. Desses compostos, 7% de ureia e 5% de cianatos são hidrolisados durante a etapa de destilação, em pH de 9,5. Compostos alcalinos voláteis, tais como hidrazina e aminas, influenciam nos resultados. Cloro residual, caso presente, reage com a amônia, devendo ser removido conforme indicado no item 16.2.1.

16.2.1. ARMAZENAMENTO DE AMOSTRA PARA NTK E NITROGÊNIO AMONIAICAL

O ideal é realizar a análise com amostras frescas. Mas nos casos em que isso não é possível, deve-se fazer a correta preservação das amostras, procedimento que varia de acordo com o tempo em que elas devem ser preservadas até sua análise:

- Análise em até 24h: refrigerar a amostra em 4°C. Não é necessário acidificá-la;
- Análise em até 28 dias: congelar amostra ou acidificá-la com H₂SO₄ (de maneira que o pH final seja da ordem de 1,5 - 2,0) e refrigerá-la a 4°C. Para tanto, adicionar 3-4 gotas de H₂SO₄ a um volume de 25 mL e refrigerar a 4°C.
- Cloro residual, caso presente, reage com a amônia, devendo ser removido imediatamente após a coleta da amostra por meio da dosagem de solução de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃.5H₂O – 3,5 g/L). 1 mL dessa solução é suficiente para remover 1 mg/L de cloro residual em 500 mL da amostra.

16.2.2. MATERIAL

- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Balança semi-analítica (precisão ± 0,01 g)
- Digestor para análise de nitrogênio (*FoodALYT IR 1200P, Omnilab*)
- Destilador automático (*FoodALYT D 5000, Omnilab*)
- Titulador automático acoplado ao destilador (*TitroLine 5000, Omnilab*)
- Exaustor/neutralizador (*Scrubber*) para os gases da digestão (*FoodALYT Pump, Omnilab*)
- Resfriador (*Chiller MC Lauda 1200*)
- Tubos de vidro (tipo borossilicato) com fundo cônico (tubos de digestão/destilação) com tampa em teflon (tubos de digestão/destilação)
- Pérolas de vidro
- Agitador magnético e barra magnética
- Medidor de pH (precisão ± 0,01)
- Bureta digital de 10,00 mL ou buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Balões volumétricos de 1.000 e 2.000 mL
- Provetas de vidro graduadas de 20, 50, 150 e 1.000 mL
- Pipeta de vidro graduada de 1,0 mL
- Micropipeta de 10,0 mL
- Erlenmeyers de 125 e 250 mL
- Béquer de vidro de 1.000 mL
- Béquer de plástico de 2.000 mL
- Espátula de plástico
- Bacia plástica para banho de gelo
- Ácido Sulfúrico concentrado – H₂SO₄ P.A.

- Ácido Clorídrico concentrado – HCl 37% P.A.
- Ácido Bórico – H₃BO₃ P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A. (em lentilhas)
- Tiosulfato de Sódio – Na₂S₂O₃·5.H₂O
- Sulfato de Potássio – K₂SO₄ P.A.
- Sulfato de Cobre – CuSO₄ P.A.
- Tetraborato de sódio decahidratado – Na₂B₄O₇·10H₂O (Bórax) P.A.
- Etanol 96% – C₂H₅OH P.A.
- Azul de Bromotimol – C₂₇H₂₈Br₂O₅S P.A.
- Azul de Metileno – C₁₆H₁₈ClN₃S P.A.
- Vermelho de Metila – C₁₅H₁₅N₃O₂ P.A.
- Solução de acondicionamento – KCl 3 M
- Soluções tampão para calibração de pHmetro

16.2.3. PREPARO E PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO (H₂SO₄) 0,01 M (0,02 N)

Solução de H₂SO₄ 0,01 M = 0,02 N (Normalidade = K x Molaridade)

K = 2 (número de íons H⁺ ionizáveis)

Massa molecular H₂SO₄ = 98 g/mol

d (densidade) = 1,84 kg/L = 1,84 g/mL

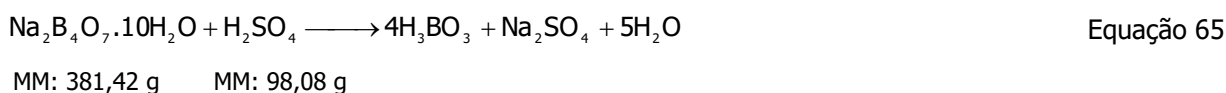
Porcentagem de H₂SO₄ no reagente concentrado = 97,5%

1 mL do reagente concentrado corresponde a 1,84 x 0,975 = 1,794 g de H₂SO₄

Portanto, C = 0,01 mol/L x 98 g/mol = 0,98 g/L, equivalentes a 0,546 mL do reagente concentrado.

Logo, para preparar 1 litro de solução H₂SO₄ 0,01 M adicionar **com cuidado** 0,55 mL de H₂SO₄ P.A. (usando pipeta de vidro) em cerca de 100 mL água deionizada e, após o resfriamento, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido e realizar esse procedimento com cuidado!

A padronização da solução de H₂SO₄ deve ser feita utilizando-se o padrão primário tetraborato de sódio decahidratado (bórax), Na₂B₄O₇·10H₂O, através da seguinte reação:



O bórax deve ser armazenado em dessecador a vácuo com sílica anidra, e não na estufa, para evitar a desidratação da molécula. A padronização deve ser feita em triplicatas, com massas conhecidas do padrão em torno de **0,1000 g** (anotar a massa exata). Dissolver completamente o reagente com cerca de 50 mL de água deionizada em frascos de erlenmeyer de 125 mL. Cerca de 3 a 5 gotas de solução de Azul de Bromotimol são usadas como indicador de ponto final. Com auxílio de uma bureta, titular com a solução de H₂SO₄ ~ 0,01 M, anotando o volume requerido para a viragem da coloração.

A solução indicadora de Azul de Bromotimol é preparada dissolvendo-se 100 mg de Azul de Bromotimol P.A. (C₂₇H₂₈Br₂O₅S) em 20 mL de álcool etílico 96% quente. Após o resfriamento, diluir a solução com água deionizada até 100 mL em balão volumétrico. Conservar em frasco âmbar, ao abrigo da luz.

Quando o indicador utilizado for o Azul de Bromotimol, tem-se uma solução azul para a região básica e amarela no ponto final. Por fim, calcular a molaridade da solução pela Equação 66 (considerar a média das triplicatas):

$$M_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{\text{massa Bórax (g)} \times 1000}{\text{volume H}_2\text{SO}_4 \text{ (mL)} \times 381,42} \quad \text{Equação 66}$$

16.2.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE NaOH+TIOSSULFATO EM FRASCO DE PLÁSTICO

ATENÇÃO: *A dissolução do NaOH em água é extremamente exotérmica! Trabalhar em capela, sob exaustão, e usar jaleco, luvas nitrílicas e óculos de segurança! **Cuidado!***

- (a) Em balança semi-analítica, pesar 1 kg de hidróxido de sódio (NaOH);
- (b) com auxílio de uma espátula de plástico, ir dissolvendo a massa do NaOH em béquer de plástico de 2.000 mL contendo 1.500 mL de água deionizada. Adicionar o reagente aos poucos e manter o recipiente dentro de um banho de gelo (fazer a reposição constante desse gelo);
- (c) após terminar de adicionar o NaOH, pesar 50 g de tiossulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e adicionar à solução de NaOH;
- (d) homogeneizar a solução com auxílio da espátula de plástico até a dissolução completa dos reagentes;
- (e) aguardar a solução esfriar e transferir com cuidado para o galão de armazenamento de plástico localizado na sala do nitrogênio;
- (f) manter no frasco devidamente tampado e identificado.

Observação: *Recomenda-se o preparo prévio dessa solução (ao menos 1 dia de antecedência).*

16.2.5. PREPARO DA SOLUÇÃO DIGESTORA

- (a) Em balança semi-analítica, pesar 134 g de sulfato de potássio (K_2SO_4) e 7,3 g de sulfato de cobre (CuSO_4);
- (b) transferir 800 mL de água deionizada para béquer de vidro de 1.000 mL e colocar em agitação magnética vigorosa;
- (c) ir adicionando aos poucos os reagentes até a dissolução completa;
- (d) na sequência, com auxílio de proveta de vidro graduada, adicionar **devagar e cuidadosamente** 134 mL de H_2SO_4 concentrado. Utilizar luvas, óculos de segurança e realizar esse procedimento na capela, sob exaustão;
- (e) aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água deionizada e homogeneizando por inversões sucessivas;
- (f) armazenar à temperatura ambiente, em frasco de vidro devidamente identificado.

16.2.6. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ABSORÇÃO – ÁCIDO BÓRICO 2%

Dissolver 40 g de ácido bórico (H_3BO_3) em balão volumétrico de 2.000 mL com água deionizada.

Observação: Caso seja utilizada a metodologia colorimétrica (Método do Fenol-Hipoclorito – item 16.3) para determinação do nitrogênio amoniacal em amostras destiladas, substituir a solução de absorção de ácido bórico por uma solução de ácido sulfúrico 0,02 M (Diluir 1 mL de H₂SO₄ concentrado para 1.000 mL com água deionizada).

16.2.7. PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO BORATO

- (a) Em balança analítica, pesar 0,352 g de NaOH e dissolver em 500 mL de água deionizada;
- (b) adicionar 4,75 g de tetraborato de sódio (bórax: Na₂B₄O₇.10H₂O) e homogeneizar a solução;
- (c) transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada.

16.2.8. PREPARO DA SOLUÇÃO DE NaOH 15% DO LAVADOR DE GASES

- (a) Em balança semi-analítica, pesar 150 g de hidróxido de sódio (NaOH);
- (b) transferir para béquer de plástico de 2.000 mL e dissolver, **cuidadosamente**, em 2.000 mL de água deionizada. Utilizar luvas, óculos de segurança e realizar esse procedimento na capela, sob exaustão;
- (c) adicionar algumas gotas de solução indicadora azul de bromotimol até colocação azul intensa;
- (d) trocar essa solução sempre que a coloração mudar de azul para amarela, indicando a queda do pH e a perda da capacidade de retenção dos gases produzidos na digestão das amostras.

16.2.9. PREPARO DA SOLUÇÃO DE LIMPEZA (HCl 20%)

- (a) **Na capela, sob exaustão**, e trabalhando com luvas, jaleco e óculos de proteção, adicionar, em béquer de vidro, **devagar e cuidadosamente**, 540 mL de ácido clorídrico concentrado (37%) para cada 460 mL de água deionizada (ou seja, 540 mL de HCl são necessários para 1 L de solução final);
- (b) homogeneizar, aguardar o resfriamento da solução e transferir para o frasco de armazenamento.

16.2.10. DIGESTÃO DE AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL KJELDAHL (NTK)

O digestor do LPB (*FoodALYT IR 1200P, Omnilab*) tem espaço para efetuar a digestão simultânea de 12 amostras. Logo, é possível digerir 1 branco mais 11 amostras por vez. O branco é preparado com água deionizada no lugar da amostra, devendo ser sempre submetido aos mesmos procedimentos de digestão, destilação e titulação em conjunto com as amostras analisadas.

Deve-se levar em conta também que o volume de amostra a ser digerida é função da concentração de NTK esperado, conforme indicado na Tabela 19.

Tabela 19: Volume de amostra recomendado para a digestão de acordo com a faixa de NTK da amostra.

Concentração estimada de NTK na amostra (mg/L)	Volume de amostra para digestão (mL)
< 2	500*
2-5	250*
5-10	100
10-25	50
25-50	25
50-100	15

*Digerir várias alíquotas (volume máximo de 100 mL) da mesma amostra e misturar os resíduos da digestão antes de destilar. Submeter o destilado ao teste colorimétrico do fenol-hipoclorito (item 16.3) ao invés da titulação, recolhendo o destilado em solução de ácido sulfúrico 0.02 M.

Fonte: Adaptado de: American Public Health Association (2005)

Uma vez que o volume máximo de amostra nos tubos de digestão do equipamento utilizado no LPB é de 100 mL, para a determinação de concentrações muito baixas de NTK (< 5,0 mg/L) uma alternativa é efetuar a digestão de mais alíquotas da mesma amostra em tubos diferentes. Após a digestão, transferir todas essas alíquotas para um mesmo tubo, repassando com água deionizada sucessivas vezes e recolhendo o digerido no tubo que será submetido à destilação (evitar ultrapassar o volume final de 100 mL). Recomenda-se, nesse caso, que o teor de amônia no destilado seja determinado pelo método colorimétrico do fenol-hipoclorito (item 16.3) ao invés de recorrer ao método titulométrico. Lembrar de corrigir o resultado final da análise pelo fator de concentração empregado.

Amostras com concentração superior a 100 mg N-NTK/L, por sua vez, devem ser previamente diluídas com água deionizada.

- Adicionar aos tubos do digestor de nitrogênio: O volume adequado da amostra em questão (Tabela 19), 20 mL da solução digestora, uma espátula de pérolas de vidro e homogeneizar;
- Preparar o branco com mesmo volume de água deionizada no lugar da amostra, 20 mL da solução digestora, uma espátula de pérolas de vidro e homogeneizar;
- Verificar possíveis vazamentos;
- **Ligar a exaustão:** Certificar-se de que os tubos estão corretamente conectados às tampas;
- **Ligar o Chiller, o qual resfria os vapores no lavador de gás:** Verificar o volume de água que deve estar na metade do nível e a pressão em 1 bar;
- **Ligar o lavador de gases (Scrubber):** Verificar o nível da solução de NaOH 15% no compartimento do lavador de gases (manter sempre no nível máximo). A solução deve estar **azul (alcalina)**. Assim que a coloração da solução se tornar amarelada (ácida), a mesma deverá ser substituída;
- **Ligar o Digestor:** O digestor deve estar programado para duas etapas, 30 min em 100% da potência e 60 min a 80%;
- Após a digestão, aguardar o resfriamento natural dos tubos até a temperatura ambiente, mantendo as tampas conectadas. **ATENÇÃO: A exaustão, o lavador de gases e o Chiller só poderão ser desligados apenas quando os tubos já tiverem atingido a temperatura ambiente!**

16.2.11. DESTILAÇÃO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO TITULOMÉTRICA DE NTK E N-AMONICAL

- Ligar, nesta sequência: o *Chiller* (verificar o nível e a pressão), o titulador automático (aguardar que inicie o programa de titulação "FoodAlyt") e, em seguida, o destilador (aguardar o aquecimento da caldeira e o aparecimento da tela com a programação de início);
- Calibrar o eletrodo de pH do titulador automático antes de iniciar o procedimento de destilação usando as soluções tampão de pH 4,00 e 7,00;
- Após o término da operação, não se esquecer de lavar o eletrodo de pH e colocá-lo novamente no tubo contendo a solução de acondicionamento (KCl 3 M – preparo conforme item 12.3);
- Verificar os níveis das soluções de NaOH+Tiosulfato e ácido bórico (solução de absorção), o nível de água deionizada e o nível do descarte nos galões armazenados dentro do armário instalado embaixo do equipamento;
- Medir o valor do pH da solução de absorção (ácido bórico) para ser utilizado como ponto final da titulação. Esse valor deverá ser fixado na programação do equipamento (*SetPoint*);
- **Programação do Destilador:** O destilador deve ser programado conforme os parâmetros descritos na Tabela 20:

Tabela 20: Parâmetros de programação do destilador.

Parâmetros	Valores
Dil. H2O	6 s (amostras digeridas - NTK)
	1,5 s (não digeridas - NH ₃)
NaOH	1,8 s (amostras digeridas - NTK)
	0,8 s (não digeridas - NH ₃)
Dist.Time	360 s
Reac.time	0 s
Power	80%
DrainSample	0 s
AutoEndPt	OFF
DrainTitr	30 s
H3BO3	7 s
SetPoint	~ 4,4*
Meas. Time	10 s
Stirring	50%

*Medir o pH da solução de absorção e inserir o valor no programa antes de iniciar a destilação das amostras. O pH do ácido bórico deve ser da ordem de 4,4

Fonte: Adaptado de Omnilab (2009).

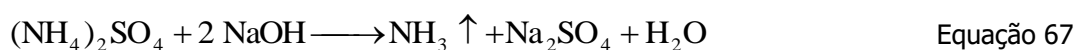
Na qual: **Dil. H2O** é o tempo de adição de água no tubo, em segundos (a bomba adiciona aproximadamente 16 mL/s). Para amostras digeridas pelo método Kjeldahl, manter em 6 s; para amostras a serem apenas destiladas, sem digestão prévia, deixar em 1,5 s; **NaOH** é o tempo de adição da solução de NaOH+Tiosulfato, em segundos (a bomba adiciona aproximadamente 10 mL/s). Para amostras digeridas pelo método Kjeldahl, manter em 1,8 s; para amostras a serem apenas destiladas sem digestão, ajustar em 0,8 s; **Dist. Time** é o tempo de destilação, em segundos; **Reac.time** é o tempo de espera, em segundos, entre o

final da adição do NaOH e o começo da destilação; **Power** é a potência do gerador de vapor; **DrainSample** é o tempo, em segundos, para que a bomba drene a solução do tubo de digestão (deixar como zero e descartar a solução manualmente, pois a bomba força muito e não consegue efetuar o descarte completo); **AutoEndPt** determina automaticamente o ponto final da titulação. Se estiver ON a titulação termina quando o pH se iguala ao pH medido durante a adição do ácido bórico; se estiver OFF a titulação continua até o pH fixo, indicado no *SetPoint*. Uma vez que durante a adição do ácido bórico não há tempo suficiente para garantir a estabilização do pH, deixar em OFF, minimizando, assim, o erro da titulação; **DrainTitr** é o tempo, em segundos, para que a bomba drene a solução do recipiente da titulação; **H3BO3** é o tempo, em segundos, de adição da solução de absorção (ácido bórico) no recipiente de titulação (a bomba adiciona, aproximadamente, 1,4 mL/s); **SetPoint** é o pH no ponto final predefinido para a titulação quando *AutoEndPt* estiver OFF; **Meas. Time** é o tempo, em segundos, para a determinação do ponto final da titulação quando *AutoEndPt* estiver ON; **Stirring** é a potência de agitação, em %, da solução no recipiente de titulação.

Observação: *Caso seja efetuada a destilação de amostras para determinação de amônia no destilado por meio do teste colorimétrico do fenol-hipoclorito (item 16.3), substituir a solução de ácido bórico por uma solução de H₂SO₄ ~ 0,02 M e omitir a titulação. Coletar o destilado, transferir para balão volumétrico de volume adequado (de forma que a concentração final de amônia seja compatível com a faixa de trabalho do método colorimétrico) e aferir o volume com água deionizada. Proceder conforme indicado nos itens 16.3.11 e 16.3.12.*

16.2.11.1. DESTILAÇÃO DE AMOSTRAS DIGERIDAS (PARA DETERMINAÇÃO DE NTK)

- Colocar o tubo com a amostra digerida no destilador e apertar o START. Ele automaticamente irá adicionar a solução de absorção (ácido bórico) no recipiente onde o destilado será coletado, e irá adicionar água deionizada e a solução de NaOH+Tiossulfato no tubo de digestão contendo a amostra;
- Verificar se as opções **Dil. H2O** e **NaOH** estão ajustadas para 6 s e 1,8 s, respectivamente, na programação do destilador antes de iniciar (START). Caso vá destilar no mesmo tubo vários resíduos da mesma amostra, digerida em alíquotas separadas, deixar **Dil. H2O** em 0 s e completar o volume manualmente para próximo de 100 mL com água deionizada. **ATENÇÃO: Não ultrapassar o volume máximo de 100 mL!**
- Assim que toda solução de NaOH for adicionada, a solução do tubo ficará escura. A elevação do pH permite a liberação da amônia do meio líquido para a fase gasosa (Equação 67), o que ocorre principalmente no início da etapa da destilação;
- Durante a destilação, a amônia é absorvida pela solução de H₃BO₃ segundo a Equação 68;



- Decorrido o tempo da destilação (360 s), o titulador será acionado automaticamente. A solução de H_2SO_4 deve estar devidamente padronizada (conforme item 16.2.3). O volume de ácido gasto na titulação será mostrado na tela do titulador, devendo ser anotado;
- Retirar o tubo de digestão usando luvas térmicas e descartar cuidadosamente o conteúdo do tubo na pia, com a torneira totalmente aberta. Deixar uma peneira no ralo da pia durante o descarte para não perder as pérolas de vidro;
- Ao terminar a titulação, a solução será automaticamente drenada, no entanto, após retirar o tubo de digestão, um pouco de destilado ainda é despejado no recipiente. Esse destilado deve ser drenado manualmente antes do início da próxima titulação;
- Para drenar o recipiente de titulação, acessar a tela principal do equipamento e selecionar: **OPTIONS > Manual Entry > Drain Trit.Cell** (manter o botão pressionado até drenar completamente o recipiente);
- Ao final da destilação de todos os tubos, proceder à lavagem do destilador fazendo o procedimento de destilação manual apenas com água. Para isso, encher um tubo de digestão com água deionizada até a metade e proceder com a destilação manual: **OPTIONS > Manual Entry > Steam ON**. Deixar ligado por aproximadamente 5 minutos e desligar (**Steam OFF**). Quando o destilador estiver com aspecto muito sujo, com manchas escuras, ao invés de água, utilizar uma solução de ácido clorídrico 20% para proceder a lavagem.

16.2.11.2. DESTILAÇÃO DE AMOSTRAS NÃO DIGERIDAS (PARA DETERMINAÇÃO DE N-AMONICAL)

- Amostras conservadas por acidificação deverão ser convenientemente neutralizadas com solução de NaOH antes de serem submetidas ao procedimento de destilação;
- Amostras contendo teor de nitrogênio amoniacal acima de 100 mg N-NH_4^+ /L devem ser diluídas com água deionizada;
- Amostras que apresentem concentrações muito baixas de amônia (< 5 mg/L) devem ser analisadas diretamente por meio do teste colorimétrico do fenol-hipoclorito (item 16.3), omitindo-se a etapa de destilação, desde que interferentes estejam ausentes;
- Para amostras com concentrações de 5 a 100 mg N-NH_4^+ /L, utilizar os volumes indicados na Tabela 21:

Tabela 21: Volume de amostra recomendado para a destilação de acordo com a faixa de N-NH_4^+ da amostra.

Concentração estimada de N-NH_4^+ na amostra (mg/L)	Volume de amostra para destilação (mL)
5-10	100
10-25	50
25-50	25
50-100	15

Fonte: Adaptado de: American Public Health Association (2005)

- Adicionar aos tubos do digestor de nitrogênio: O volume adequado da amostra em questão (Tabela 21), 15 mL do tampão borato, uma espátula de pérolas de vidro e homogeneizar;

- Preparar o branco com mesmo volume de água deionizada no lugar da amostra, 15 mL do tampão borato, uma espátula de pérolas de vidro e homogeneizar;
- Completar o volume para próximo de 100 mL com água deionizada, se necessário;
- Verificar se as opções **Dil. H₂O** e **NaOH** estão ajustadas para 1,5 s e 0,8 s, respectivamente, na programação do destilador;
- Colocar o tubo com a amostra no destilador e apertar o START (verificar a programação). Ele automaticamente irá adicionar a solução de absorção (ácido bórico) no recipiente onde o destilado será coletado, e irá adicionar a solução de NaOH+Tiosulfato no tubo contendo a amostra;
- Decorrido o tempo da destilação (360 s), o titulador será acionado automaticamente. A solução de H₂SO₄ deve estar devidamente padronizada (conforme item 16.2.3). O volume de ácido gasto na titulação será mostrado na tela do titulador, devendo ser anotado;
- Ao terminar a titulação, a solução será automaticamente drenada, no entanto, após retirar o tubo de digestão, um pouco de destilado ainda é despejado no recipiente. Esse destilado deve ser drenado manualmente antes do início da próxima titulação (conforme descrito no item anterior);
- Retirar o tubo de digestão usando luvas térmicas e descartar cuidadosamente o conteúdo do tubo na pia, com a torneira totalmente aberta. Deixar uma peneira no ralo da pia durante o descarte para não perder as pérolas de vidro;
- Ao final, proceder à lavagem do destilador repetindo o procedimento de destilação apenas com água. Para isso, encher um tubo de digestão com água deionizada até a metade e proceder com a destilação manual: **OPTIONS > Manual Entry > Steam ON**. Deixar ligado por aproximadamente 5 minutos e desligar (**Steam OFF**). Quando o destilador estiver com aspecto muito sujo, com manchas escuras, ao invés de água, utilizar uma solução de ácido clorídrico 20% para proceder a lavagem.

16.2.11.3. CUIDADOS COM A VIDRARIA

- Lavar criteriosamente os tubos utilizados nos procedimentos de digestão, destilação e titulação das amostras, bem como os demais recipientes utilizados, deixando-os em condições de uso para a próxima série de análises;
- Guardar a vidraria limpa e seca próxima ao digestor e destilador.

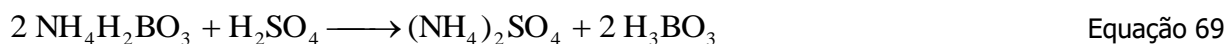
16.2.11.4. PADRÕES DE VERIFICAÇÃO DO MÉTODO

- De tempos em tempos, é recomendável o preparo de alguns padrões de controle contendo formas orgânicas de nitrogênio, por exemplo: Cisteína (C₃H₇NO₂S), Ácido Nicotínico (C₆H₅NO₂), Glicina (C₂H₅NO₂) ou Ureia (CH₄N₂O). Submeter estes padrões ao mesmo procedimento de digestão, destilação e titulação que as amostras para verificar a recuperação de Nitrogênio Total Kjeldahl;
- Para verificar a recuperação de nitrogênio amoniacal durante o processo de destilação das amostras, convém preparar frequentemente alguns padrões de controle com concentrações

conhecidas de cloreto de amônio (NH₄Cl) e submeter ao mesmo procedimento de destilação e titulação que as amostras.

16.2.12. CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE NTK E N-AMONIAL

A titulação com ácido sulfúrico da amostra destilada, contendo borato de amônio, resulta na ocorrência da seguinte reação:



Assim, a concentração de nitrogênio total Kjeldahl (NTK), em amostras digeridas e destiladas, ou de nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal), em amostras exclusivamente destiladas, deverá ser calculada conforme a equação a seguir:

$$N = \frac{(V_1 - V_2)}{V_{\text{AMOSTRA}}} \times M_{\text{H}_2\text{SO}_4} \times 2 \times 14.000 \quad \text{Equação 70}$$

na qual:

N – representa a concentração de nitrogênio, em mg N-NH₄⁺/L ou N-NTK/L;

V₁ – volume da solução de ácido utilizado para titular a amostra (mL);

V₂ – volume da solução de ácido utilizado para titular o *branco* (mL);

V_{AMOSTRA} – volume original da amostra antes da digestão e/ou destilação (mL);

M_{H₂SO₄} – molaridade da solução de ácido sulfúrico utilizada na titulação (mol/L);

14.000 – equivalente-grama do nitrogênio contido no NH₄⁺;

2 – número de hidrogênios ionizáveis na molécula de H₂SO₄.

16.2.13. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO ORGÂNICO (N-ORGÂNICO)

Para a determinação da concentração de *nitrogênio orgânico* (N-Orgânico) de uma amostra, deve-se subtrair o valor da concentração de *nitrogênio amoniacal* (N-Amoniacal), obtido diretamente da titulação da amostra destilada, do valor da concentração de *nitrogênio total Kjeldahl* (NTK), obtido pela titulação da amostra digerida e destilada.

16.2.14. TITULAÇÃO MANUAL DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE NTK E N-AMONIAL

Caso seja necessário efetuar manualmente a titulação das amostras digeridas e destiladas (para determinação de NTK) ou das amostras apenas destiladas (para determinação de N-Amoniacal), utilizar a solução indicadora de ácido bórico como solução de absorção para o destilado.

Preparar a solução de absorção indicadora e efetuar a titulação das amostras conforme descrito nos itens elencados a seguir:

16.2.14.1. PREPARO DO INDICADOR MISTO

Dissolver 200 mg do indicador vermelho de metila (C₁₅H₁₅N₃O₂) em 100 mL de álcool etílico 96%. Dissolver, separadamente, 100 mg de azul de metileno (C₁₆H₁₈ClN₃S) em 50 mL de álcool etílico 96%. Na

sequência, combinar as duas soluções. Esse indicador deve ser preparado mensalmente e armazenado ao abrigo da luz.

16.2.14.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ABSORÇÃO INDICADORA

Pesar 20 g de ácido bórico (H_3BO_3) em balão volumétrico de 1.000 mL. Adicionar 10 mL do indicador misto, preparado conforme indicado acima, e completar o volume do balão com água deionizada. Tampar o balão e homogeneizar por inversões sucessivas. Armazenar ao abrigo da luz por até 1 mês.

16.2.14.3. TITULAÇÃO MANUAL

Recolher o destilado em erlenmeyer 250 mL e colocar em agitação magnética. Usando bureta de vidro ou bureta digital contendo a solução padronizada de H_2SO_4 0,01 M (preparada e padronizada conforme item 16.2.3), titular o destilado do teste em branco até a obtenção de uma coloração lilás clara. Medir o pH da amostra nesse ponto.

Para as demais amostras, a coloração e o pH do branco deverão ser tomadas como padrões do ponto final da titulação, ou seja, todas as amostras tituladas deverão apresentar a mesma tonalidade de cor e mesmo pH equivalente no ponto de viragem.

Levar em conta que amostras com baixas concentrações de NTK ou N-Amoniacal (< 5 mg/L) devem ser analisadas pelo método colorimétrico (item 16.3).

A concentração de nitrogênio total Kjeldahl (NTK), em amostras digeridas e destiladas, ou de nitrogênio amoniacal (N-Amoniacal), em amostras exclusivamente destiladas, deverá ser calculada conforme a equação a seguir:

$$N = \frac{(V_1 - V_2)}{V_{AMOSTRA}} \times M_{H_2SO_4} \times 2 \times 14.000 \quad \text{Equação 71}$$

na qual:

N – representa a concentração de nitrogênio, em mg $N-NH_4^+/L$ ou $N-NTK/L$;

V_1 – volume da solução de ácido utilizado para titular a amostra (mL);

V_2 – volume da solução de ácido utilizado para titular o *branco* (mL);

$V_{AMOSTRA}$ – volume original da amostra antes da digestão e/ou destilação (mL);

$M_{H_2SO_4}$ – molaridade da solução de ácido sulfúrico utilizada na titulação (mol/L);

14.000 – equivalente-grama do nitrogênio contido no NH_4^+ ;

2 – número de hidrogênios ionizáveis na molécula de H_2SO_4 .

16.3. NITROGÊNIO AMONIAICAL – MÉTODO DO FENOL-HIPOCLORITO (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

16.3.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A amônia reage com fenol e hipoclorito em solução alcalina, gerando um composto intensamente azul (indofenol) com absorção na faixa do visível, próximo de 640 nm. A reação é catalisada por nitroprussiato de sódio. Citrato é adicionado para proporcionar maior estabilidade à solução e evitar interferências devidas à presença dos íons cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}). Uma vez formada, a cor azul de indofenol é estável por cerca de 24 horas, desde que o frasco esteja vedado e armazenado ao abrigo da luz.

O presente método é adequado para a determinação de baixas concentrações amônia ($< 1,0 \text{ mg/L}$) em águas limpas ou pouco contaminadas. Amostras mais contaminadas devem ser destiladas (item 16.2.11) previamente à realização da análise. Para análise do teor de amônia em amostras destiladas, digeridas ou não pelo método Kjeldahl, proceder conforme as orientações apresentadas no item 16.3.11.

Cor e turbidez também devem ser removidas previamente por meio de filtração ou destilação.

Caso haja presença de sulfeto de hidrogênio, este deve ser removido por acidificação da amostra até pH próximo de 3,0 com solução diluída de ácido clorídrico (HCl) e aeração vigorosa (por fluxo de nitrogênio gasoso ou agitação magnética) até que o odor característico do sulfeto não seja mais percebido.

Cloro residual deve ser removido imediatamente após a coleta da amostra por meio da dosagem de solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 3,5 \text{ g/L}$). 1 mL dessa solução é suficiente para remover 1 mg/L de cloro residual em 500 mL da amostra.

16.3.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de $0,45 \mu\text{m}$ de poro
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001 \text{ g}$)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Estufa a 60°C
- Balões volumétricos de 50, 100, 200 e 1.000 mL
- Béquer de vidro de 1.000 mL
- Micropipetas de 100, 1.000 e 5.000 μL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Cloreto de Amônio – NH_4Cl P.A.
- Fenol – $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ P.A.
- Etanol 96% – $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Citrato Trissódico dihidratado – $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Nitroprussiato de Sódio dihidratado – $\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Solução de Hipoclorito de Sódio 5% (ou água sanitária comercial)

Observação: *Pela alta sensibilidade do método, utilizar apenas água ultrapura (Milli-Q®) no preparo das soluções reagentes e na diluição das amostras.*

16.3.3. SOLUÇÃO DE NITROPRUSSIATO DE SÓDIO 5%

- (a) Pesar 0,5 g de nitroprussiato de sódio ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e dissolver com água ultrapura (Milli-Q®) em balão volumétrico de 100 mL;
- (b) armazenar refrigerado em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado;
- (c) essa solução é estável por 1 a 2 meses, devendo ser substituída caso ocorra alteração na cor.

16.3.4. SOLUÇÃO ALCOÓLICA DE FENOL

ATENÇÃO: *Trabalhar em capela sob exaustão. Usar luvas nitrílicas, óculos de segurança e máscara contra compostos orgânicos voláteis! O fenol é extremamente TÓXICO!*

- (a) Em balança analítica, pesar 10 g de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) (*tarar a balança analítica com o frasco tampado; na capela, com a exaustão ligada, adicionar uma massa de fenol aproximada; tampar o frasco e pesar; repetir o procedimento até obter a massa desejada*);
- (b) ainda na capela, transferir o fenol para balão volumétrico de 100 mL e dissolver com etanol 96%, completando o volume;
- (c) armazenar refrigerado em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado. Essa solução é estável por alguns meses.

Observação: *Outra forma de preparar essa solução é utilizando fenol liquefeito (pureza $\geq 89\%$). Nesse caso, transferir 11,1 mL do reagente para balão volumétrico de 100 mL e completar com etanol 96%. Guardar a solução como indicado acima.*

16.3.5. SOLUÇÃO DE CITRATO ALCALINO

- (a) Na capela, com a exaustão ligada, dissolver 200 g de citrato trissódico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e 10 g de hidróxido de sódio (NaOH) em béquer de vidro de 1.000 mL usando água Milli-Q®. **Sempre manusear o citrato usando luvas!**
- (b) aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água Milli-Q®;
- (c) armazenar em frasco de vidro devidamente identificado;
- (d) essa solução é estável.

16.3.6. SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO 5%

Pode ser utilizada uma solução comercial (água sanitária) com cerca de 5% de hipoclorito em sua composição. **ATENÇÃO:** Essa solução se decompõe lentamente uma vez aberta e deve ser substituída a cada 2 meses, aproximadamente.

16.3.7. SOLUÇÃO OXIDANTE

Misturar 5 mL da solução de hipoclorito de sódio para cada 20 mL da solução de citrato alcalino e homogeneizar. Preparar no dia da análise, prevendo o volume final necessário. **Não armazenar!**

16.3.8. SOLUÇÃO ESTOQUE DE AMÔNIA (500 MG/L)

- (a) Em balança analítica, pesar 0,9553 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) seco em estufa a 60°C por, no mínimo, 24 h, e devidamente resfriado em dessecador;
- (b) transferir quantitativamente para balão volumétrico de 500 mL, completando com água ultrapura (Milli-Q®);
- (c) dosar 1 gota de clorofórmio (conservativo) e homogeneizar a solução;
- (d) armazenar em frasco de vidro devidamente identificado, ao abrigo da luz e refrigerado. Essa solução pode ser utilizada por até 1 mês.

16.3.9. SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA (SOLUÇÃO MÃE – 5 MG/L)

Transferir 2 mL da solução estoque para balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com água Milli-Q®. Essa solução contém $5.000 \mu\text{g N-NH}_4^+/\text{L}$.

16.3.10. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (100 – 700 $\mu\text{g/L}$)

Com auxílio de micropipeta, transferir os volumes da solução mãe indicados na Tabela 22 para balões volumétricos de 50 mL, completando o volume com água Milli-Q®.

Preparar os padrões sempre em triplicatas (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração). Em seguida, submeter os padrões ao procedimento descrito a seguir para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal e traçar a curva de calibração.

Tabela 22: Relação das concentrações e alíquotas da solução mãe para a curva de calibração.

Concentrações estimadas ($\mu\text{g N-NH}_4^+/\text{L}$)	Alíquota da solução mãe (μL) para diluição em balão volumétrico de 50 mL
0 (branco)	0
100	1.000
200	2.000
300	3.000
400	4.000
500	5.000
600	6.000
700	7.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

16.3.11. TRATAMENTO DE AMOSTRAS PREVIAMENTE DESTILADAS

Quando forem utilizadas amostras destiladas (digeridas ou não pelo método Kjeldahl, conforme apresentado anteriormente – item 16.2.11), transferir o destilado (recolhido em solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 0,02 \text{ M}$) para balão volumétrico de volume adequado ($V_{\text{DILUIÇÃO}}$) e aferir com água deionizada, submetendo em seguida ao teste colorimétrico (item 16.3.12).

Para obter a concentração de nitrogênio amoniacal no volume original da amostra (V_{ORIGINAL}), multiplicar o resultado da análise colorimétrica pela razão $V_{\text{DILUIÇÃO}} / V_{\text{ORIGINAL}}$.

Levar em conta que o volume do balão a ser utilizado é função da massa aproximada de amônia na amostra destilada, de forma que a concentração final seja compatível com a faixa de trabalho do método colorimétrico (0,1 – 0,7 mg/L).

Preparar um teste em branco com mesmo volume de água deionizada no lugar da amostra e submeter aos mesmos procedimentos de digestão (quando for o caso), destilação e diluição, zerando o espectrofotômetro com esse branco para a correção de possíveis contaminações.

16.3.12. DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONICAL

- (a) Para remover sólidos em suspensão, filtrar previamente a amostra em membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro;
- (b) se necessário, diluir a amostra com água Milli-Q®;
- (a) transferir 5 mL de amostra para tubo de DQO;
- (b) preparar dois brancos, ambos consistindo de 5 mL de água Milli-Q® no lugar da amostra;
- (c) na capela, sob exaustão, adicionar 0,2 mL da solução de fenol;
- (d) tampar e agitar em vórtex (cuidado para não derramar ou respingar a amostra: tampar o frasco antes de agitar ou ajustar o vórtex para a velocidade mínima!);
- (e) em seguida, adicionar 0,2 mL da solução de nitroprussiato e agitar novamente em vórtex;
- (f) adicionar 0,5 mL da solução oxidante, tampar, agitar vigorosamente e deixar em repouso, no escuro, por 3 h, à temperatura ambiente;
- (g) passado o tempo da reação, a cor é estável por cerca de 24 h;
- (h) zerar o espectrofotômetro com o branco de menor absorbância e efetuar a leitura das amostras em comprimento de onda de 640 nm.

Observações:

1) *Devido à alta instabilidade dos reagentes do método, o aconselhável é armazenar um número razoável de amostras para efetuar a análise no mesmo dia da construção da curva de calibração. Caso isso não seja possível, preparar ao menos dois padrões de verificação com NH₄Cl dentro da faixa de concentração das amostras e corrigir o resultado, se necessário.*

2) *Considerando que o intervalo de concentração do método é muito baixo, e que o procedimento de diluição pode ser uma importante fonte de erro, recomenda-se que a análise seja feita em triplicatas autênticas, ou seja, que o procedimento de diluição seja repetido em triplicatas para cada amostra.*

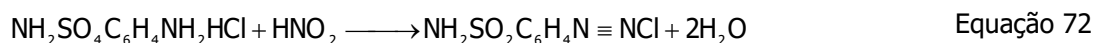
17. NITRITO – MÉTODO DA SULFANILAMIDA (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

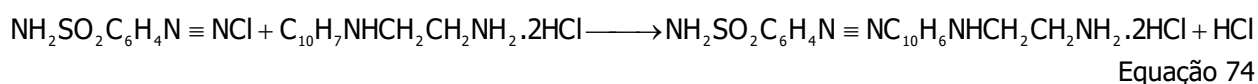
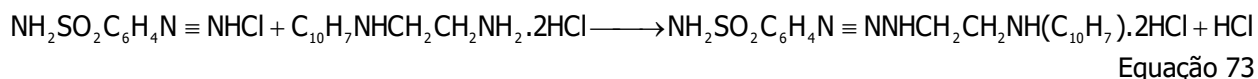
17.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Nitrito apresenta nitrogênio em estado de oxidação III. Pode ser produzido a partir da redução de nitrato em condições anaeróbias ou por oxidação de amônio em ambientes aeróbios. As reações de oxidação e de redução podem ocorrer em instalações de tratamento de águas residuárias, em sistemas de distribuição de água e em ambientes naturais. Nitrito pode estar presente no sistema de suprimento de águas por ser usado como inibidor de corrosão em processos industriais. O ácido nitroso, formado a partir de nitrito em solução ácida, pode reagir com aminas secundárias e formar nitrosaminas, muitas das quais, carcinogênicas. O significado toxicológico das reações de nitrosação *in vitro* e no meio natural é o objeto de muitas pesquisas.

O método de determinação espectrofotométrica do nitrito, proposto inicialmente por Bendschneider e Robinson (1952), baseia-se na reação deste ânion, em meio ácido (pH 2,0 a 2,5), com a sulfanilamida, conforme a seguinte reação:



O composto formado reage com dicloridrato de (1-naftil)etilenodiamina e forma um outro composto nitrogenado, colorido (roxo-avermelhado), cuja fórmula não é exatamente conhecida. Os autores apresentaram duas possibilidades para o mecanismo dessa reação:



17.2. INTERFERENTES

De acordo com Strickland e Parsons (1968), este método não é afetado apreciavelmente pela salinidade, pequenas mudanças nas concentrações ou volumes dos reagentes e pela temperatura. Entretanto, os pesquisadores sugerem que o trabalho seja feito entre 15°C e 20°C.

A maior fonte de erro, citada por Golterman (1969), é a causada por altas concentrações de nitrito. Segundo este autor, se a quantidade de nitrito for estequiometricamente superior à quantidade de sulfanilamida adicionada (e, portanto, fora do alcance do método), o excesso de nitrito destruirá o dicloridrato de n-(1-naftil)-etilenodiamina. Isto causará um erro negativo, pois praticamente nenhuma coloração será desenvolvida. Para esses casos, diluições das amostras com água ultrapura, livre de oxigênio e íons nitrito, serão necessárias.

A incompatibilidade química torna improvável que nitrito, cloro livre e tricloronitrogênio (NCl₃) coexistam. Além disso, NCl₃ comunica uma falsa cor vermelha quando o reagente colorante for adicionado. Os íons Sb³⁺, Au³⁺, Bi³⁺, Fe³⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Ag⁺, PtCl₆²⁻ e VO₃²⁻ interferem na análise devido à precipitação sob as condições do teste e devem, portanto, estar ausentes.

O íon cúprico (Cu^{2+}) pode causar baixos resultados em função da decomposição catalisada do sal diazônio. Íons coloridos que alteram a cor do sistema também devem estar ausentes e os sólidos suspensos devem ser removidos através de filtração (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Segundo AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2005), análises realizadas em um único laboratório, com amostras de águas residuárias em concentrações de 0,04; 0,24; 0,55 e 1,04 mg ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$)/L, os desvios padrão foram: $\pm 0,005$; $\pm 0,004$; $\pm 0,005$ e $\pm 0,01$, respectivamente. Para as mesmas amostras de águas residuárias, nas concentrações de 0,24; 0,55 e 1,04 mg ($\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$)/L, as percentagens recuperadas foram: 100%, 102% e 100%, respectivamente.

17.3. ARMAZENAMENTO DA AMOSTRA

Nunca utilizar conservação ácida para amostras destinadas à análise de nitrito. É recomendado proceder à determinação imediatamente após a coleta da amostra para evitar a conversão bacteriana do NO_2^- a NO_3^- ou NH_3 . Para conservação em curto prazo (1 ou 2 dias) congelar a amostra a -20°C ou conservar a 4°C .

17.4. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 μm de poro
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$)
- Agitador magnético e barra magnética
- Chapa aquecedora
- Espectrofotômetro
- Estufa a $103-105^\circ\text{C}$
- Medidor de pH de bancada
- Buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Balões volumétricos de 100, 250 e 1.000 mL
- Copos de béquer de 100 e 1.000 mL
- Erlenmeyers de 250 e 500 mL
- Micropipetas de 1.000 e 5.000 μL
- Pipeta de vidro graduada de 10,0 mL
- Pipeta volumétrica de 50,0 mL
- Pipeta de Pasteur
- Proveta graduada de 100 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Sulfanilamida – $\text{NH}_2\text{SO}_4\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2\text{HCl}$ P.A.
- Dicloridrato de n-(1-Naftil)-Etilenodiamina – $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$ P.A.
- Ácido Fosfórico concentrado – H_3PO_4 85% P.A.
- Nitrito de Sódio – NaNO_2 P.A.
- Permanganato de Potássio – KMnO_4 P.A.
- Oxalato de Sódio com qualidade de padrão primário – $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ P.A. – ou
- Sulfato Ferroso Amoniacal Hexahidratado – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A.
- Hidróxido de Amônio concentrado – NH_4OH P.A.

Observação: *Pela alta sensibilidade do método, utilizar no preparo das soluções reagentes, padrões e na diluição das amostras apenas água ultrapura (Milli-Q®), a qual deverá estar isenta de íons nitrito.*

17.5. PREPARO DO REAGENTE COLORANTE

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL contendo 800 mL de água ultrapura (Milli-Q®) adicionar 100 mL de ácido fosfórico 85% e 10,0 g de sulfanilamida;
- (b) manter em agitação magnética até a dissolução completa da sulfanilamida;
- (c) acrescentar 1,0 g do dicloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina e agitar para dissolver;
- (d) em seguida, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água Milli-Q®;
- (e) essa solução é estável por cerca de 1 mês quando conservada na geladeira, em frasco âmbar, ao abrigo da luz. De preferência, utilizar um frasco âmbar com tampa esmerilhada.

17.6. PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AJUSTE DO PH DA AMOSTRA

ATENÇÃO: *Sempre manusear e efetuar a dissolução de ácidos concentrados e hidróxidos na capela, sob exaustão, usando jalecos, luvas nitrílicas e óculos de segurança.*

(a) Solução de HCl 1 M: Transferir, com auxílio de pipeta de vidro, 8,4 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) para béquer de vidro de 100 mL contendo cerca de 80 mL de água Milli-Q®. Após esfriar, transferir a solução para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água Milli-Q®;

(b) Solução de NH₄OH 1 M: Transferir, com auxílio de pipeta de vidro, 6,7 mL de hidróxido de amônio concentrado (NH₄OH) para béquer de vidro de 100 mL contendo cerca de 80 mL de água Milli-Q®. Após esfriar, transferir a solução para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água Milli-Q®.

17.7. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO (250 MG N-NO₂⁻/L)

Utilizar como padrão nitrito de sódio (NaNO₂) comercial com pureza mínima de 99%.

Uma vez que o NO₂⁻ se oxida facilmente na presença de umidade, deve-se utilizar um reagente recente no preparo da solução estoque, mantendo o frasco bem tampado para evitar a entrada de ar quando o mesmo não estiver sendo utilizado. Armazenar em dessecador a vácuo com sílica anidra.

Para preparar uma solução estoque com concentração aproximada de 250 mg N-NO₂⁻/L (1 mL = 250 µg N-NO₂⁻), dissolver 1,232 g de NaNO₂ em água Milli-Q®, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume. Conservar adicionando 1 mL de clorofórmio (CHCl₃) ao frasco da solução.

A solução estoque deverá ser padronizada conforme indicado nos itens a seguir.

17.8. PREPARO DA SOLUÇÃO DE PERMANGANATO DE POTÁSSIO 0,01 M (0,05 N)

Dissolver 1,6 g de KMnO₄ em 1.000 mL de água ultrapura (Milli-Q®). Manter em frasco âmbar por pelo menos uma semana. Quando for utilizar essa solução, pipetar cuidadosamente o sobrenadante evitando agitação para não ressuspender o sedimento. Padronizar esta solução com frequência através do seguinte procedimento:

- (a) Em balança analítica, pesar três massas de oxalato de sódio anidro ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ – seco em estufa a 103-105°C por 2 h, no mínimo, e resfriado em dessecador) entre 100 e 200 mg;
- (b) transferir cada porção de oxalato para um erlenmeyer de 500 mL e adicionar 100 mL de água Milli-Q®, agitando para dissolver o reagente;
- (c) adicionar 10 mL de uma solução de H_2SO_4 1+1 (1 volume de H_2SO_4 diluído em 1 volume de água) e aquecer rapidamente até 90-95°C;
- (d) titular rapidamente com a solução de permanganato a ser padronizada, mantendo a solução de oxalato em agitação, até obter um ponto final rosa persistente por pelo menos 1 min;
- (e) **ATENÇÃO:** Não deixar a temperatura cair abaixo de 85°C (acompanhar com termômetro). Se necessário, aquecer o conteúdo do béquer durante a titulação em chapa aquecedora;
- (f) 100 mg de oxalato de sódio consumirão aproximadamente 6 mL da solução de permanganato;
- (g) realizar o mesmo procedimento com um branco (100 mL de água Milli-Q® e 10 mL de H_2SO_4 1+1, omitindo a adição do oxalato) para corrigir a padronização da solução de permanganato;
- (h) calcular a normalidade real da solução através da equação a seguir (considerar a média dos resultados das três titulações):

$$N_{\text{KMnO}_4} = \frac{(M_{\text{OXALATO}})}{[(V_{\text{KMnO}_4 \text{ GASTO}} - V_{\text{BRANCO}}) \times 0,067]} \quad \text{Equação 75}$$

Na qual:

M_{OXALATO} = Massa exata de oxalato de sódio utilizada na padronização (g)

$V_{\text{KMnO}_4 \text{ GASTO}}$ = Volume da solução de permanganato de potássio gasto na titulação (mL)

V_{BRANCO} = Volume da solução de permanganato de potássio gasto na titulação do branco (mL)

N_{KMnO_4} = Normalidade corrigida da solução de permanganato de potássio (N)

17.9. PREPARO DA SOLUÇÃO REDUTORA PARA PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO

17.9.1. OPÇÃO 1: SOLUÇÃO DE OXALATO DE SÓDIO 0,025 M (0,05 N)

Dissolver 3,350 g de oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), previamente seco em estufa a 103-105°C por 2 h, no mínimo, e resfriado em dessecador, em água Milli-Q® e diluir até 1.000 mL em balão volumétrico.

17.9.2. OPÇÃO 2: SOLUÇÃO DE SULFATO FERROSO AMONIACAL 0,05 M (0,05 N)

Dissolver 19,607 g de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] e 20 mL de H_2SO_4 concentrado em água Milli-Q®, aguardar o resfriamento e diluir até 1.000 mL em balão volumétrico.

Padronizar essa solução usando uma solução de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), conforme o procedimento apresentado no *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) na seção referente ao método titulométrico para a DQO.

17.10. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE NITRITO

Para determinar o conteúdo real de NaNO_2 , padronizar a solução estoque utilizando uma solução de permanganato de potássio (KMnO_4) 0,01 M (0,05 N) na presença de um padrão redutor (oxalato de sódio – $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ – ou sulfato ferroso amoniacal – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) conforme indicado a seguir:

- (a) Em erlenmeyer de 250 mL adicionar 50 mL da solução padronizada de permanganato de potássio ($\text{KMnO}_4 \sim 0,05 \text{ N}$) seguido de 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e 50 mL da solução estoque de nitrito (manter a ponta da pipeta volumétrica mergulhada na solução de permanganato + ácido enquanto realiza a transferência da solução de nitrito);
- (b) mantenha em agitação magnética lenta e aqueça a $70\text{-}80^\circ\text{C}$ em chapa aquecedora;
- (c) adicionar algumas porções de 10 mL da solução de oxalato de sódio padrão ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4 \sim 0,05 \text{ N}$) até o desaparecimento da coloração devida ao permanganato;
- (d) titular, em seguida, o excesso de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ com a solução padrão de permanganato até obter um ponto final rosa;
- (e) efetuar a titulação em triplicata;
- (f) repetir o mesmo procedimento com um branco (água Milli-Q® no lugar da solução de nitrito) para corrigir o resultado final da titulação;
- (g) caso a solução de oxalato de sódio ($\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$) seja substituída por uma solução de sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$], omitir o aquecimento e aguardar um tempo de reação de 5 min entre o KMnO_4 e o Fe^{2+} antes de efetuar a titulação final com a solução de KMnO_4 ;
- (h) calcular a concentração real de N-NO_2^- da solução estoque através da seguinte equação (considerar a concentração média obtida com as triplicatas):

$$\text{mg N - NO}_2^- / \text{L} = \frac{[(V_{\text{KMnO}_4 \text{ GASTO}} \times N_{\text{KMnO}_4}) - (V_{\text{REDUTOR}} \times N_{\text{REDUTOR}})]}{V_{\text{SOLUÇÃO ESTOQUE}}} \times 7.000 \quad \text{Equação 76}$$

Na qual:

$V_{\text{KMnO}_4 \text{ GASTO}}$ = Volume total da solução de permanganato de potássio gasto na titulação (mL)

N_{KMnO_4} = Normalidade real da solução de permanganato de potássio (N)

V_{REDUTOR} = Volume da solução de redutor (oxalato de sódio ou sulfato ferroso amoniacal) utilizado (mL)

N_{REDUTOR} = Normalidade real da solução de redutor (oxalato de sódio ou sulfato ferroso amoniacal) (N)

$V_{\text{SOLUÇÃO ESTOQUE}}$ = Volume da solução estoque de nitrito titulada (mL)

Observação: Cada 1 mL da solução de KMnO_4 consumido pelo NaNO_2 corresponde a 1725 μg de NaNO_2 ou 350 μg de N-NO_2^- .

17.1. SOLUÇÃO INTERMEDIÁRIA DE NITRITO (50 MG N-NO₂⁻/L)

Sendo C a concentração real de N-NO_2^- (em mg/L) da solução estoque padronizada, calcular o volume dessa solução (V, em mL) necessário para preparar uma solução intermediária contendo 50 mg $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$ (1 mL = 50 μg de N-NO_2^-) da seguinte forma:

$$V = \frac{12.500}{C} \quad \text{Equação 77}$$

Diluir o volume V (aproximadamente 50 mL) com água Milli-Q® em balão volumétrico de 250 mL.

Preparar a solução intermediária no mesmo dia em que for utilizá-la.

17.2. SOLUÇÃO MÃE DE NITRITO (500 µg N-NO₂⁻/L)

Diluir 10 mL da solução intermediária de nitrito com água Milli-Q® em balão volumétrico de 1.000 mL.

Cada 1 mL dessa solução mãe deverá conter 0,500 µg de N-NO₂⁻.

Preparar no mesmo dia em que for utilizá-la.

17.3. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (50 – 500 µg N-NO₂⁻/L)

Para a construção da curva padrão devem ser preparadas, em balões volumétricos de 100 mL, as soluções padrões indicadas na Tabela 23, através de diluição, com água Mili-Q®, da solução mãe de 500 µg N-NO₂⁻/L. Submeter os padrões ao mesmo procedimento que as amostras (item 17.4).

É fundamental que cada ponto da curva seja feito em triplicata. Isso significa preparar também as diluições em triplicatas.

Construa a curva padrão plotando a absorbância dos padrões em função da concentração de N-NO₂⁻.

Tabela 23: Volumes requeridos da solução mãe para preparar a curva de calibração.

Concentrações estimadas (µg N-NO ₂ ⁻ /L)	Volume (mL) da solução mãe para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0 (branco)	0,0
50	1,0
100	2,0
150	3,0
200	4,0
250	5,0
300	6,0
350	7,0
400	8,0
450	9,0
500	10,0

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

17.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO

- Para remover sólidos em suspensão, filtrar previamente um volume adequado de amostra em membrana com 0,45 µm de diâmetro de poro;
- se necessário, diluir a amostra com água Milli-Q®;
- a amostra deverá apresentar valor de pH dentro da faixa entre 5,0 e 9,0. Caso seja necessário, utilizar uma pipeta de Pasteur e ajustar o pH da amostra dosando algumas gotas das soluções de HCl 1 M e/ou NH₄OH 1 M;
- em seguida, transferir 5 mL de amostra para tubo de DQO e adicionar 200 µL do reagente colorante, tampar e misturar bem por inversão;
- preparar um branco com água Milli-Q® e submeter ao mesmo procedimento aplicado nas amostras*;
- zerar o espectrofotômetro com o branco e efetuar a leitura da absorbância das amostras em 543 nm, entre 10 min e 2 h após a adição do reagente colorante;
- por fim, calcular a concentração da amostra interpolando o resultado na curva de calibração.

***Observações:**

1) Considerando que o intervalo de concentração do método é muito baixo, e que o procedimento de diluição pode ser uma importante fonte de erro, recomenda-se que a análise seja feita em triplicatas autênticas, ou seja, que o procedimento de diluição seja repetido em triplicatas para cada amostra.

2) Segundo Golterman (1969), o teste em branco deve ser preparado pela adição de 1,0 mL de uma solução de sulfamato de amônio ($\text{NH}_4\text{OSO}_2\text{NH}_2$) 5% à água deionizada. Sulfamato de amônio converte nitrito em óxido nitroso. Esta sugestão geralmente não é seguida nas rotinas do laboratório, já que a água ultrapura (Milli-Q®) utilizada é de boa qualidade e se apresenta isenta tanto de íons nitrito quanto de nitratos.

18. NITRATO – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Nitrato (NO_3^-) ocorre, geralmente, em pequenas quantidades nas águas superficiais, mas pode atingir altos níveis em águas subterrâneas. Em excesso, contribui para o desenvolvimento da doença conhecida como *metahemoglobinemia*, que acomete crianças. É encontrado apenas em esgotos domésticos frescos, mas no efluente de instalações de tratamento, pode atingir concentrações superiores a 30 mg NO_3^-/L .

Nitrato é um dos nutrientes essenciais para muitos seres autotróficos fotossintetizantes, sendo, em alguns casos, identificado como fator limitante ao aumento desses organismos.

O *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) apresenta dois procedimentos que analisam especificamente o nitrato: O método por redução de cádmio (18.3) e o método de espectrofotometria de absorção ultravioleta (18.1). O primeiro não é recomendado uma vez que emprega cádmio, um composto de alta toxicidade. O segundo sofre interferência da presença de matéria orgânica, embora existam técnicas para amenizar essa limitação inerente do método.

Outra metodologia existente na literatura é a que se baseia na reação do nitrato com o ácido cromotrópico na presença de ácido sulfúrico, gerando um composto de coloração amarela (18.2). Esse método foi descrito por West e Ramachandran (1966) e modificado por Robinson e Hsu (1969).

No presente manual os três métodos serão apresentados, cabendo ao analista a escolha criteriosa do método a ser empregado para as suas amostras.

18.1. MÉTODO DA ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA

(Modificado de AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

18.1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A técnica de espectrometria de absorção ultravioleta se baseia na absorção de luz ultravioleta em um comprimento de onda de 220 nm. A curva de calibração segue a Lei de Beer até 11 mg N- NO_3^-/L .

Essa metodologia é recomendada para águas com baixo teor de matéria orgânica, como águas naturais não contaminadas ou água de abastecimento. Essa recomendação se deve ao fato de que a matéria orgânica absorve ondas de 220 nm e de 275 nm. No entanto, o íon nitrato não absorve esta última e uma forma de contornar a limitação do método é realizar uma segunda medida em 275 nm para que o valor de absorbância referente à matéria orgânica seja subtraído.

A extensão dessa correção empírica está relacionada à natureza e concentração da matéria orgânica e dependem muito da origem da amostra. Para amenizar essa interferência, a amostra pode ser tratada com uma solução de hidróxido de alumínio para que a matéria orgânica seja precipitada e, posteriormente, separada por filtração utilizando-se membrana filtrante com diâmetro de poro de 0,45 μm (CAWSE, 1967).

A amostra também deverá ser previamente acidificada ($\text{pH} < 2,0$) com uma solução de HCl 1 M para prevenir a interferência de hidróxidos ou carbonatos em concentrações de 100 a 1.000 mg CaCO_3/L .

Uma correção mais eficaz da interferência da matéria orgânica pode ser realizada pela digestão da amostra com persulfato de potássio a quente (GROSS; BOYD; SEO, 1999; FERREE; SHANNON, 2001), conforme o procedimento descrito no item 22.4. Neste caso, todavia, o nitrogênio orgânico, amônia e nitrito são convertidos totalmente a nitrato e o carbono orgânico a CO_2 , possibilitando a quantificação do teor de nitrogênio total da amostra na forma de nitrato.

18.1.2. INTERFERENTES

Além de matéria orgânica dissolvida, hidróxidos e carbonatos, o nitrito é um forte interferente do método, além de cromo hexavalente [Cr(VI)] e alguns íons inorgânicos. Cloretos em geral não interferem. Substâncias inorgânicas podem ser compensadas por análises independentes, com preparação de curvas de correção individuais. Nitrito pode ser eliminado pela adição de ácido sulfâmico, conforme proposto por Cawse (1967) e Norman, Edbgerg e Stucki (1985).

18.1.3. MATERIAL

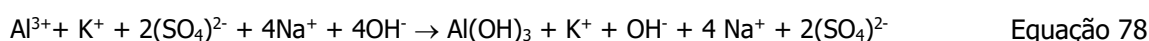
- Aparato de filtração a vácuo ou filtro de seringa com membrana de 0,45 µm de poro (**Atenção:** Testar previamente os filtros para verificar contaminação do filtrado por nitrato!)
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Chapa aquecedora e agitadora
- Espectrofotômetro (UV-Vís)
- Termômetro
- Estufa a 103-105°C
- Micropipetas de 1,0 e 10,0 mL
- Balões volumétricos de 100, 250 e 1.000 mL
- Copos de bquer de 500 e 2.000 mL
- Provetas de vidro graduadas de 100, 250 e 500 mL
- Cubetas de quartzo com passo óptico de 1 cm
- Tubos de ensaio com tampa (ou tubos de DQO padrão HACH®)
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 15 mL
- Sulfato de Alumínio e Potássio dodecahidratado – AlK(SO₄)₂.12H₂O P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A. (em lentilhas)
- Nitrato de Sódio – NaNO₃ P.A.
- Ácido Clorídrico – HCl P.A.
- Ácido Sulfâmico – NH₂SO₃H P.A.

18.1.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO (2 M)

Dissolver 20 g de NaOH em 150 mL de água deionizada. A dissolução deverá ser conduzida **cuidadosamente**, uma vez que a reação é extremamente exotérmica. Utilizar luvas, óculos de segurança e trabalhar na capela, sob exaustão. Após o resfriamento da solução à temperatura ambiente, transferir para balão volumétrico de 250 mL e completar com água deionizada.

18.1.5. PREPARO DA SUSPENSÃO DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO (ADAPTADO DE CAWSE, 1967)

- (a) Transferir 125 g de sulfato de alumínio e potássio [AlK(SO₄).12H₂O] para bquer de vidro de 2.000 mL e adicionar 1.000 mL de água deionizada ou ultrapura (Milli-Q®). Agitar para dissolver o reagente e aquecer a mistura até 60°C (acompanhar com termômetro). Em seguida, adicionar lentamente, em agitação, 250 mL da solução de NaOH 2 M. Ocorrerá a seguinte reação:



- (b) deixar a suspensão formada sedimentar em repouso de um dia para o outro, à temperatura ambiente, descartando o sobrenadante;

- (c) lavar o precipitado com água deionizada para remoção dos íons em solução por mais 2 vezes, no mínimo, adicionando cerca de 500 mL de água deionizada por vez, misturando, deixando decantar (por cerca de 2 h) e descartando o sobrenadante (remover o máximo de sobrenadante possível);
- (d) ao final, armazenar a suspensão concentrada em frasco devidamente identificado.

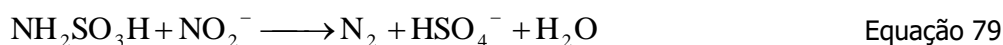
18.1.6. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO (1 M)

- (a) Em béquer de vidro de 500 mL colocar cerca de 300 mL de água deionizada;
- (b) na capela, sob exaustão e usando proveta de vidro graduada, adicionar, **devagar e com cuidado**, 84 mL de ácido clorídrico concentrado. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido;
- (c) aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL;
- (d) completar o volume com água deionizada e armazenar em frasco devidamente identificado.

18.1.7. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÂMICO (2%)

Uma vez que o íon nitrito (NO_2^-) apresenta absorção similar ao nitrato no comprimento de onda utilizado, amostras contendo NO_2^- exigem um pré-tratamento consistindo na adição de ácido sulfâmico para eliminação dessa interferência (CAWSE, 1967; NORMAN; EDBERG; STUCKI, 1985).

Em solução ácida, o nitrito reagirá com o ácido sulfâmico, liberando N_2 gasoso e íons bissulfato, conforme a equação abaixo:



Para isso, preparar uma solução de ácido sulfâmico ($\text{NH}_2\text{SO}_3\text{H}$) 2% dissolvendo 5,0 g do reagente com água deionizada em balão volumétrico de 250 mL (20 g/L) **CUIDADO: Manusear com luvas e evitar o contato do reagente com a pele!** Armazenar a solução refrigerada, ao abrigo da luz, em frasco devidamente tampado e identificado. 0,5 mL dessa solução em 5 mL de amostra é capaz de eliminar até cerca de 650 mg/L de nitrito (~ 200 mg/L de N-NO_2^-). Para análise de amostras que apresentem nitrito, submeter ao mesmo tratamento o branco e os padrões da curva de calibração.

18.1.8. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,5 – 7,0 MG/L)

- (a) Secar cerca de 1,0 g de NaNO_3 (MM: 85 g/mol) em estufa a 103-105°C, por 2 h, no mínimo;
- (b) preparar uma solução padrão (solução mãe) de 100 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$. Para tanto, dissolver 0,6071 g de NaNO_3 (adequadamente resfriado em dessecador) em água deionizada e diluir para 1.000 mL em balão volumétrico;
- (c) preparar os pontos da curva de calibração diluindo a solução padrão em balões volumétricos de 100 mL. Os volumes da solução padrão para cada um dos pontos da curva de calibração estão apresentados na Tabela 24. **ATENÇÃO: É fundamental que cada ponto da curva seja feito em triplicata.** Isso significa preparar também as diluições em triplicatas!
- (d) efetuar a leitura dos padrões conforme o mesmo procedimento descrito para as amostras, no item 18.1.9 a seguir;
- (e) construir a curva de calibração ajustando as concentrações padrões em função dos respectivos valores de absorbância final, calculados conforme a Equação 80, mostrada mais adiante.

Tabela 24: Volumes requeridos da solução mãe para preparar a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg N-NO ₃ ⁻ /L)	Volume (µL) da solução mãe para 100 mL da solução de calibração
0,0 (branco)	0
0,5	500
1,0	1.000
2,0	2.000
3,0	3.000
4,0	4.000
5,0	5.000
6,0	6.000
7,0	7.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

18.1.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO

- (a) Filtrar as amostras em membrana de 0,45 µm e diluir com água deionizada, se necessário;
- (b) transferir 10 mL dessa amostra filtrada para tubo tipo *falcon* de 15 mL e adicionar 0,5 mL da suspensão de hidróxido de alumínio [Al(OH)₃];
- (c) tampar, agitar vigorosamente e deixar em repouso por cerca de 2 h para que a matéria orgânica seja sedimentada (ou centrifugar a 3.500 – 5.000 rpm por 5 min, no mínimo);
- (d) após este período, filtrar o sobrenadante da amostra em membrana de 0,45 µm, podendo reutilizar a mesma membrana (ou o mesmo filtro de seringa, se for o caso);
- (e) transferir 5 mL desse filtrado para tubo de DQO e adicionar 0,5 mL da solução de ácido sulfâmico 2% (NH₂SO₃H – 20,0 g/L), tampar o tubo e agitar por cerca de 1 min (esse passo poderá ser omitido caso a amostra não apresente nitrito. Nesse caso, uma curva de calibração específica deverá ser levantada para essas amostras);
- (f) na sequência, adicionar 0,1 mL de HCl 1 M e homogeneizar;
- (g) preparar um teste em branco com água deionizada e submeter aos mesmos passos que as amostras (desde o item 18.1.9 (b) em diante);
- (h) transferir uma alíquota da amostra tratada para cubeta de quartzo e efetuar a leitura da absorbância em dois comprimentos de onda: 220 nm (nitrato + matéria orgânica) e 275 nm (apenas matéria orgânica);
- (i) o branco deve ser utilizado para zerar o espectrofotômetro nos dois comprimentos de onda;
- (j) subtrair o dobro da leitura de absorbância a 275 nm da leitura a 220 nm, obtendo assim a absorbância devida à concentração de nitrato na amostra:

$$\text{Absorbância NITRATO} = (\text{Absorbância } 220 \text{ nm}) - 2 \times (\text{Absorbância } 275 \text{ nm}) \quad \text{Equação 80}$$

- (k) interpolar o resultado na curva de calibração.

ATENÇÃO: A leitura em 275 nm não deve exceder 10% do valor lido em 220 nm! Se isto ocorrer, significa que a matéria orgânica não foi suficientemente removida. Deve-se repetir o preparo da amostra adicionando-se um volume maior da suspensão de Al(OH)₃ (nesse caso, corrigir o resultado da análise de acordo com a diluição adicional efetuada).

18.2. NITRATO – MÉTODO DO ÁCIDO CROMOTRÓPICO

(WEST; RAMACHANDRAN, 1966)

18.2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

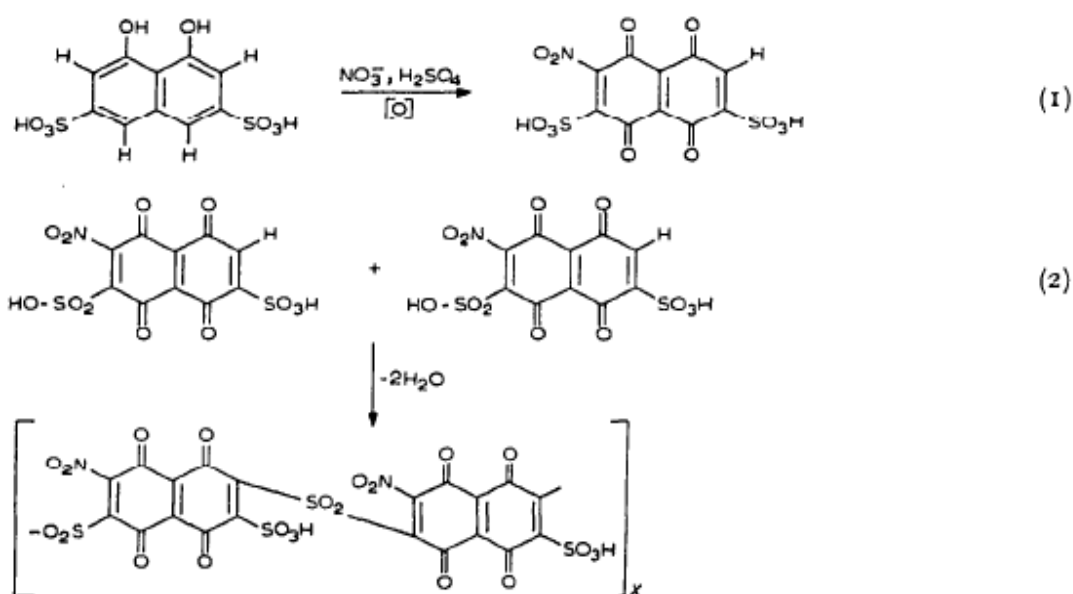
O método baseia-se na reação do íon nitrato com ácido cromotrópico (1,8-dihidroxi-3,6-naftalenodissulfônico ácido) na presença de ácido sulfúrico forte. Embora o mecanismo de reação não esteja claro, testes espectrométricos indicam a formação um derivado sulfonil polimerizado (Figura 9). De acordo com Robinson e Hsu (1969) a coloração amarela é mais intensa com H_2SO_4 entre 69 – 73%.

O método original prevê a adição de ureia, sulfito de sódio e solução de antimônio para remoção de interferentes como nitrito, agentes oxidantes e cloretos.

Embora não conste no *Standard Methods*, esse método foi adotado pela HACH® (NitraVer X) no fornecimento de seus kits para determinação de nitrato (até 30 mg $N-NO_3^-/L$), os quais tem sido empregados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP).

O método HACH® (*Method 10020*) é adequado para amostras contendo até cerca de 1.000 mg/L de cloretos. Presença do íon nitrito (NO_2^-) acima de 12 mg/L deverá ser removida através de pré-tratamento com ureia, para o favorecimento da volatilização do NO_2^- sob a forma de nitrogênio gasoso (N_2).

Figura 9: Mecanismo de reação proposto entre o nitrato e o ácido cromotrópico, na presença de ácido sulfúrico.



Fonte: West e Ramachandran (1966).

18.2.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) ou filtro de seringa com membrana de 0,45 μm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro HACH®
- Estufa a 103-105°C
- Micropipeta de 1000 μL
- Proveta de vidro graduada
- Colher dosadora (0,5 g)

- Dispensador automático
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Reagente HACH® NitraVer X (ref. 26053-45)
- Ureia – (NH₂)₂CO P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H₂SO₄ P.A.

18.2.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE H₂SO₄ ~ 70%

Quando necessário, pode-se preparar uma solução de ácido sulfúrico a 70% para ser utilizada no lugar da solução fornecida pela HACH®. Para isso, seguir os passos descritos a seguir:

- Preparar um béquer de vidro de 1.000 mL em banho de água e gelo na capela, sob exaustão, contendo 270 mL de água deionizada (aferir corretamente o volume em proveta graduada);
- transferir, **com cuidado e vagarosamente**, 730 mL de ácido sulfúrico concentrado, aferindo o volume de H₂SO₄ em proveta de vidro graduada. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido;
- aguardar a solução esfriar e armazená-la em frasco de vidro devidamente identificado, com dispensador automático ajustado para dosagem de 8,5 mL.

Observação: A utilização de uma solução de ácido sulfúrico preparada pelo analista exige o levantamento de uma curva de calibração para ser utilizada no lugar da curva própria da HACH®.

18.2.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 – 30 MG/L)

- Secar cerca de 1,0 g de NaNO₃ em estufa a 103-105°C, por 2 h, no mínimo;
- preparar uma solução padrão (solução mãe) de 100 mg N-NO₃⁻/L. Para isso, dissolver 0,6071 g de NaNO₃ (adequadamente resfriado em dessecador) em água deionizada e diluir para 1.000 mL em balão volumétrico (solução mãe);
- preparar os pontos da curva de calibração diluindo a solução padrão em balões volumétricos de 100 mL, conforme apresentado na Tabela 25. Preparar cada ponto da curva em triplicata (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração);
- realizar a leitura seguindo os mesmos procedimentos descritos para as amostras (item 18.2.6).

Tabela 25: Volumes requeridos da solução mãe para preparar a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg N-NO ₃ ⁻ /L)	Volume (mL) da solução mãe para diluição em 100 mL
0,0 (branco)*	0
1,0	1,0
5,0	5,0
10,0	10,0
15,0	15,0
20,0	20,0
25,0	25,0
30,0	30,0

*Zerar o espectrofotômetro com 1 mL de água deionizada em 8,5 mL da solução H₂SO₄ 70% antes da adição do reagente do sachê.

Fonte: Os autores.

18.2.5. PRÉ-TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DE NITRITO

- (a) Para amostras que apresentem concentrações de nitrito acima de 12 mg/L e até, no máximo, 100 mg/L, adicionar, com auxílio de colher dosadora, cerca de 0,5 g de ureia a 10 mL de amostra;
- (b) manter em agitação magnética até a dissolução completa do reagente;
- (c) em seguida, proceder à análise como de costume;
- (d) a ureia dissolvida na amostra reagirá com o ácido sulfúrico, produzindo ácido sulfâmico, o qual é responsável pela eliminação do nitrito (caso presente) na forma de N₂.

18.2.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO

- (a) Filtrar um volume adequado de amostra em membrana de 0,45 µm para remover sólidos em suspensão e diluir com água deionizada, se necessário;
- (b) adicionar 1 mL da amostra filtrada ou solução padrão a 8,5 mL de solução de ácido sulfúrico ~ 70% em tubo de DQO;
- (c) tampar e homogeneizar por inversão suave do tubo (10 vezes) para evitar a formação de microbolhas em excesso;
- (d) ler como branco no programa adequado do espectrofotômetro (410 nm);
- (e) adicionar, em seguida, o conteúdo do sachê do kit HACH® (contém ácido cromotrópico, ureia e metabissulfito de sódio), tampar, homogeneizar por inversão suave do tubo (10 vezes) e acionar o cronômetro (resquícios do reagente no fundo da cubeta não interferem na análise);
- (f) aguardar o tempo adequado para que a reação se complete: 5 min, caso for utilizado o kit completo e a curva pré-instalada da HACH® (*Method 10020*); ou 10 min, caso for utilizado apenas o sachê com o reagente HACH®, e a solução de H₂SO₄ ~ 70% e curva de calibração preparadas pelo analista;
- (g) efetuar, em seguida, a leitura da amostra no espectrofotômetro.

Observações:

1) *Amostras preservadas por acidificação devem ser convenientemente neutralizadas antes da realização da análise. Não acidificar amostras contendo nitrito antes de armazenar*

2) *Não deixar as amostras preparadas diretamente sob a luz do sol.*

3) *Caso haja formação de microbolhas em excesso, segurar o tubo tampado na horizontal e ir girando vagarosamente até que todas as bolhas se dissipem. Deixar o precipitado sedimentar para efetuar a leitura.*

18.3. NITRATO + NITRITO – MÉTODO DA REDUÇÃO COM CÁDMIO

(Modificado de AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

18.3.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O presente método consiste na redução dos íons nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) por meio do contato da amostra com cádmio metálico tratado com sulfato de cobre (cádmio coperizado). O nitrito resultante, juntamente com o nitrito pré-existente na amostra, quando for o caso, é determinado através da reação de diazotização do nitrito com a sulfanilamida, seguida pelo acoplamento com o dicloridrato de n-(1-naftil)-etilenodiamina. O complexo formado apresenta coloração rosada e sua absorvância é proporcional à concentração de N- NO_3^- formado na amostra.

Uma vez que o resultado da análise representa o somatório das concentrações de N- NO_3^- e N- NO_2^- da amostra, essa soma também pode ser denominada de nitrogênio oxidado total (NTO).

O nitrito, por sua vez, pode ser determinado separadamente, omitindo-se a etapa de redução com cádmio. Dessa forma, as concentrações de N- NO_2^- podem ser subtraídas das concentrações correspondentes de NTO para obtenção das concentrações originais de nitrato (N- NO_3^-) na amostra em questão.

Usualmente o método de redução por cádmio é realizado pela passagem da amostra em uma coluna de vidro contendo cádmio coperizado empacotado (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Todavia, a confecção da coluna de vidro, a necessidade do manuseio do cádmio com risco de contaminação para o analista, bem como os problemas decorrentes do entupimento e saturação da coluna, tornam a sua aplicação problemática. Como alternativa simplificada, alguns trabalhos sugerem que a etapa de redução do nitrato a nitrito seja efetuada por meio da agitação da amostra com limalhas ou grãos de cádmio, o que pode ser realizado sob diferentes condições experimentais (WU et al., 2016; GAUGUSH; HEATH, 1984; JONES, 1984; ELLIOTT; PORTER, 1971). Essa estratégia pode ser facilmente adotada com o auxílio do reagente comercial disponibilizado pela HACH® (NitriVer 6).

Já para a determinação do nitrito total na amostra após a redução induzida pelo cádmio em pó, outro reagente comercial pode ser empregado (NitriVer 3), seguido da leitura em espectrofotômetro com curva própria da HACH® (*Method 8192*). Caso contrário, uma alíquota da amostra após a etapa de redução pode ser submetida ao método para determinação de nitrito anteriormente apresentado (item 17), com utilização das soluções reagentes e curva de calibração preparadas pelo próprio analista.

18.3.2. INTERFERENTES

Íons cloretos (Cl^-) em excesso ($> 100 \text{ mg/L}$) podem comprometer o resultado da análise. Para contornar esse problema, preparar uma curva de calibração com os padrões em meio contendo NaCl na mesma concentração de cloretos esperada para as amostras.

Cálcio ($> 100 \text{ mg/L}$) e ferro férrico (Fe^{3+}) interferem na análise. Interferências devidas ao ferro podem ser evitadas por dosagem de EDTA à amostra.

Cloro residual, caso presente, deve ser removido imediatamente após a coleta da amostra por meio da dosagem de uma solução de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 3,5 \text{ g/L}$). 1 mL dessa solução é suficiente para remover 1 mg/L de cloro residual em 500 mL da amostra.

ATENÇÃO: Amostras preservadas por acidificação deverão ser neutralizadas (pH $\sim 7,0$) antes da realização da análise. Amostras contendo nitrito não devem ser acidificadas para armazenamento.

Amostras contendo concentrações de NTO ($= \text{N-NO}_2^- + \text{N-NO}_3^-$) acima dos 0,5 mg/L devem ser diluídas previamente ao procedimento analítico.

18.3.3. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 μm de poro
- Espectrofotômetro HACH®
- Estufa a 103-105°C
- Cronômetro digital
- Medidor de pH de bancada
- Micropipetas de 100, 1.000 e 10.000 μL
- Pipeta de Pasteur
- Balões volumétricos de 100 e 1.000 mL
- Cilindro de vidro graduado de 25 mL com tampa esmerilhada
- Cubeta de vidro redonda com passo óptico de 2,5 cm (cubeta de 10 mL da HACH®)
- Reagente HACH® NitraVer 6 (ref. 21072-49) para redução de nitrato por cádmio coperizado em pó
- Reagente HACH® NitriVer 3 (ref. 21071-69) para determinação do nitrito total formado
- Soluções para ajuste do pH (HCl 1 M e NH_4OH 1 M) preparadas conforme o item 17.6
- Nitrato de Sódio – NaNO_3 P.A.

Observação: *Pela alta sensibilidade do método de determinação de nitrito, utilizar apenas água ultrapura (Milli-Q®) isenta de íons nitrito e nitrato no preparo das soluções reagentes, padrões e na diluição das amostras.*

18.3.4. PADRÕES DE VERIFICAÇÃO (N-NITRATO)

Para verificar a efetividade da redução de nitrato pelo reagente comercial NitraVer 6, preparar alguns padrões de verificação contendo nitrato dentro da faixa de análise do método (0,01 a 0,50 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$). Submeter os padrões ao mesmo procedimento descrito para as amostras (item 18.3.6) e comparar os resultados observados com os resultados esperados.

Abaixo seguem os passos para preparo da solução padrão de nitrato, bem como para a confecção de alguns padrões de verificação cobrindo a faixa de calibração do método:

- (a) Secar cerca de 1,0 g de nitrato de sódio (NaNO_3) em estufa a 103-105°C, por 2 h, no mínimo;
- (b) preparar uma solução estoque contendo 100 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$. Para tanto, dissolver 0,6071 g de NaNO_3 (adequadamente resfriado em dessecador) em água ultrapura (Milli-Q®) e diluir para 1.000 mL em balão volumétrico;
- (c) diluir 10 mL da solução estoque em balão volumétrico de 100 mL, completando com água Milli-Q®. Essa solução mãe deverá conter 10 mg/L de $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ (10.000 $\mu\text{g}/\text{L}$);
- (d) preparar os pontos da curva de verificação diluindo a solução mãe em balões volumétricos de 100 mL. Os volumes da solução mãe para cada um dos pontos da curva estão apresentados na Tabela 26. Preparar, ao menos, duplicatas de cada ponto escolhido;
- (e) efetuar o tratamento e leitura dos padrões de verificação conforme o mesmo procedimento descrito para as amostras, no item 18.3.6;

- (f) vale lembrar que as concentrações de nitrito formado após a redução com cádmio (em termos de N-NO_2^-) deverão ser equivalentes às concentrações de nitrato (em termos de N-NO_3^-) inicialmente presentes em cada amostra padrão;
- (g) ajustar a curva de calibração do equipamento caso sejam notadas pequenas variações entre os valores reais e os medidos.

Tabela 26: Volumes requeridos da solução mãe para preparar a curva de verificação.

Concentrações estimadas ($\mu\text{g N-NO}_3^-/\text{L}$)	Volume (μL) da solução mãe para 100 mL da solução de calibração
0 (branco)	0,0
10	100
100	1.000
200	2.000
300	3.000
400	4.000
500	5.000

Fonte: Os autores.

18.3.5. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (N-NITRITO)

Caso sejam utilizadas soluções reagentes próprias para a análise de nitrito, bem como para utilização do kit HACH® NitriVer 3 em espectrofotômetro de outro fabricante, a curva de calibração deverá ser levantada pelo analista, com preparo das soluções padrões de nitrito em triplicatas.

Para isso, preparar os padrões seguindo os passos apresentados anteriormente, na seção referente à análise de nitrito (item 17), e submetê-los ao mesmo procedimento descrito para as amostras, no item 18.3.6 a seguir.

Plotar as absorbâncias obtidas contra as concentrações de NOT (equivalentes às concentrações de N-NO_2^- de cada padrão – Tabela 23), construindo assim a curva de calibração.

Na sequência, realizar o procedimento de verificação do método de redução com alguns padrões de nitrato, conforme descrito acima (item 18.3.4). Ajustar a curva de calibração caso sejam notadas pequenas variações entre os valores reais e os medidos.

18.3.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRATO + NITRITO (10 – 500 $\mu\text{g NOT/L}$)

- (a) Filtrar previamente um volume adequado de amostra em membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e diluir com água Milli-Q®, se necessário;
- (b) com auxílio de pipeta de Pasteur, ajustar o pH da amostra para próximo de 7,0 utilizando as soluções de HCl 1 M e/ou NH_4OH 1 M, anteriormente preparadas (item 17.6);
- (c) transferir 15 mL de amostra filtrada para cilindro de vidro graduado de 25 mL;
- (d) adicionar o conteúdo completo do sachê HACH® (NitriVer 6) e tampar adequadamente com tampa de vidro esmerilhada. **CUIDADO: O reagente contém Cádmio – Manusear com luvas e evitar a inalação e o contato com a pele!**
- (e) acionar o cronômetro e agitar vigorosamente o cilindro durante 3 min;
- (f) passado o intervalo de tempo de agitação, zerar o cronômetro e manter o cilindro em repouso durante 2 min (resquícios do reagente no fundo do cilindro não interferem na análise);

- (g) em seguida, transferir 10 mL da amostra tratada (cuidado para não transferir partículas de cádmio) para cubeta redonda de 10 mL da HACH®;
- (h) adicionar o conteúdo do segundo sachê HACH® (NitriVer 3), tampar a cubeta e agitar suavemente por 30 s;
- (i) aguardar 15 min para o desenvolvimento da reação (coloração rosa aparecerá caso haja presença de nitrato convertido a nitrito na amostra);
- (j) passado o tempo da reação, zerar o espectrofotômetro com o branco (10 mL de amostra filtrada sem adição dos reagentes do método) e efetuar a leitura das amostras na curva pré-instalada da HACH® (*Method 8192*), em comprimento de onda de 507 nm;
- (k) lavar os cilindros graduados e as cubetas imediatamente após o uso para remover todas as partículas de cádmio, descartando adequadamente os resíduos da análise.

Observações:

1) Não deixar as amostras preparadas diretamente sob a luz do sol.

2) Para determinação exclusiva da concentração de nitrato ($N\text{-NO}_3^-$) na amostra, repetir o procedimento acima, omitindo, porém, a etapa de reação com o cádmio (itens (c) a (f)). Determinar a concentração original de nitrito ($N\text{-NO}_2^-$) na amostra e descontar o valor obtido do resultado da análise de NOT ($N\text{-Nitrato} + N\text{-Nitrito}$).

3) Caso seja utilizado o método de determinação de nitrito com reagentes próprios e curva preparada pelo analista, tomar 5 mL de amostra após o tratamento com cádmio em pó (cuidado para não transferir partículas remanescentes) e submeter ao método apresentado anteriormente, no item 17.4 a partir do passo (c) em diante.

19.SULFATO – MÉTODOS TURBIDIMÉTRICOS

19.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O íon sulfato, em meio ácido, é precipitado por cloreto de bário, formando micro-cristais uniformes de sulfato de bário em suspensão coloidal, conforme a equação a seguir:



A determinação da concentração de sulfato em uma amostra é feita através da medida da absorção de luz pela turbidez proporcionada pela suspensão de sulfato de bário.

A metodologia de determinação de sulfato em amostras de água reportada pelas últimas versões do *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) baseia-se no método descrito anteriormente por Rossum e Villarruz (1961), o qual consiste na utilização de uma solução tampão com ácido acético e alta força iônica, seguida da leitura da absorbância da turbidez formada pela adição de cloreto de bário em 420 nm, conforme o procedimento apresentado no item 19.2.

Na experiência prática do LPB, bons resultados também foram obtidos empregando-se a metodologia proposta pela EPA (*United States Environmental Protection Agency*), a qual já foi descrita em versões anteriores do *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1975), e é baseada na utilização de uma solução condicionadora (mistura de etanol, glicerol, ácido clorídrico e NaCl) em conjunto com a leitura da absorbância da turbidez formada pelo sulfato de bário em 420 nm (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986). Tal metodologia, descrita no item 19.3, além de exigir um menor número de reagentes, é caracterizada pela melhor linearidade da curva de calibração, o que confere uma maior confiabilidade ao resultado. No procedimento em questão, etanol é utilizado para diminuir a solubilidade do sulfato de bário, enquanto glicerol é empregado para favorecer a estabilidade da suspensão coloidal formada. Ácido clorídrico é dosado para garantir a acidificação do meio líquido, viabilizando as reações de precipitação, e cloreto de sódio é acrescentado para aumentar a força iônica da mistura, visando à minimização das interferências (ASTM INTERNATIONAL, 2002).

Em ambas as metodologias, coloração e sólidos suspensos na amostra poderão interferir nos resultados. Sólidos em suspensão devem ser removidos previamente por filtração. Já a interferência devida à coloração, se muito menor que a concentração de sulfato, pode ser corrigida utilizando-se, como branco, a própria amostra antes da adição de cloreto de bário.

Silicatos em concentração superior a 500 mg/L precipitarão com o bário, interferindo positivamente. Elevada quantidade de matéria orgânica dissolvida também poderá afetar a precipitação do sulfato de bário.

Mesmo baixas concentrações de polifosfatos (~ 1 mg/L) podem inibir a formação do sulfato de bário. Presença de alumínio e polímeros poderá prejudicar a uniformidade da turbidez. Concentrações de cloretos acima dos 5.000 mg/L poderão interferir negativamente na análise.

Caso sulfeto esteja presente, as amostras devem ser analisadas o quanto antes, para evitar que a oxidação do sulfeto dissolvido pelo oxigênio atmosférico não resulte em uma interferência positiva na determinação da concentração de sulfato. Não sendo possível realizar a análise imediatamente, acidificar a amostra para pH entre 3,0 e 4,0 com algumas gotas de uma solução de HCl diluído e manter sob fluxo de N₂ durante cerca de 15 min, ou em agitação magnética vigorosa, para a eliminação do H₂S em solução. Lembrar de neutralizar convenientemente a amostra antes de proceder à análise.

CUIDADO: O sulfeto de hidrogênio é tóxico! Realizar estes procedimentos na capela, com a exaustão ligada!

A análise de uma amostra com valor médio de 7,45 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ apresentou o desvio padrão de 0,13 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ e coeficiente de variação de 1,7%. Duas amostras preparadas com sulfato apresentaram recuperações de 85% e 91% (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

19.2. MÉTODO DO TAMPÃO ACETATO

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

19.2.1. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 μm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Estufa a 103-105°C
- Micropipetas de 1.000 μL e de 5 mL
- Cubeta de vidro redonda com passo óptico de 2,5 cm (cubeta de 10 mL da HACH®)
- Colher de medida (0,5 g) ou espátula dosadora
- Acetato de Sódio trihidratado – $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Ácido Acético glacial – CH_3COOH P.A.
- Cloreto de Magnésio hexahidratado – $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Nitrato de Potássio – KNO_3 P.A.
- Cloreto de Bário di-hidratado – $\text{BaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A. (Recomenda-se utilizar cloreto de bário com granulometria entre 20 e 30 mesh para formação mais homogênea da suspensão)
- Sulfato de sódio anidro – Na_2SO_4 P.A.

19.2.2. SOLUÇÃO TAMPÃO A (PARA AMOSTRAS COM CONCENTRAÇÃO DE 10 – 60 $\text{MG SO}_4^{2-}/\text{L}$)

- (a) Em béquer de 1.000 mL, adicionar 500 mL de água deionizada;
- (b) dissolver 30 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- (c) dissolver 5 g de acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
- (d) dissolver 1 g de nitrato de potássio (KNO_3);
- (e) adicionar 20 mL de ácido acético (CH_3COOH);
- (f) transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar com água deionizada.

19.2.3. SOLUÇÃO TAMPÃO B (PARA AMOSTRAS COM CONCENTRAÇÃO ≤ 10 $\text{MG SO}_4^{2-}/\text{L}$)

- (a) Em béquer de 1.000 mL, adicionar 500 mL de água deionizada;
- (b) dissolver 30 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- (c) dissolver 5 g de acetato de sódio ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$);
- (d) dissolver 1 g de nitrato de potássio (KNO_3);
- (e) dissolver 0,111 g de sulfato de sódio (Na_2SO_4);
- (f) adicionar 20 mL de ácido acético (CH_3COOH);

- (g) transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar com água deionizada.

19.2.4. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE SULFATO (1.000 MG/L)

- (a) Pesar com exatidão 1,479 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), previamente seco em estufa a 103-105°C por 2 h, no mínimo, e resfriado em dessecador;
- (b) transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) manter em agitação magnética até a completa dissolução do reagente.

19.2.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO

A Solução Tampão a ser utilizada durante a análise é função da concentração de sulfato presente na amostra. Para amostras com concentrações superiores a 10 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$, utilizar a Solução Tampão A. Em amostras com concentrações inferiores ou próximas a 10 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$, utilizar a Solução Tampão B.

Filtrar amostras com sólidos em suspensão ou turbidez em membrana com diâmetro de poro de 0,45 μm e seguir os passos elencados a seguir:

- (a) Medir 10 mL de amostra já diluída, caso necessário, e transferir para cubeta redonda de vidro com passo óptico de 2,5 cm (cubeta de 10 mL da HACH®);
- (b) adicionar 2 mL da Solução Tampão A ou B (conforme o caso), tampar e misturar manualmente por inversão do tubo;
- (c) para correção de cor ou turbidez da amostra, utilizar como branco a própria amostra com a solução tampão antes da adição do cloreto de bário;
- (d) após zerar o espectrofotômetro, adicionar cerca de 0,2 g de cloreto de bário à amostra;
- CUIDADO: Usar luvas e evitar o contato do sal de bário com a pele!**
- (e) proporcionar a mistura rápida agitando vigorosamente o tubo durante cerca de 1 min;
- (f) deixar descansar, cronometrando o tempo imediatamente;
- (g) medir a absorvância após 5 min em comprimento de onda de 420 nm.

Observações:

1) Quando for utilizado o reagente comercial da HACH® para análise de sulfato por turbidimetria (Method 8051 – 2 a 70 mg $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$), omitir a adição da solução tampão. Transferir 10 mL da amostra filtrada para a cubeta, zerar o equipamento com a própria amostra e inserir o conteúdo do sachê (contém cloreto de bário e ácido cítrico). Tampar e agitar manualmente para dissolver (resquícios do reagente no fundo da cubeta não interferem na análise). Ler, após 5 min, na curva própria da HACH® (450 nm) instalada no espectrofotômetro.

2) O preparo de novas soluções tampão exige o levantamento de novas curvas de calibração!

3) Caso ocorra deposição de sulfato de bário na superfície do vidro, deixando a cubeta com aspecto esbranquiçado, lavar com solução de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguar abundantemente com água deionizada antes do uso.

19.2.6. LEVANTAMENTO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO

19.2.6.1. CURVA ALTA – PARA AMOSTRAS COM CONCENTRAÇÃO DE **10 – 60 MG SO₄²⁻/L**

Preparar as soluções padrões de sulfato (em balões de 50 mL) partindo da solução estoque, conforme indicado na Tabela 29. Usar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Ler os padrões da curva de calibração utilizando a Solução Tampão A e seguindo os mesmos passos descritos anteriormente para as amostras (item 19.2.5).

Tabela 27: Relação das concentrações e alíquotas da solução estoque para o traçado da curva alta.

Concentrações estimadas (mg Sulfato/L)	Alíquota da solução estoque (µL) para diluição em balão volumétrico de 50 mL
0,0 (branco)*	0
10,0	500
20,0	1.000
30,0	1.500
40,0	2.000
50,0	2.500
60,0	3.000

*Zerar o espectrofotômetro com 10 mL de água deionizada + 2 mL da solução tampão A antes da adição do cloreto de bário.

Fonte: Os autores.

19.2.6.2. CURVA BAIXA – PARA AMOSTRAS COM CONCENTRAÇÃO DE **1 – 10 MG SO₄²⁻/L**

Preparar as soluções padrões de sulfato (em balões de 100 mL) partindo da solução estoque, conforme indicado na Tabela 28. Usar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Ler os padrões da curva de calibração utilizando a Solução Tampão B e seguindo os mesmos passos descritos anteriormente para as amostras (item 19.2.5). Após zerar o espectrofotômetro, adicionar o cloreto de bário também ao teste em branco e plotar a absorbância obtida por ele como sendo o primeiro ponto da curva de calibração (0 mgSO₄²⁻/L).

Tabela 28: Relação das concentrações e alíquotas da solução estoque para o traçado da curva baixa.

Concentrações estimadas (mg Sulfato/L)	Alíquota da solução estoque (µL) para diluição em balão volumétrico de 100 mL
0,0 (branco)*	0
1,0	100
2,0	200
4,0	400
6,0	600
8,0	800
10,0	1.000
12,0	1.200

*Zerar o espectrofotômetro com 10 mL de água deionizada + 2 mL da solução tampão B antes da adição do cloreto de bário.

Fonte: Os autores.

Observação: *Recomenda-se que a presente curva de calibração (faixa baixa) não seja estendida para valores além dos indicados pela Tabela acima, uma vez que isso poderia prejudicar a determinação acurada de baixas concentrações de sulfato. Para concentrações maiores, utilizar a solução tampão e a curva padrão específicas da faixa alta.*

19.3. SULFATO – MÉTODO DA SOLUÇÃO CONDICIONADORA

(ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1986; ASTM INTERNATIONAL, 2002)

19.3.1. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 0,45 µm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Estufa a 103-105°C
- Micropipetas de 1.000 e 5.000 µL
- Proveta de vidro graduada
- Béquer de vidro de 1.000 mL
- Balões volumétricos de 50 e 1.000 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Colher de medida pequena
- Funil de vidro pequeno
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A.
- Etanol 96% – C₂H₅OH P.A.
- Glicerina – C₃H₈O₃ P.A.
- Cloreto de Sódio – NaCl P.A.
- Cloreto de Bário di-hidratado – BaCl₂.2H₂O P.A. (Recomenda-se utilizar cloreto de bário com granulometria entre 20 e 30 mesh para formação mais homogênea da suspensão)
- Sulfato de Sódio anidro – Na₂SO₄ P.A.

19.3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE DE SULFATO (1.000 MG/L)

- (a) Pesar com exatidão 1,479 g de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), previamente seco em estufa a 103-105°C por 2 h, no mínimo, e resfriado em dessecador;
- (b) transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) manter em agitação magnética até a completa dissolução do reagente.

19.3.3. PREPARO DA SOLUÇÃO CONDICIONADORA

- (a) Transferir 100 mL de glicerina (126 g) para béquer de vidro de 1.000 mL;
- (b) adicionar 200 mL de etanol (95–99%) seguidos de 600 mL de água deionizada;
- (c) colocar a mistura em agitação magnética vigorosa e aguardar a homogeneização dos reagentes;
- (d) em seguida, na capela, sob exaustão e usando proveta de vidro graduada, adicionar, **cuidadosamente**, 60 mL de ácido clorídrico concentrado e aguardar o resfriamento da solução. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido!
- (e) acrescentar 150 g de cloreto de sódio (NaCl) e manter em agitação magnética vigorosa até a completa dissolução do sal;

- (f) armazenar a solução à temperatura ambiente, em frasco âmbar devidamente identificado;
- (g) essa solução é estável por até 6 meses, devendo ser descartada adequadamente após esse período e substituída por uma nova.

Observação: O preparo de uma nova solução condicionadora exige o levantamento de uma nova curva de calibração!

19.3.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (5 – 80 MG SO₄²⁻/L)

Preparar as soluções padrões de sulfato (em balões de 50 mL) partindo da solução estoque (item 19.3.2), conforme indicado na Tabela 29. Usar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração). Ler os padrões da curva de calibração seguindo os mesmos passos descritos a seguir para as amostras (item 19.3.5).

Tabela 29: Relação das concentrações e alíquotas da solução mãe para o preparo dos padrões.

Concentrações estimadas (mg Sulfato/L)	Alíquota da solução estoque (µL) para diluição em balão volumétrico de 50 mL
0,0 (branco)*	0
5,0	250
10,0	500
20,0	1.000
40,0	2.000
60,0	3.000
80,0	4.000

*Zerar o espectrofotômetro com 4 mL de água deionizada + 0,2 mL da solução condicionadora antes da adição do cloreto de bário.

Fonte: Os autores.

19.3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO

Filtrar as amostras com teor de sólidos em suspensão ou turbidez em membrana com diâmetro de poro de 0,45 µm e seguir os passos descritos a seguir:

- (a) Transferir 4 mL da amostra já diluída, se necessário, ou das soluções padrões para tudo de DQO (para amostras pouco concentradas, ver observações 1 e 2*);
- (b) adicionar 200 µL da solução condicionadora, tampar e misturar manualmente por inversões sucessivas do tubo;
- (c) para correção de cor ou turbidez, lembrar de utilizar como branco a própria amostra contendo a solução condicionadora antes da adição do cloreto de bário e zerar o espectrofotômetro;
- (d) em seguida, com auxílio do funil de vidro, adicionar uma colher dosadora pequena (~ 0,1 g) de cloreto de bário à amostra;

CUIDADO: Usar luvas e evitar o contato do sal de bário com a pele!

- (e) tampar adequadamente e proporcionar a mistura vigorosa em vórtex durante 20 s, com o equipamento ajustado para a velocidade máxima (ver observação 3*);
- (f) após a agitação, dentro de um intervalo de tempo de até 2 min, medir a absorbância em comprimento de onda de 420 nm.

Observações:

1) Apesar de baixa, a solubilidade do $BaSO_4$ em água pode dificultar a determinação de concentrações de sulfato inferiores a 5 mg/L. Para contornar esse inconveniente, adicionar 100 μ L da solução estoque de sulfato (1.000 $mgSO_4^{2-}/L$) em balão volumétrico de 10 mL. Completar o volume do balão com a amostra e submeter ao teste turbidimétrico. Após a leitura, subtrair 10 mg/L do resultado.

2) Caso se suspeite da ocorrência de interferências, diluir a amostra com um volume igual de água deionizada e repetir a determinação. Se for obtido um valor equivalente à metade do valor anteriormente determinado, pode-se considerar que interferências estão ausentes.

3) A metodologia original prescreve a agitação da amostra em vórtex por um intervalo de 1 min. No entanto, na experiência prática do LPB, esse tempo se mostrou demasiadamente impeditivo quando se deseja efetuar a análise de numerosas amostras. Dessa forma, optou-se por um tempo menor de agitação vigorosa (20 s), sendo este tempo aplicado também na confecção da curva de calibração, com a obtenção de resultados satisfatórios.

4) Caso ocorra deposição de sulfato de bário na superfície do vidro, deixando a cubeta com aspecto esbranquiçado, lavar com solução de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguar abundantemente com água deionizada antes do uso.

20. SULFETO

20.1. MÉTODO DO AZUL DE METILENO (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

20.1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Íons sulfetos (S^{2-}) são encontrados frequentemente em águas residuárias oriundas de despejos industriais, e se originam da decomposição de matéria orgânica acoplada à redução do íon sulfato por Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS).

Por ser volátil, principalmente sob condições ácidas, é responsável por odores desagradáveis (mesmo em baixas concentrações), pela corrosão de tubulações metálicas e de concreto, sendo tóxico para a maioria dos microrganismos, para a vida aquática e para os seres humanos.

Pode ser dividido nas seguintes frações:

- **Sulfeto total:** a fração de sulfeto constituída pelas porções de H_2S não ionizado, pelos íons HS^- e S^{2-} dissolvidos, e pelos sulfetos metálicos em suspensão;
- **Sulfeto dissolvido:** a porção que permanece na amostra após remoção do material em suspensão.

Em meio ácido e na presença de um forte agente oxidante (cloreto férrico) os sulfetos reagem com *N,N*-dimethyl-*p*-phenylene diamine produzindo o azul de metileno, um corante azul intenso e solúvel em água, capaz de absorver radiação com comprimento de onda de 664 nm. Fosfato de amônio deve ser adicionado após o desenvolvimento da coloração para remover a interferência causada pela presença do cloreto férrico.

Kloster e King (1977) propuseram uma adaptação da metodologia do azul de metileno, baseada na utilização do reagente *N,N*-diethyl-*p*-phenylene diamine, para obtenção de uma coloração com maior intensidade, e no emprego de dicromato de potássio como agente oxidante, dispensando assim a necessidade da adição de fosfato de amônio. Esse método adaptado (equivalente ao método proposto pelo *Standard Methods*) foi adotado pela HACH® no fornecimento de seus kits (*Method 8131 – 80 a 800 $\mu g S^{2-}/L$*) para determinação de sulfetos totais e dissolvidos, os quais têm sido empregados no Laboratório de Processos Biológicos (LPB/EESC/USP).

Já para a determinação do teor de H_2S em amostras gasosas, um procedimento indireto, idealizado no LPB, encontra-se descrito no item 29 do presente manual, consistindo na coleta e fixação do sulfeto na fase líquida, com a sua posterior análise via método colorimétrico.

20.1.2. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Balança semi-analítica (precisão $\pm 0,01$ g)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro HACH®
- Copos de béquer de vidro de 250 e 500 mL
- Béquer de plástico de 1.000 mL
- Balões volumétricos de 10, 50, 500 e 1.000 mL
- Funil de separação de 500 mL
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 50 mL
- Bastão de vidro

- Funil de vidro
- Micropipetas de 200 e 1.000 μL e de 5 mL
- Proveta graduada de 250 mL
- Pipeta de Pasteur
- Cubetas redondas de vidro com passo óptico de 2,5 cm (cubetas de 10 mL da HACH®)
- Reagentes HACH® para sulfeto: *Sulfide Reagent 1* (ref. 1816-32) e *Sulfide Reagent 2* (ref. 1817-32)
- Acetato de Zinco dihidratado – $\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Cloreto de Alumínio hexahidratado – $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Sulfeto de Sódio nonahidratado – $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ P.A.

20.1.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ACETATO DE ZINCO 1 M

- (a) Em balança analítica e usando béquer de 250 mL, pesar 220 g de acetato de zinco dihidratado;
- (b) com água deionizada, transferir o acetato de zinco para balão volumétrico de 1.000 mL;
- (c) completar o volume e homogeneizar a solução;
- (d) guardar em frasco tampado e devidamente identificado;
- (e) para uso rotineiro, transferir uma quantia dessa solução para um frasco menor com dosador do tipo conta-gotas.

20.1.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 10 M

- (a) Em balança semi-analítica e usando béquer de plástico de 1.000 mL, pesar 400 g de hidróxido de sódio (NaOH);
- (b) na capela, com exaustão ligada, colocar o béquer com hidróxido em banho de água e gelo;
- (c) transferir, **vagarosamente**, cerca de 800 mL de água deionizada, misturando com auxílio de bastão de vidro. **CUIDADO: A reação é extremamente exotérmica! Utilizar luvas e óculos de segurança!**
- (d) ainda na capela, aguardar a solução esfriar até a temperatura ambiente (se esfriar demais, tirar o béquer do banho de gelo e esperar a temperatura estabilizar);
- (e) transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume usando a água da lavagem do béquer da solução;
- (f) guardar em frasco plástico bem fechado e devidamente identificado;
- (g) para uso rotineiro, transferir uma quantia dessa solução para um frasco plástico menor com dosador do tipo conta-gotas.

20.1.5. PREPARO DA SOLUÇÃO DE CLORETO DE ALUMÍNIO (FLOCULANTE)

Devido às características fortemente higroscópicas do cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), diluir, em béquer de 250 mL, 100 g desse reagente (usar o conteúdo de um frasco de 100 g recém-aberto) com 144 mL de água deionizada medida em proveta graduada.

20.1.6. PROCEDIMENTO DE COLETA E PRESERVAÇÃO DA AMOSTRA

Amostras para determinação de sulfetos devem ser coletadas com o mínimo de aeração e agitação, para evitar a volatilização do sulfeto de hidrogênio e a sua oxidação.

ATENÇÃO: É fortemente recomendável a análise imediata da concentração de sulfeto logo após a coleta da amostra. Para preservação (por até algumas horas) do sulfeto total presente na amostra, seguir o procedimento abaixo apresentado:

- (a) Dosar 4 gotas da solução de acetato de zinco (1 M) em tubo *falcon* de 50 mL;
- (b) coletar com cuidado cerca de 50 mL de amostra, evitando turbulência e aeração;
- (c) dosar 3 gotas da solução de hidróxido de sódio (NaOH 10 M) para elevar o pH e favorecer a precipitação do sulfeto de zinco (ZnS) (o pH final deverá ser maior que 9, adicione mais NaOH se necessário);
- (d) encher o recipiente até a borda (não deixar *headspace*), tampar o frasco e misturar suavemente por inversão, deixando em seguida o frasco em repouso;
- (e) quando for efetuar a análise, agitar para ressuspender o precipitado de forma homogênea e retirar rapidamente a amostra;
- (f) transferir para balão volumétrico e proceder à diluição com água deionizada (caso necessário);
- (g) efetuar a análise de sulfeto total conforme descrito no item 20.1.7.

Observação: Para determinação imediata do sulfeto logo após a coleta da amostra basta transferir o volume a ser utilizado para recipiente contendo algumas gotas da solução de acetato de zinco (de preferência, mantendo a ponta da pipeta ou da agulha mergulhada na solução). Diluir, se necessário, em balão volumétrico com água deionizada, e proceder à análise.

20.1.7. DETERMINAÇÃO DO SULFETO TOTAL

- (a) Usando micropipeta, transferir 10 mL de amostra (contendo entre 80 e 800 $\mu\text{g S}^{2-}/\text{L}$) para cubeta HACH® de 10 mL;
- (b) preparar em conjunto com as amostras um branco contendo 10 mL de água deionizada;
- (c) adicionar, com auxílio de micropipeta, 400 μL do reagente 1 (*Sulfide Reagent 1*);
- (d) adicionar, com auxílio de micropipeta, 400 μL do reagente 2 (*Sulfide Reagent 2*);
- (e) tampar e misturar por inversão suave do frasco;
- (f) selecionar a curva da HACH® já instalada no espectrofotômetro (*Method 8131 – 665 nm*) e acionar o cronômetro;
- (g) após 5 min de reação, zerar o equipamento com o branco (preparado no mesmo tempo que as amostras) e efetuar a leitura da concentração de sulfeto total.

Observação: Para corrigir interferências devidas à presença de cor ou turbidez significativa, utilizar o pré-tratamento indicado no item 20.2.10 (próxima seção), para lavagem da amostra antes de realizar o teste colorimétrico.

20.1.8. DETERMINAÇÃO DO SULFETO TOTAL DISSOLVIDO (STD)

Para determinação do sulfeto total dissolvido, toda matéria em suspensão deverá ser previamente removida conforme o procedimento a seguir (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005):

- (a) Adicionar 3 gotas da solução de hidróxido de sódio (NaOH 10 M) em tubo *falcon* de 50 mL;
- (b) transferir um volume de amostra bruta contendo sulfeto até quase atingir a borda do tubo;
- (c) adicionar imediatamente 3 gotas da solução de cloreto de alumínio;

- (d) tampar sem deixar *headspace*;
- (e) agitar vigorosamente por cerca de 1 min para favorecer a floculação;
- (f) deixar repousar até obter um sobrenadante razoavelmente claro. Com floculação adequada, isso pode levar de 5 a 15 min. Não esperar mais tempo do que o necessário!
- (g) transferir uma alíquota do sobrenadante para balão volumétrico contendo algumas gotas da solução de acetato de zinco e proceder às diluições com água deionizada, caso necessário;
- (h) analisar o conteúdo de sulfeto dissolvido conforme os mesmos passos para o sulfeto total (item 20.1.7).

Observação: Uma alternativa para determinação da concentração do sulfeto total dissolvido (STD) consiste em dosar algumas gotas da solução de NaOH imediatamente após a coleta da amostra, de forma a evitar perdas de sulfeto por volatilização. Omitir, nesse primeiro passo, a adição da solução de acetato de zinco. Em seguida, filtrar rapidamente a amostra em filtro de seringa (0,45 µm), descartando um volume inicial e recolhendo o restante diretamente em um recipiente com algumas gotas da solução de acetato de zinco. Efetuar a diluição necessária e proceder à determinação do conteúdo de STD pelo método colorimétrico (item 20.1.7).

20.1.9. CÁLCULO DOS SULFETOS EM SUSPENSÃO

A concentração de sulfeto em suspensão é obtida subtraindo o sulfeto total dissolvido da concentração de sulfeto total no efluente, conforme a equação a seguir.

$$\text{mg S}^{2-}_{\text{SUSPENSO}}/\text{L} = (\text{mg S}^{2-}_{\text{TOTAL}}/\text{L}) - (\text{mg S}^{2-}_{\text{DISSOLVIDO}}/\text{L}) \quad \text{Equação 82}$$

20.1.10. PREPARO DE SOLUÇÃO PADRÃO DE SULFETO

Caso seja necessário preparar uma solução padrão de sulfeto (para construção de curva de calibração ou verificação da confiabilidade do método do azul de metileno), seguir os procedimentos abaixo elencados:

ATENÇÃO: Sulfetos em solução produzem Sulfeto de Hidrogênio (H_2S), um composto volátil extremamente TÓXICO! Nunca acidificar essa solução! **Cuidado!**

Os cristais de sulfeto de sódio apresentam geralmente excesso de água em sua constituição, além de uma camada superficial contaminada com subprodutos (polissulfetos, polithionatos, enxofre elementar e sulfato) da oxidação do sulfeto, o qual reage rapidamente com o oxigênio atmosférico.

Para minimizar esse tipo de problema, o reagente a ser utilizado como padrão (sulfeto de sódio nonaidratado – $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), deve ser armazenado adequadamente em dessecador a vácuo com sílica anidra.

Uma vez que as soluções contendo sulfeto dissolvido também são propensas a uma imediata oxidação pelo oxigênio dissolvido, as soluções estoque e os padrões deverão ser preparadas utilizando-se apenas água de diluição deionizada, desoxigenada e alcalina (daqui em diante chamada apenas de água de diluição).

Para isso, ferver por cerca de 5 min um volume razoável de água deionizada (cerca de 2 litros) e manter sob fluxo gasoso de nitrogênio ou argônio durante o resfriamento (cerca de 15 min).

Ao invés da fervura, a água deionizada também poderá ser mantida em banho de ultrassom durante um período de tempo razoável (20 min), recebendo em seguida fluxo de N_2 ou Ar_2 para a completa eliminação

do oxigênio dissolvido. Em seguida, dosar aproximadamente 1 mL da solução de NaOH 10 M para cada litro de água de diluição.

Preparar a **solução estoque** de sulfeto conforme os passos a seguir:

- (a) Tarar a balança semi-analítica com um balão volumétrico de 500 mL tampado e contendo cerca de 20 mL de água de diluição;
- (b) usando uma colher ou espátula de plástico, de preferência, transferir uma quantia de sulfeto de sódio nonaidratado ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) tirado do fundo do frasco (evitar a camada superficial do reagente em contato com o O_2 atmosférico), tampar o balão e aferir a massa obtida;
- (c) repetir o procedimento até a obtenção de aproximadamente 3,75 g de sulfeto de sódio ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$), completando em seguida o volume do balão com a água de diluição;
- (d) tampar o balão volumétrico e homogeneizar a solução por meio de inversões. **Evitar agitação em excesso!**
- (e) essa solução estoque deverá conter cerca de 1.000 mg S^{2-}/L , dependendo da qualidade do reagente utilizado, e deverá ser armazenada ao abrigo da luz, em frasco hermeticamente fechado e com o mínimo de *headspace* possível, por não mais que 1 semana;
- (f) preparar, em seguida, uma **solução intermediária** (cerca de 10 mg S^{2-}/L) transferindo 5 mL da solução estoque para funil de separação de 500 mL contendo 2 mL da solução de acetato de zinco 1 M;
- (g) encher o funil aproximadamente até a metade com água de diluição, tampar, homogeneizar e aguardar a sedimentação do sulfeto de zinco formado (ZnS) por cerca de 30-40 min;
- (h) recolher, em seguida, o máximo possível do precipitado branco em balão volumétrico de 500 mL, descartando o sobrenadante e completando o volume do balão com água de diluição;
- (i) tampar e homogeneizar o conteúdo do balão por inversões do frasco, retirando imediatamente uma alíquota adequada para efetuar a padronização da solução intermediária, em triplicatas, através do método iodométrico (item 20.2.11), de forma a determinar a concentração real de sulfeto. **Sugestão:** Utilizar 10 mL da solução padrão de iodo para cada 100 mL da solução intermediária, o que deverá resultar em um volume de tiosulfato gasto da ordem de 7,5 mL (esse volume pode variar dependendo da concentração final de sulfeto obtida).

20.1.11. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (80 – 800 $\mu\text{g}/\text{L}$)

Para o preparo dos padrões para a construção (ou verificação) da curva de calibração do método colorimétrico do azul de metileno, preparar uma **solução mãe** contendo 1.000 $\mu\text{g S}^{2-}/\text{L}$, partindo da solução intermediária, padronizada pelo método iodométrico.

Sendo C a concentração real de sulfeto na solução intermediária (em mg/L), aplicar a equação a seguir para determinar o volume de solução intermediária (V, em mL) necessário para diluição em balão volumétrico de 50 mL:

$$V = \frac{50}{C} \quad \text{Equação 83}$$

Diluir o volume V (cerca de 5 mL da solução intermediária) com a mesma água de diluição utilizada no preparo das soluções anteriores. Tampar o frasco e homogeneizar por inversões sucessivas, evitando turbulência em excesso.

Em balões volumétricos de 10 mL, pipetar as alíquotas indicadas na Tabela 30 da solução mãe recém homogeneizada e completar o volume dos balões com água de diluição, utilizando uma pipeta de Pasteur para aferir corretamente o volume. Usar triplicatas (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Tabela 30: Relação das concentrações e alíquotas da solução mãe para o preparo dos padrões.

Concentrações estimadas ($\mu\text{g Sulfeto/L}$)	Alíquota da solução mãe (μL) para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0 (branco)	0
80	800
200	2.000
320	3.200
440	4.400
560	5.600
680	6.800
800	8.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

20.2. SULFETO – MÉTODO IODOMÉTRICO (TITULOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

20.2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Na metodologia iodométrica, o sulfeto presente na amostra é precipitado com Acetato de Zinco na forma de Sulfeto de Zinco (ZnS). Tal precipitado é lavado para a remoção de eventuais impurezas e transferido para um erlenmeyer. O Sulfeto é então oxidado, em meio ácido, por uma solução padrão de Iodo (I_2) em excesso, com formação de enxofre elementar. O Iodo excedente (I_2), por sua vez, é quantificado por titulação com uma solução padronizada de Tiossulfato de Sódio ($Na_2S_2O_3$) na presença de suspensão de amido como indicador, constituindo-se uma titulação de retrocesso.

20.2.2. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Buretas de vidro de 10,00 e 25,00 mL
- Balões volumétricos de 1.000 mL
- Agitador magnético e barra magnética
- Erlenmeyers de 50 e 250 mL
- Espátula dosadora
- Proveta de vidro graduada
- Pipetas volumétricas de 50 ou 100 mL
- Micropipetas de 1.000 μ L
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Hidróxido de Sódio em lentilhas – NaOH P.A.
- Dicromato de Potássio – $K_2Cr_2O_7$ P.A.
- Iodeto de Potássio – KI P.A.
- Iodo – I_2 P.A.
- Tiossulfato de Sódio pentahidratado – $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ P.A.
- Ácido Salicílico – $C_7H_6O_3$ P.A.
- Amido solúvel – $(C_6H_{10}O_5)_n$ P.A.
- Solução de Acetato de Zinco – 1 M (item 20.1.3)
- Solução de NaOH – 10 M (item 20.1.4)

20.2.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 3 M.

- (a) Na capela, com a exaustão ligada e auxílio de proveta de vidro graduada, adicionar **cuidadosamente** 160 mL de H_2SO_4 concentrado a 700 mL de água deionizada em béquer de vidro de 1.000 mL. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido;
- (b) após aguardar o resfriamento, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL;
- (c) completar o volume com água deionizada;
- (d) estocar em frasco de vidro devidamente identificado

20.2.4. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE IODO 0,025 N

- (a) Dissolver de 20 a 25 g de iodeto de potássio (KI) em um pouco de água;

- (b) adicionar 3,2 g de iodo (I₂);
- (c) após a dissolução do iodo, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL por lavagens sucessivas e completar com água deionizada;
- (d) armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado;
- (e) padronizar utilizando a solução de tiosulfato de sódio 0,025 N.

20.2.5. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 0,025 N

- (a) Em balança analítica, pesar 6,205 g de tiosulfato de sódio pentahidratado (Na₂S₂O₃.5H₂O);
- (b) dissolver em cerca de 800 mL de água deionizada e adicionar 0,4 g de NaOH em lentilhas;
- (c) depois de dissolver e resfriar, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL;
- (d) completar o volume com água deionizada;
- (e) padronizar com a solução padrão de dicromato de potássio 0,1 N semanalmente, ou imediatamente antes de usar;
- (f) armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado.

20.2.6. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE DICROMATO DE POTÁSSIO 0,1 N

- (a) Em balança analítica, pesar com exatidão 4,9 g de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇), previamente seco em estufa a 103-105°C por, no mínimo, 2 h antes do uso, e resfriado em dessecador;
- (b) transferir o sal quantitativamente para balão volumétrico de 1.000 mL usando água deionizada;
- (c) homogeneizar a solução e completar o volume;
- (d) agitar bem e armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado.

20.2.7. PREPARO DA SOLUÇÃO INDICADORA DE AMIDO

Dissolver 2,0 g de amido solúvel e 0,2 g de ácido salicílico (conservativo) em 100 mL de água deionizada quente com auxílio de agitação magnética vigorosa.

20.2.8. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO

- (a) Transferir 10 mL da solução de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) 0,1 N para erlenmeyer de 250 mL;
- (b) Adicionar cerca de 80 mL de água deionizada;
- (c) adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄);
- (d) deixar a solução repousar por 6 min no escuro;
- (e) adicionar, em seguida, uma espátula (cerca de 1 g) de KI (iodeto de potássio) livre de iodato;
- (f) titular contra a solução de tiosulfato até o aparecimento de uma coloração amarelo-palha;
- (g) adicionar algumas gotas da solução indicadora de amido e prosseguir a titulação até a viragem do azul para o incolor;
- (h) calcular a normalidade real da solução padrão de tiosulfato conforme equação a seguir:

$$N_{\text{TIOSSULFATO}} = \frac{(V_{\text{DICROMATO}} \times N_{\text{DICROMATO}})}{V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}}}$$

Equação 84

Na qual:

$V_{\text{DICROMATO}}$ = Volume da solução padrão de dicromato de potássio utilizada (mL)

$N_{\text{DICROMATO}}$ = Normalidade da solução padrão de dicromato de potássio (N)

$V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}}$ = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação (mL)

$N_{\text{TIOSSULFATO}}$ = Normalidade corrigida da solução de tiosulfato de sódio (N)

20.2.9. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE IODO

- (a) Transferir 10 mL da solução padrão de tiosulfato para erlenmeyer de 50 mL;
- (b) adicionar 2 mL da solução de ácido sulfúrico 3 M;
- (c) adicionar algumas gotas da solução indicadora de amido;
- (d) titular com a solução padrão de iodo até viragem de incolor para azul;
- (e) calcular a normalidade real da solução padrão de iodo pela equação a seguir:

$$N_{\text{IODO}} = \frac{(V_{\text{TIOSSULFATO}} \times N_{\text{TIOSSULFATO}})}{V_{\text{IODO GASTO}}}$$

Equação 85

Na qual:

$V_{\text{TIOSSULFATO}}$ = Volume da solução padrão de tiosulfato utilizada (mL)

$N_{\text{TIOSSULFATO}}$ = Normalidade real da solução padrão de tiosulfato (N)

$V_{\text{IODO GASTO}}$ = Volume da solução padrão de iodo gasto na titulação (mL)

N_{IODO} = Normalidade corrigida da solução padrão de iodo (N)

20.2.10. COLETA E LAVAGEM DA AMOSTRA

Amostras para determinação de sulfetos devem ser coletadas com o mínimo de aeração e agitação, para evitar a volatilização do sulfeto de hidrogênio e a sua oxidação. É fortemente recomendável a análise imediata da concentração de sulfeto logo após a coleta da amostra.

Uma vez que o método iodométrico para sulfetos pode sofrer interferências causadas por compostos reduzidos, que reagem com o iodo, tais como o tiosulfato, sulfito, iodeto, substâncias orgânicas e sólidos em suspensão, o seguinte procedimento deverá ser adotado para a lavagem da amostra:

- (a) Dosar 8 gotas da solução de acetato de zinco 1 M (preparada conforme apresentado no item 20.1.3) em recipiente com tampa e capacidade para cerca de 100 mL;
- (b) coletar a amostra, enchendo o recipiente quase até a borda;
- (c) dosar 4 gotas da solução de NaOH 10 M (preparada conforme apresentado no item 20.1.4) para elevação do pH (o valor do pH final deverá ser maior que 9, adicionar mais NaOH se necessário);
- (d) tampar sem deixar *headspace* e misturar suavemente por inversão;
- (e) deixar sedimentar em repouso por cerca de 30 min e descartar o sobrenadante, aferindo o seu volume exato em proveta graduada;
- (f) substituir o volume descartado por água deionizada;
- (g) agitar, para ressuspender o precipitado de forma homogênea, e retirar rapidamente a amostra para determinação do sulfeto.

Observação: Esse procedimento também poderá ser utilizado quando houver a necessidade de concentrar o sulfeto, ressuspendendo o precipitado em um volume de água deionizada menor que o do sobrenadante descartado. Dividir, por fim, o resultado obtido na análise pela razão $V_{FINAL} / V_{ORIGINAL}$ (fator de concentração empregado).

20.2.11. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFETO TOTAL

- (a) Transferir para erlenmeyer de 250 mL um volume de solução de iodo 0,025 N estimada* para exceder a quantidade de sulfeto presente na amostra;
- (b) adicionar água deionizada, se necessário, para elevar o volume até 20 mL (volume mínimo para proceder à titulação);
- (c) adicionar 2,0 mL de solução de ácido sulfúrico 3 M;
- (d) com pipeta volumétrica, transferir uma alíquota (50–100 mL, se possível) da amostra homogeneizada para o erlenmeyer, mantendo a ponta da pipeta com a amostra contendo sulfeto submersa na solução de iodo;
- (e) se a cor do iodo desaparecer, adicionar rapidamente mais solução de iodo (anotando o volume) até a cor permanecer;
- (f) sob lenta agitação magnética, titular com a solução padronizada de tiosulfato o excesso de iodo, adicionando algumas gotas da solução de amido quando o ponto final estiver próximo (coloração amarelo-palha) e continuar a dosagem até o desaparecimento da coloração azul;
- (g) determinar a concentração de sulfeto total na amostra a partir da equação a seguir:

$$\text{mgS}^{-2}/\text{L} = \frac{[(V_{\text{IODO}} \times N_{\text{IODO}}) - (V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}} \times N_{\text{TIOSSULFATO}})]}{V_{\text{AMOSTRA}}} \times 16.000 \quad \text{Equação 86}$$

Na qual:

V_{IODO} = Volume da solução padrão de iodo utilizada (mL)

N_{IODO} = Normalidade real da solução padrão de iodo (N)

$V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}}$ = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação (mL)

$N_{\text{TIOSSULFATO}}$ = Normalidade real da solução padrão de tiosulfato de sódio (N)

V_{AMOSTRA} = Volume inicial da amostra (mL)

***Observação:** 1 mL da solução de iodo 0,025 N reage com 0,4 mg de sulfeto (S^{2-}).

21. ENXOFRE ELEMENTAR – MÉTODO TURBIDIMÉTRICO

(GODOI et al., 2019; HART, 1961)

21.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O enxofre elementar (S^0) é um dos intermediários do ciclo biogeoquímico do enxofre, podendo ocorrer em ecossistemas aquáticos, terrestres e reatores biológicos. O S^0 se trata de um composto sólido, não corrosivo, de baixa solubilidade em água e de valor comercial, por suas aplicações na indústria química e de fertilizantes (GODOI et al., 2019).

Os avanços na tecnologia de reatores biológicos têm mostrado a possibilidade de obtenção do enxofre elementar como subproduto de diversas reações mediadas por microrganismos, os quais atuam na transformação de compostos contendo enxofre em variados estados de oxidação.

Dependendo das estratégias utilizadas, o enxofre elementar pode ser encontrado em suspensão coloidal, finamente disperso no meio líquido, sedimentando ou precipitando na forma de aglomerados, ou ainda armazenado intracelularmente.

Na presença de sulfeto dissolvido, predominantemente em amostras com valores de pH de neutro a alcalino, o enxofre elementar pode se combinar com o HS^- , dando origem aos chamadas polissulfetos (S_x^{2-}), moléculas de tamanho variável e que apresentam solubilidade superior em soluções aquosas. Em condições ácidas, as moléculas de polissulfetos são decompostas, liberando o enxofre elementar de volta para o meio líquido.

O método aqui apresentado para a determinação da concentração de enxofre elementar presente em amostras aquosas de reatores biológicos (GODOI et al., 2019) consiste de uma adaptação da metodologia de Hart (1961), originalmente desenvolvida para a quantificação do enxofre proveniente de amostras de solo.

O princípio do método consiste em realizar a separação do enxofre coloidal por filtração em membrana hidrofílica resistente a solvente orgânico (celulose regenerada) com poro de, no máximo, 0,2 μm . Na sequência, acetona é empregada para a dissolução do enxofre elementar. Uma alíquota da solução de enxofre em acetona é misturada em água (20%), levando à formação de uma dispersão coloidal branco-azulada, cuja turbidez é medida em espectrofotômetro nos 420 nm.

Embora etanol também possa ser utilizado como solvente (HART, 1961), a acetona é recomendável por sua maior efetividade e por também garantir a extração do enxofre elementar acumulado intracelularmente, pela maior capacidade de dissolver os constituintes da membrana citoplasmática de bactérias oxidadoras de enxofre (BHADURI; DEMCHICK, 1983).

Em amostras provenientes de reatores sulfetogênicos, uma vez que se espera concentrações significativas de sulfeto dissolvido, a quebra da formação dos complexos de polissulfetos pode ser realizada pela adição de uma solução de ácido clorídrico (GODOI et al., 2019).

21.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de celulose regenerada com diâmetro de poro de, no máximo, 0,2 μm (opcionalmente pode-se empregar um porta filtro – *holder* – para seringa e membrana de celulose regenerada de tamanho compatível com o mesmo)
- Agitador magnético e barra magnética pequena
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Cronômetro digital
- pHmetro digital ou fitas indicadoras
- Espectrofotômetro
- Micropipetas de 5.000 μL
- Pipeta volumétrica de vidro de 1,0 mL
- Pipetas de vidro graduadas de 0,5, 1, 2 e 5 mL
- Pipeta de Pasteur
- Provetas de vidro graduadas de 50, 100 e 500 mL
- Erlenmeyers de 100 e 200 mL
- Copos de bquer de vidro de 100 e 1.000 mL
- Balões volumétricos de 10 e 250 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Pinça metálica pequena
- Acetona – $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$ P.A.
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A.
- Enxofre elementar – S^0 P.A.

21.3. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR (200 MG/L)

- (a) Pesar com exatidão 50,0 mg de enxofre elementar (S^0) em balança analítica;
- (b) transferir quantitativamente para balão volumétrico de 250 mL e completar com acetona;
- (c) tampar e manter em agitação magnética até a completa solubilização do reagente. Podem demorar até algumas horas para se obter uma solução homogênea, com total dissolução do enxofre.

21.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ACIDIFICAÇÃO (HCL 6 M)

Na capela, sob exaustão e usando luvas nitrílicas e óculos de segurança, transferir aos poucos, **com cuidado e lentamente**, usando proveta graduada, 520 mL de HCl concentrado para bquer de vidro de 1.000 mL contendo previamente 480 mL de água deionizada. Aguardar a solução esfriar antes de usar.

21.5. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS CONTENDO SULFETO

- (a) Amostras contendo sulfeto dissolvido, especialmente provenientes de reatores sulfetogênicos, deverão ser acidificadas previamente ao protocolo de extração, para garantir a completa desintegração dos polissulfetos, os quais implicam na solubilização parcial, e portanto, na perda de enxofre elementar durante a filtração;

- (b) transferir 50 mL de amostra para béquer ou erlenmeyer de 100 mL e colocar sob agitação magnética, em velocidade média, na capela, sob exaustão;
- (c) adicionar algumas gotas (variável) da solução de acidificação (HCl 6 M) até obter um valor de pH da ordem de 3,0 ou menos. Ir aferindo com pHmetro ou fita indicadora;
- (d) aumentar a velocidade de agitação da amostra, porém evitando respingos, e manter na capela por cerca de 5 min para liberação do H₂S;
- (e) transferir um volume adequado para proveta graduada e proceder com a filtração da amostra (item 21.6).

21.6. EXTRAÇÃO DO ENXOFRE ELEMENTAR DE AMOSTRAS AQUOSAS

- (a) Filtrar à vácuo em membrana de celulose regenerada de, no máximo, 0,2 µm de poro, um volume conhecido da amostra previamente homogeneizada contendo o enxofre elementar em suspensão coloidal. Recomenda-se a utilização de volumes de amostra maiores que 10 mL e que possuam um conteúdo maior que 300 µg de S⁰ (caso necessário, pode-se utilizar um porta filtro de seringa – *holder* – e membranas filtrantes de celulose regenerada de tamanho compatível, ou cortadas manualmente para adequá-las ao tamanho do porta filtro utilizado);
- (b) com auxílio de uma pinça metálica pequena, transferir cuidadosamente a membrana filtrante contendo o enxofre retido para erlenmeyer e adicionar um volume exato, entre 20 e 50 mL, de acetona (ver observações*). No caso de ter sido utilizado um porta filtro, abrir cuidadosamente o mesmo e garantir que nenhuma parcela do enxofre retido durante a filtragem seja perdida ou permaneça aderida ao interior do porta filtro;
- (c) manter sob agitação suave, garantindo a completa imersão da membrana na acetona, por cerca de 5 min (se necessário, usar agitador magnético com barra pequena em velocidade média);
- (d) após o período de extração, caso a solução de acetona apresente turbidez ou sólidos em suspensão, centrifugar a solução por 5 min a 3.500 rpm.

****Observações:***

1) Para garantir uma extração efetiva, a massa de enxofre retido na membrana não deverá exceder 0,5 mg de S⁰ por mL de acetona. Para amostras contendo de 5,0 a 100,0 mg S⁰/L, o mesmo volume de amostra filtrada pode ser utilizado como volume de acetona para extração sem diluição.

2) Amostras com menor concentração de enxofre podem ser previamente concentradas, filtrando-se um volume maior do que o volume de acetona utilizado na extração. O resultado final da análise é corrigido dividindo-o pelo fator de concentração empregado ($fc = V_{amostra} / V_{acetona}$).

3) Amostras mais concentradas podem ser diluídas filtrando-se um volume menor do que o volume de acetona utilizado. Nesse caso, o resultado da análise é corrigido multiplicando-o pelo fator de diluição empregado ($fd = V_{acetona} / V_{amostra}$).

21.7. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (5 – 100 MG S⁰/L)

Preparar as soluções padrões de enxofre em acetona (em balões de 10 mL) partindo da solução estoque (item 21.3), conforme indicado na Tabela 31. Transferir os volumes com auxílio de pipetas de vidro graduadas e usar pipeta de Pasteur para completar o volume dos balões com acetona. Usar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração). Ler os padrões da curva de calibração seguindo os mesmos passos descritos a seguir para as amostras (item 21.8).

Tabela 31: Relação das concentrações e alíquotas da solução mãe para o preparo dos padrões.

Concentrações estimadas (mg S⁰/L)	Alíquota da solução estoque (mL) para diluição em balão volumétrico de 10 mL
0,0 (branco)*	0
5,0	0,25
10,0	0,50
25,0	1,25
50,0	2,50
75,0	3,75
100,0	5,00

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

21.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ENXOFRE ELEMENTAR

- (a) Com pipeta de vidro volumétrica, transferir 1,0 mL da solução de acetona contendo o enxofre elementar dissolvido para tubo de DQO contendo 4,0 mL de água deionizada;
- (b) para o preparo do branco, transferir 1,0 mL de acetona P.A. para tubo de DQO contendo 4,0 mL de água deionizada;
- (c) tampar o tubo e agitar gentilmente com algumas inversões sucessivas;
- (d) armazenar os tubos ao abrigo da luz e aguardar a formação da turbidez por, exatamente, 1 hora;
- (e) medir a absorbância final em comprimento de onda de 420 nm, zerando o espectrofotômetro com o branco (água deionizada no lugar da amostra).

22. FÓSFORO – MÉTODO DO ÁCIDO ASCÓRBICO (ESPECTROFOTOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

22.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Fosfatos são as principais fontes de fósforo em águas naturais e residuárias, bem como na matéria orgânica. Em meio ácido, molibdato de amônio com tartarato de potássio e antimônio reagem com o íon ortofosfato (PO_4^{3-}), formando ácido fosfomolibdico (de coloração amarela). Este ácido é reduzido pelo ácido ascórbico, formando o complexo azul de molibdênio, que absorve radiação de 882 nm. A absorvância é proporcional à concentração de ortofosfato (fósforo reativo) presente na amostra, até cerca de 1300 $\mu\text{g P/L}$.

Caso presentes, polifosfatos (ou fosfatos condensados) devem ser previamente convertidos a ortofosfatos por hidrólise ácida (item 22.2.12). Somente ortofosfatos e uma pequena parcela de polifosfatos são medidos quando o ensaio é realizado diretamente com amostras não hidrolisadas.

Já a quantificação do fósforo total envolve duas etapas gerais: a conversão dos compostos organofosforados e polifosfatos, através de digestão com persulfato a quente, a ortofosfato dissolvido, seguida de sua determinação espectrofotométrica (item 22.3). Uma outra alternativa para a digestão dos compostos fosforados a ortofosfatos é o método simultâneo do persulfato de potássio, em solução com hidróxido de sódio, na autoclave (item 22.4).

Nitrito (NO_2^-) e cromo hexavalente (dicromato) interferem, diminuindo os resultados em 3% quando em concentrações em torno de 1 mg/L, e de 10% a 15% quando presentes em 10 mg/L. Arsenatos reagem da mesma forma que fosfatos, interferindo positivamente, mesmo em concentrações da ordem de 0,1 mg As/L. Sulfetos (S^{2-}) e sílica (SiO_2) podem interferir quando suas concentrações ultrapassarem 1,0 e 10 mg/L, respectivamente.

22.2. FÓSFORO INORGÂNICO (ORTOFOSFATOS)

22.2.1. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Estufa a 103-105°C
- Chapa aquecedora
- Cronômetro digital
- Balões volumétricos de 100, 250, 500 e 1.000 mL
- Erlenmeyers de 125 mL
- Béquer de vidro de 1.000 mL
- Béquer de plástico de 250 mL
- Micropipetas de 1,00 e 10,0 mL
- Pipeta de vidro graduada de 5 mL
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas
- Proveta de vidro graduada
- Espectrofotômetro
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Vidros de relógio
- Ácido Ascórbico – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.

- Ácido Nítrico concentrado – HNO_3 P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Fosfato de Potássio Monobásico – KH_2PO_4 anidro P.A.
- Molibdato de Amônio – $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Tartarato de Potássio e Antimônio – $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Indicador Fenolftaleína: Dissolver 1 g de Fenolftaleína P.A. [$\text{C}_6\text{H}_4\text{COO}\cdot\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$] em 60 mL de álcool etílico 96%, diluindo com água deionizada até os 100 mL em balão volumétrico.

Observação: O fósforo é facilmente absorvido por superfícies de vidro. Para evitar contaminações, utilizar vidrarias lavadas com solução de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguadas abundantemente com água deionizada. Não utilizar detergentes comerciais. De preferência, reservar em separado a vidraria para análise de fósforo.

22.2.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 5 N (SOLUÇÃO A)

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL, adicionar, **com cuidado e lentamente**, 140 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) a 800 mL de água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido e realizar o preparo da solução na capela, sob exaustão;
- (b) após resfriar, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada e estocar em frasco de vidro devidamente identificado.

22.2.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE TARTARATO DE POTÁSSIO E ANTIMÔNIO (SOLUÇÃO B)

- (a) Transferir 1,3715 g de tartarato de potássio e antimônio ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) para balão volumétrico de 500 mL com uma certa quantidade de água deionizada, agitando para dissolução;
- (b) completar o volume com água deionizada e estocar em frasco de vidro devidamente identificado.

22.2.4. PREPARO DA SOLUÇÃO DE MOLIBDATO DE AMÔNIO (SOLUÇÃO C)

- (a) Transferir 20 g de molibdato de amônio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$] para balão volumétrico de 500 mL com uma certa quantidade de água deionizada, agitando para dissolução;
- (b) completar o volume com água deionizada;
- (c) agitar e deixar em repouso por cerca de 2 h, para que a matéria orgânica seja sedimentada;
- (d) estocar em frasco de vidro devidamente identificado.

22.2.5. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO 0,1 M (SOLUÇÃO D)

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

Observação: Estocada a 4°C , essa solução é estável por aproximadamente uma semana.

22.2.6. PREPARO DO REAGENTE MISTO

Para o preparo de 100 mL do reagente misto, transferir para um frasco âmbar as seguintes proporções das soluções A, B, C e D à temperatura ambiente, na ordem apresentada:

- (a) Adicionar 50 mL da solução de ácido sulfúrico 5 N (A);
- (b) adicionar 5 mL da solução de tartarato de potássio e antimônio (B) e agitar;

- (c) adicionar 15 mL da solução de molibdato de amônio (C) e agitar;
- (d) adicionar 30 mL da solução de ácido ascórbico (D) e agitar.

Observação: Essa solução é estável por 4 h. Planejar a quantidade de reagente misto requerida para o dia da análise de acordo com o número de amostras.

22.2.7. REAGENTE MODIFICADO PARA CORREÇÃO DE COR OU TURBIDEZ

Para o preparo de 20 mL do reagente modificado, misturar 10 mL de ácido sulfúrico 5 N (A), 3 mL de solução de molibdato de amônio (C) e 7 mL de água deionizada. Agitar e utilizar no lugar do reagente misto quando indicado.

22.2.8. PREPARO DA SOLUÇÃO DE H₂SO₄ ~ 30%

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL, adicionar, **com cuidado e lentamente**, 300 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) a 600 mL de água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido e realizar o preparo da solução na capela, sob exaustão;
- (b) após o resfriamento da solução, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) estocar em frasco de vidro devidamente identificado.

22.2.9. PREPARO DA SOLUÇÃO DE ÁCIDO FORTE (PARA A ETAPA DE HIDRÓLISE ÁCIDA)

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL, adicionar, **com cuidado e lentamente**, 300 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) a 600 mL de água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido e realizar o preparo da solução na capela, sob exaustão;
- (b) após o resfriamento da solução, adicionar, com auxílio de pipeta de vidro graduada, 4 mL de ácido nítrico concentrado (HNO₃);
- (c) transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada.

22.2.10. PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 6 N (PARA A ETAPA DE HIDRÓLISE ÁCIDA)

- (a) Pesar 60,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) e dissolver **cuidadosamente** com aproximadamente 150 mL de água deionizada em béquer de plástico de 250 mL. Utilizar luvas nitrílicas, óculos de segurança e realizar o preparo da solução na capela, sob exaustão;
- (b) após o resfriamento da solução, transferir para balão volumétrico de 250 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) armazenar em frasco de plástico devidamente identificado, à temperatura ambiente.

22.2.11. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE FÓSFORO INORGÂNICO (0,10 – 1,25 MG/L)

Preparar a solução padrão de fosfato monobásico de potássio conforme procedimento a seguir:

- (a) Usando água deionizada, transferir 0,2197 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) previamente seco em estufa (103-105°C por 2 h) e resfriado em dessecador para um balão volumétrico de 1.000 mL (caso não seja possível pesar a massa exata, calcular a concentração real, sabendo que 0,2197 g de KH₂PO₄ contém 50 mg de P ou 153,3 mg de PO₄³⁻);
- (b) adicionar 1,25 mL da solução de H₂SO₄ ~ 30% e completar o volume com água deionizada;

- (c) estocar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado;
- (d) a partir das concentrações de fósforo total de interesse, transferir as alíquotas correspondentes às diferentes concentrações de fosfato para balão volumétrico de 100 mL, sabendo-se que, nessas condições, 1,00 mL da solução mãe resultará em uma concentração final de 500 µg P/L. A Tabela 32 apresenta um exemplo de construção da curva de calibração:

Tabela 32: Preparo da curva padrão de fósforo inorgânico.

Concentrações estimadas (mg P/L)	Alíquota (µL) da solução padrão no balão de 100 mL
0,0 (branco)	0
0,10	200
0,25	500
0,50	1.000
0,75	1.500
1,00	2.000
1,25	2.500

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

- (e) Preparar triplicatas de cada concentração e, no mínimo, dois brancos (água deionizada no lugar do padrão), e aplicar o mesmo procedimento de análise apresentado no item 0;
- (f) efetuar a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 882 nm, zerando o equipamento com o branco de menor absorvância;
- (g) a partir das leituras obtidas (utilizando a média dos valores de absorvância), traçar a curva absorvância × concentração de fósforo inorgânico, para obtenção da equação de calibração e o coeficiente de correlação, avaliando a confiabilidade do método.

22.2.12. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS CONTENDO POLIFOSFATOS – HIDRÓLISE ÁCIDA

Para a conversão de polifosfatos a ortofosfatos dissolvidos, quando necessário, submeter as amostras ao procedimento de hidrólise ácida seguindo os passos elencados a seguir:

- (a) Adicionar 1 gota de solução indicadora de fenolftaleína a 100 mL de amostra em frasco de erlenmeyer. Se ocorrer coloração avermelhada, adicionar algumas gotas da solução de ácido forte (item 22.2.9 – ácido sulfúrico+nítrico) até o desaparecimento da cor;
- (b) acrescentar mais 1,0 mL da solução de ácido forte;
- (c) ferver suavemente a amostra em chapa aquecedora por, no mínimo, 90 min, adicionando água deionizada para manter o volume da mistura entre 25 e 50 mL, sem deixar a amostra secar (*realizar esse procedimento sob exaustão, colocando sobre o erlenmeyer um vidro de relógio com o lado côncavo voltado para cima*);
- (d) na sequência, aguardar o resfriamento da amostra até a temperatura ambiente e transferir para balão volumétrico de 100 mL;
- (e) repassar o erlenmeyer com algumas porções de água deionizada e recolher no balão;
- (f) neutralizar com solução de NaOH 6 N até coloração rosa clara;
- (g) completar o volume do balão com água deionizada e homogeneizar;
- (h) submeter à determinação de fósforo inorgânico conforme item 22.2.13;

- (i) a diferença entre as concentrações de fósforo medidas nas amostras antes e após a etapa de hidrólise ácida se referem ao teor de polifosfatos, também chamados de fosfatos hidrolisáveis.

Observação: Para determinação de fósforo inorgânico em amostras submetidas ao presente pré-tratamento ácido, tratar os padrões da curva de calibração empregando o mesmo procedimento antes de efetuar a análise.

22.2.13. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO INORGÂNICO (ORTOFOSFATOS)

- (a) Transferir 50 mL de amostra, bruta ou diluída, para erlenmeyer de 125 mL. Preparar dois testes em branco com 50 mL de água deionizada (ver observações*);
- (b) adicionar uma gota do indicador fenolftaleína. Se ocorrer coloração avermelhada, adicionar algumas gotas da solução de ácido sulfúrico 5 N até o desaparecimento da cor;
- (c) adicionar 8,00 mL de reagente misto e homogeneizar, misturando vigorosamente;
- (d) após transcorridos 10 min para o desenvolvimento da coloração azul (nunca esperar mais que 30 min), transferir uma alíquota da amostra para tubo de DQO e proceder a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 882 nm, zerando o equipamento com o branco de menor absorvância (ver observação 1*);
- (e) determinar a concentração de fósforo inorgânico de acordo com a equação da reta obtida a partir dos padrões pré-estabelecidos – item 22.2.11.

***Observações:**

1) Para amostras que apresentem cor ou turbidez significativa, preparar um branco com 50 mL de amostra e submeter ao mesmo procedimento, substituindo, porém, o reagente misto pelo reagente modificado (item 22.2.7). Ler em conjunto com as amostras e descontar a absorvância obtida por esse branco da absorvância final da amostra em questão.

2) Devido à alta instabilidade dos reagentes do método, o aconselhável é armazenar um número razoável de amostras para efetuar a análise no mesmo dia, em conjunto com os padrões da curva de calibração. Caso isso não seja possível, preparar alguns padrões de verificação com KH_2PO_4 dentro da faixa de concentração das amostras e corrigir o resultado, se necessário.

3) Se necessário, volumes menores de amostra também poderão ser utilizados na análise. Para isso, reduzir proporcionalmente o volume do reagente misto adicionado.

22.3. FÓSFORO TOTAL

22.3.1. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Estufa a 103-105°C
- Chapa aquecedora
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Micropipetas de 1,00 e 10,0 mL
- Balões volumétricos de 100, 500 e 1.000 mL
- Béquer de vidro de 1.000 mL
- Erlenmeyers de 125 mL
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas
- Proveta de vidro graduada de 50,0 mL
- Vidros de relógio
- Persulfato de Amônio sólido – $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ P.A. – ou Persulfato de Potássio sólido – $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Solução de Ácido Sulfúrico – H_2SO_4 5 N (preparo conforme o item 22.2.2)
- Solução de Ácido Sulfúrico – H_2SO_4 ~ 30% (preparo conforme o item 22.2.8)
- Reagente Misto (preparo conforme o item 22.2.6)
- Reagente Modificado, se necessário (preparo conforme o item 22.2.7)
- Indicador Fenolftaleína: Dissolver 1 g de Fenolftaleína P.A. $[\text{C}_6\text{H}_4\text{COO.C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2]$ em 60 mL de álcool etílico 96%, diluindo com água deionizada até os 100 mL em balão volumétrico.

Observação: O fósforo é facilmente absorvido por superfícies de vidro. Para evitar contaminações, utilizar vidrarias lavadas com solução de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguadas abundantemente com água deionizada. Não utilizar detergentes comerciais. De preferência, reservar em separado a vidraria para análise de fósforo.

22.3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1 M

- (a) Pesar 40,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) em béquer de 1.000 mL e dissolver **cuidadosamente** com aproximadamente 800 mL de água deionizada. Utilizar luvas nitrílicas, óculos de segurança e realizar o preparo da solução na capela, sob exaustão;
- (b) após o resfriamento da solução, transferir para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) armazenar em frasco de plástico devidamente identificado, à temperatura ambiente.

22.3.3. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DE FÓSFORO TOTAL (0,10 – 1,25 MG/L)

Preparar a solução padrão de fosfato monobásico de potássio conforme procedimento a seguir (igual ao método para fósforo inorgânico):

- (a) Usando água deionizada, transferir 0,2197 g de fosfato de potássio monobásico anidro (KH_2PO_4) previamente seco em estufa (103-105°C por 2 h) e resfriado em dessecador para um balão

volumétrico de 1.000 mL (caso não seja possível pesar a massa exata, calcular a concentração real, sabendo que 0,2197 g de KH_2PO_4 contém 50 mg de P ou 153,3 mg de PO_4^{3-});

- (b) adicionar 1,25 mL da solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 30\%$ e completar o volume com água deionizada;
- (c) estocar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado;
- (d) a partir das concentrações de fósforo total de interesse, transferir as alíquotas correspondentes às diferentes concentrações de fosfato para balão volumétrico de 100 mL, sabendo-se que, nessas condições, 1,00 mL da solução mãe resultará em uma concentração final de 500 $\mu\text{g P/L}$. A Tabela 33 apresenta um exemplo de construção da curva de calibração:

Tabela 33: Preparo da curva padrão de fósforo total.

Concentrações estimadas (mg P/L)	Alíquota (μL) da solução padrão no balão de 100 mL
0,0 (branco)	0
0,10	200
0,25	500
0,50	1.000
0,75	1.500
1,00	2.000
1,25	2.500

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

- (e) Preparar triplicatas de cada concentração e, no mínimo, dois brancos (água deionizada no lugar do padrão);
- (f) submeter as soluções padrões ao mesmo procedimento de digestão que as amostras, seguindo os procedimentos apresentados no item 22.3.4. Alternativamente, pode-se escolher utilizar o método da digestão simultânea para fósforo e nitrogênio totais, conforme descrito no item 22.4;
- (f) efetuar a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 882 nm, zerando o equipamento com o branco de menor absorvância;
- (g) a partir das leituras obtidas (utilizando a média dos valores de absorvância), traçar a curva absorvância \times concentração de fósforo total, para obtenção da equação de calibração e o coeficiente de correlação, avaliando a confiabilidade do método.

22.3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO TOTAL

- (a) Transferir 50 mL de amostra, bruta ou diluída, para erlenmeyer de 125 mL. Preparar dois testes em branco com 50 mL de água deionizada (ver observações*);
- (b) adicionar uma gota do indicador fenolftaleína. Se ocorrer coloração avermelhada, adicionar algumas gotas da solução de ácido sulfúrico $\sim 30\%$ até o desaparecimento da cor;
- (c) acrescentar mais 1,0 mL da solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 \sim 30\%$;
- (d) na sequência, adicionar 0,4 g de persulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8]$ ou 0,5 g de persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$). **CUIDADO: Manusear com luvas e evitar a inalação e o contato do reagente com a pele!**
- (e) ferver suavemente sobre uma chapa pré-aquecida por cerca de 30-40 min, ou até obter um volume final próximo de 10 mL (*realizar esse procedimento sob exaustão, colocando sobre o*

- erlenmeyer um vidro de relógio com o lado côncavo voltado para cima*). Levantar em conta que alguns compostos organofosforados, por exemplo, a adenosina monofosfato (AMP), podem exigir até cerca de 2 h para serem completamente digeridos;
- (f) alternativamente, pode-se aquecer a amostra por 30 min em autoclave (120°C). Ver as orientações do item 22.1;
 - (g) aguardar o resfriamento da amostra digerida, homogeneizar e transferir para balão volumétrico de 100 mL;
 - (h) repassar o erlenmeyer com algumas porções de água deionizada e recolher no balão volumétrico;
 - (i) adicionar água deionizada até atingir cerca de metade do volume do balão;
 - (j) adicionar uma gota do indicador fenolftaleína e neutralizar levemente com NaOH 1 M até obtenção de uma coloração rosada persistente;
 - (k) homogeneizar e completar o volume com água deionizada;
 - (l) algumas amostras poderão apresentar formação de precipitados neste ponto: Não filtrar! O precipitado (possivelmente, fosfato de cálcio) será redissolvido sob as condições ácidas do teste colorimétrico;
 - (m) na sequência, adicionar algumas gotas da solução de ácido sulfúrico 5 N até o desaparecimento da coloração rosada devida à fenolftaleína;
 - (n) transferir 50 mL da amostra de volta para o erlenmeyer de 125 mL e adicionar 8,00 mL do reagente misto, misturando vigorosamente para homogeneizar;
 - (o) após transcorridos 10 min para o desenvolvimento da coloração azul (nunca esperar mais que 30 min), transferir uma alíquota da amostra para tubo de DQO e proceder a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 882 nm, zerando o equipamento com o branco de menor absorvância (ver observação 1*);
 - (p) determinar a concentração de fósforo total de acordo com a equação da reta obtida a partir dos padrões pré-estabelecidos – item 22.3.3;
 - (q) pela diferença entre os resultados das análises de fósforo total e ortofosfatos (fósforo inorgânico – item 22.2.13) obtém-se a concentração referente ao fósforo orgânico da amostra.

***Observações:**

1) *Para amostras que apresentem cor ou turbidez significativa, preparar um branco com 50 mL de amostra e submeter ao mesmo procedimento, substituindo, porém, o reagente misto pelo reagente modificado (item 22.2.7). Ler em conjunto com as amostras e descontar a absorvância obtida por esse branco da absorvância final da amostra em questão.*

2) *É recomendável o preparo de alguns padrões de controle contendo formas orgânicas de fósforo, como por exemplo, o trifosfato de adenosina ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$). Submeter estes padrões ao mesmo procedimento de digestão que as amostras e verificar a eficiência da digestão e a recuperação de fósforo total.*

3) *Uma metodologia alternativa proposta para a digestão de amostras visando a determinação simultânea de fósforo e nitrogênio totais é apresentada a seguir (item 22.4).*

22.4. MÉTODO DE DIGESTÃO SIMULTÂNEA DO PERSULFATO PARA FÓSFORO E NITROGÊNIO TOTAIS (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

22.4.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Na metodologia baseada nos trabalhos de Valderrama (1981), Ameel et al. (1999), Gross e Boyd (1998) e Gross, Boyd e Seo (1999), entre outros, a oxidação dos compostos nitrogenados (nitrogênio orgânico, amônia e nitrito) até nitrato é efetuada pela reação com o persulfato de potássio a quente, em meio alcalino, o qual é proporcionado durante as etapas iniciais da digestão (pH > 10,0). Com o decorrer do tempo, o persulfato é decomposto termicamente em íons bissulfatos, implicando na acidificação da amostra (conforme mostrado pela Equação 87), a qual chega a atingir um pH próximo a 2,0. Dessa forma, sob condições ácidas, polifosfatos e compostos organofosforados são hidrolisados em ortofosfato dissolvido.



A digestão é realizada em autoclave durante cerca de 60 min a 120°C, condições nas quais foram observadas melhores recuperações de nitrogênio total (FERREE; SHANNON, 2001).

Após a digestão, a concentração de fósforo total pode, então, ser determinada pelo método colorimétrico da redução com ácido ascórbico (item 22.3).

O nitrogênio total convertido a nitrato, por sua vez, pode ser determinado por meio de uma das metodologias espectrofotométricas anteriormente apresentadas: método da absorção ultravioleta (item 18.1), método do ácido cromotrópico (item 18.2) ou método da redução de nitrato por cádmio aliada à determinação do nitrito total formado (item 18.3). A determinação individual de amônia, nitrito e nitrato previamente ao processo de digestão permite obter, por diferença, a concentração de nitrogênio orgânico.

ATENÇÃO: Amostras ácidas ou preservadas por adição de ácido devem ser neutralizadas (pH ≥ 7,0) antes de serem submetidas ao procedimento de digestão. Não acidificar amostras contendo nitrito antes de armazenar!

A presença expressiva de carbono orgânico (em amostras com alta concentração de DQO) poderá prejudicar a digestão das formas orgânicas de fósforo e nitrogênio, uma vez que o persulfato é consumido na oxidação da matéria orgânica até CO₂, exigindo a dosagem de maiores quantidades do reagente oxidante.

22.4.2. MATERIAL

- Autoclave
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Chapa aquecedora e agitadora
- Cronômetro digital
- Balões volumétricos de 50, 500 e 1.000 mL
- Copos de béquer de 500 e 1.000 mL
- Micropipeta de 10.000 µL
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas
- Provetas graduadas de 50, 100 e 500 mL
- Frascos de antibiótico ou Erlenmeyers de 100 mL
- Persulfato de Potássio anidro – K₂S₂O₈ P.A.

- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.

Observação: O fósforo é facilmente absorvido por superfícies de vidro. Para evitar contaminações, utilizar vidrarias lavadas com solução de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguadas abundantemente com água deionizada. Não utilizar detergentes comerciais. De preferência, reservar em separado a vidraria para análise de fósforo.

22.4.3. SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 3 M

- (a) Pesar 60,0 g de hidróxido de sódio (NaOH) e dissolver **cuidadosamente** em béquer de 500 mL com aproximadamente 400 mL de água deionizada. Utilizar luvas, óculos de segurança e realizar esse procedimento na capela, sob exaustão;
- (b) após o resfriamento da solução, transferir para balão volumétrico de 500 mL e completar o volume com água deionizada;
- (c) armazenar em frasco de plástico devidamente identificado, à temperatura ambiente.

22.4.4. PREPARO DO REAGENTE OXIDANTE

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL, dissolver 64 g de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) em cerca de 500 mL de água deionizada. Manter em agitação magnética e aquecer até a dissolução completa do reagente. **CUIDADO: Manusear com luvas, evitando a inalação e o contato do reagente com a pele!**
- (b) adicionar 80 mL da solução de NaOH 3 M anteriormente preparada e homogeneizar;
- (c) após o resfriamento, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água deionizada;
- (d) armazenar em frasco âmbar devidamente identificado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar direta;
- (e) esta solução é estável por até 9 meses.

22.4.5. PROCEDIMENTO DE DIGESTÃO SIMULTÂNEA PARA FÓSFORO E/OU NITROGÊNIO TOTAIS

- (a) Transferir 40 mL de amostra para frasco de antibiótico ou erlenmeyer de 100 mL. **ATENÇÃO:** As amostras devem ser diluídas previamente à etapa de digestão, de modo que os teores de nitrogênio e fósforo não ultrapassem as faixas de trabalho dos métodos a serem utilizados para determinação de nitrogênio total, como nitrato, ou de fósforo total, como fosfato. Amostras originalmente ácidas ou preservadas por acidificação devem ser neutralizadas ($pH \geq 7,0$) antes da etapa de digestão podendo-se dosar algumas gotas da solução de NaOH 3 M;
- (b) preparar dois brancos com 40 mL de água deionizada cada e submeter ao mesmo procedimento (para a análise exclusiva de nitrogênio total, apenas um branco é requerido);
- (c) adicionar 8,5 mL do reagente oxidante, vedar adequadamente a boca dos frascos com papel alumínio (não lacrar) e agitar vigorosamente;
- (d) aquecer em autoclave a 120°C e 1 atm durante 55 min (ver as orientações do item 22.1);
- (e) após o término, aguardar o resfriamento até a temperatura ambiente;

- (f) na sequência, proceder conforme indicado nos itens a seguir para preparar as amostras que serão submetidas às análises de fósforo e/ou nitrogênio total:

22.4.5.1. PARA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO TOTAL (NA FORMA DE FOSFATO):

- (a) Homogeneizar a amostra digerida e transferir 30 mL para balão volumétrico de 50 mL (filtrar previamente a amostra em membrana de 0,45 µm caso apresente turbidez excessiva);
- (b) seguir o procedimento descrito no item 22.3.4 a partir do passo (j) em diante;
- (c) tratar os dois brancos digeridos da mesma forma que as amostras;
- (d) no levantamento da curva de calibração para a determinação de fósforo total (como fosfato) em amostras digeridas pelo presente método, submeter previamente os padrões ao mesmo procedimento de digestão que as amostras e traçar uma curva de calibração própria.

22.4.5.2. PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL (NA FORMA DE NITRATO):

- (a) Homogeneizar o volume restante de amostra digerida e filtrar em membrana de 0,45 µm;
- (b) para análise de nitrato pelo método da absorção ultravioleta (item 18.1), efetuar diretamente a leitura da amostra contra o teste em branco, conforme indicado no item 18.1.9 a partir do passo (h) em diante;
- (c) para análise de nitrato pelo método do ácido cromotrópico (item 18.2) ou pelo método da redução por cádmio (item 18.3), neutralizar a amostra dosando algumas gotas da solução de NaOH 3 M até pH próximo de 7,0 (verificar com auxílio de pHmetro ou fita indicadora);
- (d) tratar o branco da mesma forma que a amostra;
- (e) efetuar a determinação de nitrato conforme o procedimento apresentado no item 18.2.6 (método do ácido cromotrópico) ou no item 18.3.6 (método da redução de nitrato por cádmio);
- (f) no levantamento da curva de calibração para a determinação de nitrogênio total (como nitrato) em amostras digeridas pelo presente método, submeter previamente os padrões ao mesmo procedimento de digestão que as amostras e traçar uma curva de calibração própria.

Observações:

1) *Levar em conta que, uma vez que o carbono orgânico é oxidado a CO₂ pelo persulfato, amostras com alta concentração de matéria orgânica poderão exigir maiores dosagens do reagente oxidante para viabilizar a conversão total dos compostos orgânicos nitrogenados e fosforados.*

2) *É recomendável o preparo de alguns padrões de controle contendo formas orgânicas de nitrogênio e fósforo (por exemplo, ácido nicotínico [C₆H₅NO₂] e trifosfato de adenosina [C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃], respectivamente). Submeter estes padrões ao mesmo procedimento de digestão que as amostras e verificar a eficiência da digestão e a recuperação de nitrogênio e fósforo totais.*

22.1. ORIENTAÇÕES GERAIS PARA A OPERAÇÃO DA AUTOCLAVE

ATENÇÃO: *Quando necessitar utilizar o aparelho pela primeira vez, ou sempre que surgir alguma dúvida ou dificuldade na operação da autoclave, solicite a orientação das técnicas responsáveis. Observe as instruções contidas no manual do fabricante e não realize ações arriscadas. **Cuidado!***

Abra a tampa da autoclave com auxílio do pedal. Antes de ligar, verificar se o nível da água dentro da autoclave está encobrendo as resistências. Completar até a base de apoio do cesto, se necessário. Ao tampar, apertar firmemente as travas da tampa, duas a duas (de forma cruzada), para evitar o escape de vapor pelas bordas do aparelho. Ligar o aparelho e ajustar a chave de temperatura na posição "Máxima" (ver observação*). Abrir imediatamente a válvula de escape do vapor.

Quando o vapor começar a sair por essa válvula, esperar de 3 a 5 min e fechá-la. O ponteiro do manômetro começará a subir. Quando o ponteiro atingir a pressão de 1,1 kgf/cm², a temperatura deverá estar em 120°C. Mudar a chave seletora de temperatura para "Média" para a estabilização da pressão.

Caso a pressão continue subindo, alterar a chave para a posição "Baixa" e observar se ocorre a redução da pressão. **ATENÇÃO:** Nunca deixar a pressão da autoclave ultrapassar 1,5 kgf/cm²! Caso necessário, qualquer fase do ciclo pode ser interrompida desligando-se o aparelho.

Decorrido o tempo necessário, desligar o aparelho e aguardar a depressurização (Não abrir ainda!). Esse procedimento pode ser acelerado abrindo-se **com cuidado e lentamente** a válvula de escape de vapor.

ATENÇÃO: Nunca abrir essa válvula de uma só vez!

Quando o ponteiro do manômetro atingir a marca de 0 Kgf/cm² e não estiver mais saindo vapor pela válvula, abrir **cuidadosamente** a tampa do aparelho e retirar o material. Cuidado ao manipular o material quente. Utilize luvas específicas para evitar queimaduras!

****Observação:** As autoclaves possuem geralmente uma chave seletora de temperatura com três posições de ajuste "Mínima, Média e Máxima", utilizadas para manter a pressão e a temperatura do equipamento dentro da faixa adequada. Essa chave pode servir também para ligar e desligar a autoclave. Atualmente existem tipos de autoclaves microprocessadas, com controles automatizados de temperatura, bastando apenas programar o ciclo de autoclavagem com os parâmetros necessários. Em todo caso, seguir as instruções contidas no manual do fabricante!*

VII. METAIS E OUTROS ÍONS⁵

23 Ferro II e III – Métodos Espectrofotométricos

24 Cobre I e II – Método do Ácido Bicinconínico (BCA)

25 Cloretos Totais – Método de Mohr (Argentométrico)



⁵ As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

23. FERRO II E III – MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

23.1. MÉTODO DA FERROZINA

(VIOLLIER et al., 2000)

23.1.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O ferro é um dos elementos mais abundantes do planeta, podendo ser encontrado na natureza em muitos minerais nos estados de oxidação +II (ferroso) ou +III (férico). O íon ferroso (Fe^{2+}) em solução tende a se oxidar rapidamente a Fe^{3+} (estado mais estável) na presença de oxigênio dissolvido ou pelo contato com o oxigênio atmosférico.

O ferro III é praticamente insolúvel em meios com pH neutro, enquanto o ferro II apresenta uma maior solubilidade. A solubilidade do íon férrico (Fe^{3+}) aumenta em condições ácidas. Valores de pH abaixo de 4,0 possibilitam, além de uma melhor dissolução do Fe^{3+} , a coexistência do íon Fe^{2+} mesmo na presença de oxigênio. Em ambientes anaeróbios, com $\text{pH} > 4,0$, o íon férrico pode ser reduzido quimicamente ou biologicamente de volta ao estado ferroso.

O presente método, proposto inicialmente por Stookey e Ferrozine (1970), baseia-se na utilização do reagente ferrozina (*3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-pp-disulfonic acid monosodium salt hydrate*) o qual reage com o íon ferroso (Fe^{2+}) formando um complexo estável de cor magenta, capaz de absorver a luz em comprimento de onda de 562 nm (VIOLLIER et al., 2000).

Para a determinação da concentração de ferro total presente na amostra deve ser utilizada uma solução redutora (cloridrato de hidroxilamina 1,4 M preparada em HCl 2 M) para proporcionar a redução do íon férrico (Fe^{3+}) de volta ao seu estado ferroso (Fe^{2+}), único passível de reagir com a ferrozina. Pela diferença entre as concentrações determinadas de ferro total e ferro II (analisado sem a dosagem da solução redutora) obtém-se a parcela devida ao ferro III.

Para facilitar o manuseio das amostras, tanto para proporcionar uma melhor solubilização do ferro III quanto para evitar a rápida oxidação do ferro II ao estado férrico, uma solução de ácido clorídrico 1 M é empregada no pré-tratamento das amostras. Uma mistura da amostra com a solução de extração na proporção de 1:1 resulta em uma concentração final de HCl 0,5 M, condição que foi proposta como ideal por García-Balboa et al. (2011) para extração de ferro antes da realização do teste colorimétrico.

23.1.2. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Balança semi-analítica (precisão $\pm 0,01$ g)
- Capela com exaustão
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Copos de béquer de vidro de 25, 100, 250, 500 e 1.000 mL
- Balões volumétricos de 25, 100 e 1.000 mL
- Micropipetas de 200, 1.000 e 5.000 μL
- Pipeta de vidro graduada de 10 mL
- Proveta de vidro graduada de 250 mL
- Funil e bastão de vidro

- Ferrozina (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-pp-disulfonic acid monosodium salt hydrate) P.A.
- Cloridrato de Hidroxilamina – $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ P.A.
- Acetato de Amônio – $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ P.A.
- Hidróxido de Amônio concentrado – NH_4OH P.A.
- Cloreto de Ferro II tetrahidratado – $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ P.A. – ou Sulfato de ferro II heptahidratado – $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A. (teor de ferro < 0,5 ppm)

Observação: Utilizar apenas água isenta de íons ferro (de preferência, água ultrapura – Milli-Q®) no preparo das soluções reagentes e na diluição das amostras, para evitar interferências devidas às concentrações residuais de ferro na água de abastecimento. Para evitar contaminações, utilize apenas vidrarias lavadas com solução de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguadas abundantemente com água deionizada.

23.1.3. PREPARO DA SOLUÇÃO DE FERROZINA (10^{-2} M EM ACETATO DE AMÔNIO 10^{-1} M)

- (a) Em béquer de vidro de 25 mL, pesar 7,708 g de acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$);
- (b) na capela, com a exaustão ligada, transferir o reagente com água ultrapura (Milli-Q®) para balão volumétrico de 1.000 mL (por meio de lavagens sequenciais);
- (c) completar o volume do balão com água Milli-Q® e homogeneizar a solução;
- (d) pesar em seguida 4,925 g do reagente ferrozina;
- (e) ainda na capela, sob exaustão, transferir a ferrozina por meio de lavagens sequenciais para outro balão volumétrico de 1.000 mL, utilizando a solução de acetato de amônio preparada até completar o volume do balão;
- (f) homogeneizar a solução e guardar refrigerada, ao abrigo da luz, em frasco tampado e devidamente identificado.

23.1.4. PREPARO DA SOLUÇÃO REDUTORA (CLORIDRATO DE HIDROXILAMINA 1,4 M EM HCL 2 M)

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL colocar 800 mL de água Milli-Q®;
- (b) com auxílio de proveta de vidro graduada, trabalhando com luvas nitrílicas, óculos de segurança e na capela, com a exaustão ligada, adicionar **cuidadosamente** 168 mL de HCl concentrado;
- (c) após esfriar, transferir a solução para balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água Milli-Q®;
- (d) em balança analítica e usando béquer de vidro de 100 mL, pesar 97,286 g de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$);
- (e) usando a solução de HCl (2 M), transferir a hidroxilamina para balão volumétrico de 1.000 mL (por meio de lavagens sequenciais) até completar o volume do balão; homogeneizar e guardar a solução refrigerada, em frasco tampado e devidamente identificado.

23.1.5. PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO (ACETATO DE AMÔNIO 10 M)

- (a) Em béquer de vidro de 1.000 mL e usando balança semi-analítica pesar 770,8 g de acetato de amônio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$);
- (b) na capela, com a exaustão ligada, ir adicionando vagarosamente 200 mL de água Milli-Q®;

- (c) em agitação magnética e com auxílio de bastão de vidro misturar até homogeneizar a solução;
- (d) transferir para balão volumétrico de 1.000 mL com auxílio de funil de vidro, completando o volume do balão;
- (e) ainda na capela, transferir a solução de volta para o béquer de vidro de 1.000 mL;
- (f) em agitação magnética, dosar algumas gotas de hidróxido de amônio (NH_4OH) até obter pH próximo de 9,5;
- (g) guardar a solução em frasco bem tampado e devidamente identificado.

Observação: Cada nova solução de ferrozina, de hidroxilamina (solução redutora) e de acetato de amônio (solução tampão) exige o preparo de uma nova curva de calibração!

23.1.6. PREPARO DA SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO (HCL 1 M)

Para a estabilização do ferro ferroso em solução (Fe^{2+}) e para a solubilização do ferro férrico (Fe^{3+}), o que se consegue pelo abaixamento do pH da fase líquida, prepara-se uma solução de ácido clorídrico 1 M para ser utilizada no método de extração:

- (a) Em béquer de vidro de 500 mL colocar cerca de 300 mL de água Milli-Q®;
- (b) na capela, sob exaustão e usando proveta de vidro graduada, adicionar, **devagar e com cuidado**, 84 mL de ácido clorídrico concentrado. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido;
- (c) aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL;
- (d) completar o volume com água Milli-Q® e armazenar em frasco devidamente identificado.

23.1.7. PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE FERRO

Para o preparo dos padrões da curva de calibração usar cloreto de ferro II tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – P.M. = 198,81 g/mol) ou sulfato de ferro II heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – P.M. = 278,02 g/mol).

Preparar, inicialmente, uma **solução estoque** com concentração de 1.000 mg Fe^{2+}/L :

- (a) Em béquer de vidro de 100 mL colocar 50 mL de água Milli-Q®;
- (b) na capela, usando pipeta de vidro, adicionar **cuidadosamente** 10,0 mL de HCl concentrado, usando luvas e óculos de segurança;
- (c) em balança analítica, pesar 0,356 g de cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ou 0,498 g de sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- (d) usando a solução de HCl, transferir, por lavagens sucessivas, o cloreto ferroso para balão volumétrico de 100 mL e completar o volume com água Milli-Q®, homogeneizando a solução;

Preparar, em seguida, uma **solução de concentração intermediária** (50 mg Fe^{2+}/L), transferindo 5 mL da solução estoque para balão volumétrico de 100 mL e completando o volume com água Milli-Q®.

23.1.8. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (1 – 15 MG/L),

Para a construção da curva de calibração, transferir as alíquotas indicadas na Tabela 34 da **solução intermediária** (50 mg Fe^{2+}/L) para balões volumétricos de 25 mL, completando o volume com água Milli-Q®.

Usar triplicatas para cada concentração (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração). Submeter os padrões aos mesmos passos descritos para as amostras (item 23.1.10).

Tabela 34: Relação das concentrações e alíquotas da solução intermediária para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Ferro/L)	Alíquota da solução intermediária (µL) para diluição em balão volumétrico de 25 mL
0,0 (branco)	0
1,0	500
2,5	1.250
5,0	2.500
7,5	3.750
10,0	5.000
12,5	6.250
15,0	7.500

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

23.1.9. COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRA (ADAPTADO DE GARCÍA-BALBOA ET AL., 2011)

Uma vez que em meios com pH > 4,0 o íon ferroso (Fe^{2+}) é rapidamente oxidado a íon férrico (Fe^{3+}), a coleta de amostras para determinação de ferro II deverá ser realizada em anaerobiose. Isso pode ser feito com o auxílio de uma seringa com agulha, imersa no líquido a ser amostrado, evitando a entrada de ar.

Para a estabilização do íon ferroso (Fe^{2+}) e solubilização do ferro férrico (Fe^{3+}), a amostra deve ser acidificada pela adição de uma solução de HCl 1 M (solução de extração), conforme indicado nos procedimentos analíticos descritos a seguir.

No caso da determinação do teor de ferro total, o ideal é deixar a mistura (amostra + solução de extração) descansar por 24 h, no escuro, antes de efetuar a análise (item 23.1.10). Já para a determinação de ferro II, a análise pode ser realizada imediatamente (item 23.1.11).

Amostras que apresentem cor ou turbidez excessiva após a etapa de extração em HCl 1 M devem ser filtradas em membrana de 0,45 µm, uma vez que o ferro presente na amostra já deverá se encontrar totalmente solubilizado pelo pH ácido da mistura. Para determinação da fração de ferro solúvel, adotar a estratégia descrita no item 23.1.13.

23.1.10. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO TOTAL

- (a) Transferir 500 µL da solução de extração (HCl 1 M) para tubos de DQO e adicionar, na sequência, 500 µL da amostra ou solução padrão. **ATENÇÃO:** Levar em conta que a concentração de ferro total na amostra não deverá exceder 15,0 mg/L. Caso contrário, utilizar um volume menor de amostra e diluir com água Milli-Q® para 500 µL;
- (b) tampar os tubos contendo as amostras, homogeneizar suavemente e deixar em repouso, no escuro, por cerca de 24 h antes de continuar o procedimento;
- (c) após o período de extração, adicionar 3,0 mL de água Milli-Q® aos tubos contendo amostras ou soluções padrões (não considerar no fator de diluição);
- (d) preparar em conjunto um teste em branco consistindo de 500 µL da solução de extração (HCl 1 M) e 3,5 mL de água Milli-Q® (ver observações*);
- (e) adicionar 400 µL da solução de Ferrozina seguidos de 600 µL da solução Redutora (Hidroxilamina);
- (f) adicionar 200 µL da solução Tampão (Acetato de Amônio);

- (g) tampar o tubo e misturar por inversão;
- (h) deixar em repouso no escuro e acionar o cronômetro;
- (i) após 10 min, zerar o espectrofotômetro com o branco e efetuar a leitura em comprimento de onda de 562 nm.

***Observações:**

1) Interferências relativas à presença de cor ou turbidez podem ser removidas por filtração em membrana de 0,45 µm após a etapa de extração em HCl 1 M. Para isso, utilizar um volume maior de amostra e extrair em um volume igual da solução de HCl 1 M. Após o período de extração (24 h), filtrar em membrana de 0,45 µm e submeter 1.000 µL desse extrato ao teste de ferro total, do item (c) em diante.

2) Caso não seja possível filtrar o extrato, preparar um branco modificado consistindo de 500 µL de amostra + 500 µL de HCl 1 M e adicionar 3,4 mL de água Milli-Q®, 600 µL de solução redutora e 200 µL da solução tampão (omitir a adição da ferrozina). Ler em conjunto com as amostras e descontar a absorbância obtida por esse branco da absorbância final da amostra em questão.

3) Caso as concentrações de ferro total na amostra estejam abaixo do limite de detecção do método aqui apresentado (cerca de 0,5 mg/L) proceder ao teste empregando 2,0 mL de amostra extraída em 2,0 mL de HCl 1 M e omitir a dosagem de água Milli-Q®. Após o período de extração, seguir os passos indicados do item (e) em diante, dosando os mesmos volumes das soluções reagentes. Neste caso, dividir a concentração aparente de ferro obtida por 4 (fator de concentração empregado) para corrigir o resultado final da análise.

23.1.11. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO II (Fe²⁺)

Quando o objetivo da análise for determinar a concentração de ferro II (ion ferroso), modificar o procedimento anterior conforme indicado a seguir:

- (a) Transferir 500 µL da solução de extração (HCl 1 M) para tubos de DQO e adicionar, na sequência, 500 µL da amostra. **ATENÇÃO:** Levar em conta que a concentração de ferro II na amostra não deverá exceder 15,0 mg/L. Caso contrário, utilizar um volume menor de amostra e diluir com água Milli-Q® para 500 µL;
- (b) adicionar 3,0 mL de água Milli-Q® (não considerar no fator de diluição);
- (c) preparar um teste em branco consistindo de 500 µL da solução de extração (HCl 1 M) e 3,5 mL de água Milli-Q® (ver observações*);
- (d) adicionar 400 µL da solução de Ferrozina;
- (e) omitir a dosagem da solução redutora (Hidroxilamina) e adicionar 200 µL da solução tampão (Acetato de Amônio);
- (f) tampar o tubo, misturar por inversão e deixar em repouso, no escuro;
- (g) após 10 min, zerar o espectrofotômetro com o branco e efetuar a leitura em comprimento de onda de 562 nm;

- (h) corrigir a leitura do espectrofotômetro (dada em mg Fe_{TOTAL}/L) multiplicando o resultado obtido pela razão 4,6/5,2 (≈ 0,885) (ou traçar uma nova curva de calibração corrigida pelo mesmo fator);
- (i) essa concentração corrigida, por sua vez, deverá ser multiplicada pelo fator de diluição empregado, se for o caso, sendo assim determinada a concentração real de ferro II na amostra;
- (j) caso se deseje determinar a concentração de ferro total partindo da mesma amostra, deixar previamente a amostra por 24 h em descanso na solução de extração antes de efetuar a análise. Após a leitura da concentração de ferro II, adicionar 600 µL da solução redutora aos tubos da amostra e do branco, agitar e efetuar uma nova leitura em 562 nm após 10 min na curva padrão para ferro total.

***Observações:**

1) Interferências relativas à presença de cor ou turbidez podem ser removidas por filtração em membrana de 0,45 µm após a etapa de extração em HCl 1 M. Para isso, utilizar um volume maior de amostra e extrair em um volume igual da solução de HCl 1 M. Na sequência, filtrar em membrana de 0,45 µm e submeter 1.000 µL desse extrato ao teste de ferro II, do item (b) em diante.

2) Caso não seja possível filtrar o extrato, preparar um branco modificado consistindo de 500 µL de amostra + 500 µL de HCl 1 M e adicionar 3,4 mL de água Milli-Q® e 200 µL da solução tampão (omitir a adição das soluções de hidroxilamina e ferrozina). Ler em conjunto com as amostras e descontar a absorbância obtida por esse branco da absorbância final da amostra em questão.

3) Caso as concentrações de ferro II na amostra estejam abaixo do limite de detecção do método aqui apresentado (cerca de 0,5 mg/L) proceder ao teste empregando 2,0 mL de amostra extraída em 2,0 mL de HCl 1 M e omitir a dosagem de água Milli-Q®. Na sequência, seguir os passos indicados do item (d) em diante, dosando os mesmos volumes das soluções reagentes. Neste caso, dividir a concentração aparente de ferro II obtida por 4 (fator de concentração empregado) para corrigir o resultado final da análise.

23.1.12. DETERMINAÇÃO INDIRETA DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO III (Fe³⁺)

A concentração de ferro III é obtida subtraindo o ferro II da concentração de ferro total:

$$\text{mg Fe}^{3+}/\text{L} = (\text{mg Fe}_{\text{TOTAL}}/\text{L}) - (\text{mg Fe}^{2+}/\text{L}) \quad \text{Equação 88}$$

23.1.13. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO SOLÚVEL

A filtração de amostras com pH > 4,0 (antes da etapa de extração) poderá comprometer o resultado da análise pela fácil oxidação do ferro II dissolvido e pela retenção do ferro III, de baixa solubilidade. Já a acidificação da amostra previamente à filtração irá solubilizar todo ferro presente, impedindo a determinação em separado das frações de ferro dissolvido e em suspensão. Para viabilizar a análise das frações de ferro dissolvidas, utilizar a estratégia descrita a seguir:

- (a) Coletar a amostra com auxílio de uma seringa com agulha imersa no meio líquido, evitando a entrada de ar;
- (b) utilizar um filtro de seringa para realizar a filtração imediata da amostra em membrana de 0,45 μm , descartando um volume filtrado inicial;
- (c) recolher rapidamente 500 μL de amostra filtrada diretamente em 500 μL da solução de HCl 1 M, de preferência com a ponta da ponteira submersa;
- (d) utilizar imediatamente esse extrato para a determinação de ferro total dissolvido (item 23.1.10 (c) em diante) ou ferro II dissolvido (item 23.1.11 (b) em diante);
- (e) por fim, as frações de ferro em suspensão podem ser calculadas pela diferença entre as frações totais e dissolvidas.

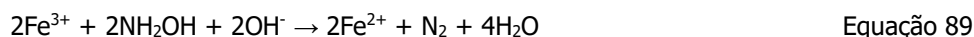
23.2. FERRO II E III – MÉTODO DA 1,10-FENANTROLINA

(COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2001; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

23.2.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A reação entre o íon ferroso (Fe^{2+}) e a 1,10-fenantrolina (também denominada ortofenantrolina), originando um complexo de cor laranja-avermelhado, constitui-se a base de um método sensível para a determinação de ferro. A intensidade da cor produzida é independente do pH no intervalo de 3,0 a 9,0 e o complexo é opticamente estável por longo período de tempo. Já pH entre 2,9 e 3,5 garante o rápido desenvolvimento da coloração na presença de ortofenantrolina em excesso.

Para viabilizar a reação, o ferro deve estar presente na forma ferrosa (reduzida) e, assim, um agente redutor é adicionado antes do desenvolvimento da reação colorante. Emprega-se como agente redutor a hidroxilamina, a qual é responsável por converter os íons férricos (Fe^{3+}) segundo a equação a seguir:



De fato, em condições redutoras, o ferro permanece no estado ferroso (Fe^{2+}). Na presença de oxigênio, por sua vez, ou pela ação de agentes oxidantes, o ferro ferroso é espontaneamente oxidado ao estado férrico (Fe^{3+}), o qual apresenta baixa solubilidade em meio líquido, a não ser que o pH da solução seja expressivamente ácido ($\text{pH} < 2,0$). Além disso, em amostras de águas residuárias, o ferro também pode ser encontrado em suspensão coloidal, complexado com a matéria orgânica ou com íons inorgânicos (COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2001). **Nota:** Alguns trabalhos da literatura propõem a utilização de ácido ascórbico como agente redutor ao invés da hidroxilamina, o que pode ser efetuado sem prejuízo do resultado da análise.

Para a determinação da concentração de ferro total, incluindo a fração coloidal e em suspensão, um pré-tratamento da amostra consistindo de ebulição com ácido forte e hidroxilamina se faz necessário para a solubilização de todo ferro presente na amostra, viabilizando a sua redução ao estado ferroso. Caso se deseje determinar apenas a fração de ferro solúvel, apenas a filtração da amostra seguida da redução por hidroxilamina é suficiente para a análise.

A 1,10-fenantrolina é específica para o ferro ferroso. Contudo, devido à instabilidade do ferro nesse estado, podendo ser facilmente oxidado a férrico, a determinação direta apenas do ferro ferroso na amostra requer cuidados especiais, tais como a coleta sob anaerobiose estrita e acidificação da amostra para estabilização do íon Fe^{2+} em solução. Nesse caso, a dosagem do reagente redutor (hidroxilamina) é omitida. Por fim, a concentração do íon férrico (Fe^{3+}) pode ser estimada indiretamente pela diferença entre os teores de ferro total e ferro II.

São interferentes da presente análise: oxidantes fortes, cianeto, nitrito, fosfatos, cromo, zinco em concentrações 10 vezes superior à de ferro, cobalto e cobre (acima de 5 mg/L), níquel (acima de 2 mg/L). Bismuto, cádmio, mercúrio, molibdato e prata precipitam com a 1,10-fenantrolina.

Matéria orgânica e cor em excesso também podem prejudicar o resultado da análise. Caso necessário, procedimentos específicos de digestão de amostras mais difíceis podem ser encontrados no *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005) e na Norma Técnica NTS 010 (COMPANHIA DE SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2001).

23.2.2. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Banho termostático (100°C) ou chapa aquecedora
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Tubos de DQO (padrão HACH®)
- Tubos de ensaio de 50 mL (tipo Pyrex®)
- Balões volumétricos de 10, 50, 200 e 1.000 mL
- Micropipetas de 200, 1.000 e 5.000 μ L
- Pipeta de vidro volumétrica de 20,0 mL
- Pipeta de Pasteur
- Provetas de vidro graduadas de 25, 100, 250 e 1.000 mL
- Copos de béquer de 100, 250 e 1.000 mL
-  cido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
-  cido Clorídrico concentrado – HCl P.A. (teor de ferro $< 0,5$ ppm)
-  cido Acético glacial – CH_3COOH P.A.
- Acetato de Amônio – $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$ P.A.
- 1,10-Fenantrolina – $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Sulfato Ferroso Amoniacal hexahidratado – $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Cloridrato de Hidroxilamina – $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ P.A.
 - **OU**  cido Ascórbico – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ P.A.

Observa o: Utilizar apenas água isenta de íons ferro (de preferência, água ultrapura – Milli-Q®) no preparo das solu es reagentes e na dilui o das amostras, para evitar interferências devidas às concentra es residuais de ferro na água de abastecimento. Para evitar contamina es, utilize apenas vidrarias lavadas com soluço de ácido clorídrico 3 N (diluir 1 volume de HCl conc. em 3 volumes de água deionizada) e enxaguadas abundantemente com água deionizada.

23.2.3. PREPARO DAS SOLU ES REAGENTES

- (a) Hidroxilamina (soluço redutora):** Dissolver 10 g do cloridrato da substância ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) em 100 mL de água ultrapura (Milli-Q®). Armazenar refrigerada em frasco tampado e identificado. **Observa o:** Ao invés da hidroxilamina pode-se empregar uma soluço de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) a 1% (10g/100mL), a qual deve ser armazenada em frasco âmbar, ao abrigo da luz, além de refrigerada. No entanto, essa soluço s    estável por poucas semanas;
- (b) 1,10-Fenantrolina (soluço cromog nica):** Dissolver 0,10 g do monohidrato da substância ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 100 mL de  gua Milli-Q® em agita o. Se necessário, aquecer até próximo de 80°C para promover a dissolu o (não deixar entrar em ebuli o). O aquecimento da soluço pode ser dispensado adicionando-se 2 gotas de HCl concentrado   água de dilui o do reagente. Descartar a soluço caso ocorra o seu escurecimento. Armazenar refrigerada e ao abrigo da luz em frasco tampado e devidamente identificado;

- (c) Acetato de Amônio (solução tampão):** Na capela, sob exaustão, dissolver 250 g de acetato de amônio em um béquer de 1.000 mL contendo 150 mL de água Milli-Q®. Na sequência, adicionar, com cuidado e usando luvas, 700 mL de ácido acético concentrado (glacial). Armazenar em frasco de vidro devidamente tampado e identificado;
- (d) HCl 6 M (solução de extração):** Na capela, sob exaustão e usando luvas nitrílicas e óculos de segurança, transferir **com cuidado e lentamente**, com auxílio de proveta graduada, 520 mL de HCl concentrado para béquer de 1.000 mL contendo 480 mL de água Milli-Q®. Aguardar a solução esfriar antes de usar;
- (e) Solução Estoque de Ferro Ferroso (200 mg Fe²⁺/L):** Na capela, sob exaustão e usando luvas e óculos de segurança, adicionar, **cuidadosamente** 20 mL de ácido sulfúrico concentrado (usar pipeta de vidro) a 100 mL de água Milli-Q® em béquer de vidro de 250 mL. Em seguida, dissolver 1,404 g de sulfato ferroso amoniacal [Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O] e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando o volume com água Milli-Q®. Evitar exposição dessa solução à luz solar direta;
- (f) Solução Intermediária de Ferro Ferroso (20 mg Fe²⁺/L):** Com auxílio da pipeta de vidro volumétrica, transferir 20,0 mL da solução mãe para balão volumétrico de 200 mL e completar com água Milli-Q®. Preparar essa solução imediatamente antes de confeccionar os padrões para a curva de calibração e evitar exposição à luz solar direta.

Observação: Cada nova solução de 1,10-fenantrolina, de hidroxilamina (solução redutora) e de acetato de amônio (solução tampão) exige o preparo de uma nova curva de calibração!

23.2.4. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,4 – 4,0 MG/L)

Preparar as soluções padrões requeridas para a construção da curva de calibração transferindo os volumes da solução intermediária de ferro ferroso (20 mg Fe/L) indicados na Tabela 35 para balões volumétricos de 50 mL, completando em seguida o volume com água Milli-Q®. Preparar os padrões em triplicatas (lembrar que isso significa preparar três soluções de cada concentração).

Tabela 35: Relação das concentrações e alíquotas da solução intermediária para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Fe/L)	Alíquota da solução mãe (mL) para diluição em balão volumétrico de 50 mL
0,0 (branco)	0,0
0,4	1,0
1,0	2,5
2,0	5,0
3,0	7,5
4,0	10,0

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

Tratar as soluções padrões seguindo os mesmos passos descritos a seguir, no item 23.2.5, para a construção da curva de calibração de ferro total, inclusive a etapa de ebulição. Para construção da curva de

calibração a ser utilizada na determinação de ferro II, submeter os padrões ao procedimento descrito mais a diante, no item 23.2.6.

23.2.5. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO TOTAL

- (a) Para a determinação de ferro total, homogeneizar a amostra e transferir 25 mL para um tubo de ensaio do tipo Pyrex® de 50 mL. **ATENÇÃO:** Para determinação de ferro total, levar em conta que a concentração de ferro na amostra não deverá exceder 4 mg/L. Caso contrário, utilizar um volume menor de amostra e diluir com água Milli-Q® para 25 mL;
- (b) adicionar 2,0 mL da solução de extração (HCl 6 M) seguidos de 0,5 mL da solução redutora de hidroxilamina (solução a);
- (c) manter o tubo de ensaio destampado em banho de água em ebulição até a fervura da amostra, aguardando a redução do volume para menos de 10 mL. Caso ocorra a evaporação total da amostra, dissolver o resíduo com 2 mL da solução de HCl + 2 mL de água Milli-Q®;
- (d) resfriar até a temperatura ambiente e adicionar 5,0 mL da solução tampão (solução c);
- (e) adicionar 2,0 mL da solução de 1,10-fenantrolina (solução b), homogeneizar e transferir quantitativamente para balão volumétrico de 50 mL, repassando o tubo sucessivas vezes com água Milli-Q® e recolhendo no balão volumétrico;
- (f) na sequência, completar o volume do balão, tampar e homogeneizar;
- (g) deixar repousar ao abrigo da luz por, no mínimo, 10 min antes de efetuar a leitura;
- (h) ao final do período de reação, transferir uma parcela do conteúdo do balão para tubo de DQO, zerar o espectrofotômetro com o branco de referência (ver observação*) e efetuar a leitura da amostra em comprimento de onda de 510 nm.

****Observação:** O branco de referência é preparado com 25 mL da amostra original sendo submetida a todos os passos acima descritos, omitindo-se, porém, a solução de 1,10-fenantrolina (item (e)) e completando o volume do balão de 50 mL com água Milli-Q®. Após o período de reação, zerar o espectrofotômetro com esse branco de referência para efetuar a leitura da amostra.*

23.2.6. PROCEDIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE FERRO FERROSO (FERRO II)

Para determinar exclusivamente a concentração do íon ferroso (Fe^{2+}), coletar a amostra em anaerobiose, evitando qualquer contato com o oxigênio atmosférico. Para isso, pode-se utilizar uma seringa com agulha imersa no meio líquido. Efetuar a análise o mais rapidamente possível, seguindo os passos elencados a seguir:

- (a) Transferir 0,2 mL da solução de extração (HCl 6 M) para balão volumétrico de 10 mL;
- (b) adicionar 5,0 mL da amostra. **ATENÇÃO:** A concentração de ferro II na amostra não deverá exceder 4 mg/L. Caso contrário, transferir um volume menor e calcular o fator de diluição empregado;
- (c) na sequência, adicionar rapidamente 2,0 mL da solução de 1,10-fenantrolina (solução b), seguidos de 1,0 mL da solução tampão (solução c);
- (d) tampar e agitar vigorosamente;
- (e) com auxílio de uma pipeta de Pasteur, completar o volume do balão com água Milli-Q®;
- (f) homogeneizar e deixar em repouso ao abrigo da luz por, no mínimo, 10 min antes da leitura;

- (g) decorrido o período da reação, transferir uma parcela do conteúdo do balão para tubo de DQO, zerar o espectrofotômetro com o branco (ver observação*) e efetuar a leitura das amostras no comprimento de onda de 510 nm.

***Observação:** O branco é preparado utilizando água deionizada no lugar da amostra. Caso a amostra apresente cor ou turbidez, preparar um branco de referência consistindo de 5 mL da amostra em questão, 0,2 mL da solução de HCl + 1,0 mL da solução tampão. Diluir com água Milli-Q® para 10 mL. Após o período de reação, zerar o espectrofotômetro com esse branco de referência para efetuar a leitura da amostra.

23.2.7. DETERMINAÇÃO INDIRETA DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO FÉRRICO (FERRO III)

A concentração de ferro III é obtida subtraindo o ferro II da concentração de ferro total:

$$\text{mg Fe}^{3+}/\text{L} = (\text{mg Fe}_{\text{TOTAL}}/\text{L}) - (\text{mg Fe}^{2+}/\text{L}) \quad \text{Equação 90}$$

23.2.8. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FERRO SOLÚVEL

Para realizar a amostragem, utilizar uma seringa com agulha imersa no líquido para evitar o contato do íon Fe^{2+} com o O_2 atmosférico, o que poderia causar a sua oxidação espontânea a Fe^{3+} , de baixa solubilidade, prejudicando a representatividade da amostra.

Na sequência, utilizar um filtro de seringa para realizar a filtração da amostra em membrana de 0,45 μm , descartando um volume filtrado inicial. Recolher, em seguida, o volume adequado de amostra filtrada para determinação de ferro total dissolvido (item 23.2.5 em diante) ou ferro II dissolvido (item 23.2.6 em diante). A fração de ferro em suspensão pode ser calculada pela diferença entre as frações total e dissolvida.

24. COBRE I E II – MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO (BCA)

(ANWAR et al., 2000)

24.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O ácido bicinconínico (BCA) é conhecido por formar um complexo estável com formas reduzidas do íon cobre (Cu^{1+}), ou cobre cuproso. Duas moléculas de BCA reagem com uma molécula de Cu^{1+} e geram um composto com coloração roxa, possível de ser medido em espectrofotômetro com comprimento de onda próximo de 560 nm. O método pode ser utilizado tanto para medir diretamente a concentração de íon cuproso (Cu^{1+}), quanto a concentração de cobre total, desde que um agente redutor (hidroxilamina) seja utilizado para converter os íons cúpricos (Cu^{2+}) de volta ao estado cuproso (Cu^{1+}) previamente à realização da análise.

O método apresenta adequada linearidade e o complexo é formado rapidamente (10 min), à temperatura ambiente, e mantém sua estabilidade durante várias horas.

Não foram reportadas interferências significativas causadas pelos seguintes cátions metálicos: Al^{3+} , Ba^{2+} , Bi^{3+} , Ca^{2+} , Ce^{4+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , La^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Hg^{2+} , Mo^{2+} , Ni^{2+} , Sn^{2+} , Sr^{2+} , Ti^{3+} , UO_2 , V^{5+} , Zn^{2+} e Zr^{4+} .

Os ânions carbonato, bicarbonato, tiosulfato, fosfato, borato, nitrito e citrato também parecem não interferir.

No entanto, a presença do íon Fe^{3+} (ferro férrico), pode causar interferências na análise da amostra, as quais podem ser evitadas por precipitação dos íons férricos em solução tampão fosfato.

24.2. MATERIAL

- Agitador e barra magnética
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Espectrofotômetro
- Agitador vórtex
- pHmetro de bancada
- Centrífuga para microtubos (Minicentrífuga de bancada)
- Tubos *Eppendorf* de 2 mL
- Micropipetas de 20, 100, 1.000 e 5.000 μL
- Cubetas de vidro com passo ótico de 1,0 cm
- Balões volumétricos de 20, 100 e 1.000 mL
- Provetas de vidro graduadas de 25, 50, 100 e 1.000 mL
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas de vidro
- Copos de béquer de 100 e 500 mL
- Tartarato de sódio e potássio - $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Cloridrato de Hidroxilamina – $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ P.A
- Ácido clorídrico concentrado – HCl P.A.
- Fosfato monossódico diidratado – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Fosfato dissódico dodecahidratado – $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Sulfato de cobre pentahidratado – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Solução comercial de ácido bicinconínico [$(\text{HO}_2\text{CC}_9\text{H}_5\text{N})_2$] 0,2%

24.3. SOLUÇÃO DE ÁCIDO CLORÍDRICO (HCL 0,5 M)

- (a) Em béquer de vidro de 500 mL colocar cerca de 300 mL de água ultrapura (Milli-Q®);
- (b) na capela, sob exaustão e usando proveta de vidro graduada, adicionar, **devagar e com cuidado**, 42 mL de ácido clorídrico concentrado. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido;
- (c) aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL;
- (d) completar o volume com água Milli-Q® e armazenar em frasco devidamente identificado.

24.4. SOLUÇÃO TAMPÃO TARTARATO

A solução tampão tartarato é preparada misturando-se 14,11 g de tartarato de sódio e potássio ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) em 100 mL de água Milli-Q®. Após a mistura, adicionar 1 mL da solução de ácido clorídrico 0,5 M (item 24.3) e ajustar o pH da solução em 5,5.

24.5. SOLUÇÃO DE ÁCIDO BICINCONÍNICO (0,1%)

Diluir um volume de solução de ácido bicinconínico (0,2%) em igual volume da solução tampão tartarato (item 24.4).

24.6. SOLUÇÃO REDUTORA DE HIDROXILAMINA (10%)

Dissolver 10,0 g de cloridrato de hidroxilamina em 100 mL de água ultrapura e agitar até a completa solubilização do reagente.

24.6.1. SOLUÇÃO TAMPÃO FOSFATO (PARA REMOÇÃO DE ÍONS Fe^{3+})

- (a) **Solução de fosfato monossódico 0,2 M (Solução A):** Em balão volumétrico de 100 mL, dissolver 3,120 g de fosfato monossódico diidratado ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) em água ultrapura. Agitar para obter completa solubilização do reagente;
- (b) **Solução de fosfato dissódico dodecahidratado 0,2 M (Solução B):** Em balão volumétrico de 25 mL, dissolver 1,791 g de fosfato dissódico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) em água ultrapura. Agitar para obter completa solubilização do reagente;
- (c) **Solução Tampão Fosfato:** Misturar 87,7 mL da solução (A) com 12,5 mL da solução (B).

24.7. SOLUÇÃO ESTOQUE DE COBRE CUPROSO (1,0 G/L Cu^{+1})

Pesar em balança analítica 0,393 g de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e dissolver em balão volumétrico de 100 mL com a solução de ácido clorídrico 0,5 M (item 24.3). Agitar até obter a completa dissolução do reagente.

24.8. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (15 – 125 MG/L)

Preparar a curva de calibração partindo da solução estoque de 1,0 g Cu^{+1} /L e realizando as diluições proposta na Tabela 36, com água ultrapura (Milli-Q®), usando balões volumétricos de 20 mL. Preparar cada padrão, no mínimo, em triplicatas (Lembrar que a triplicata consiste em preparar três soluções de mesma concentração para efetuar a medida).

Submeter os padrões ao mesmo protocolo descrito para as amostras (item 24.9) e traçar a curva de calibração. Lembrar de agitar os balões volumétricos das soluções padrões imediatamente antes de pipetar e transferir as alíquotas para o tubo de reação.

Tabela 36: Relação das concentrações e alíquotas da solução padrão para a curva de calibração.

Concentrações estimadas (mg Cu ⁺¹ /L)	Alíquota da solução mãe (mL) para diluição em balão volumétrico de 20 mL
0,0 (branco)	0,0
15,0	0,30
25,0	0,50
45,0	0,90
65,0	1,30
85,0	1,70
105,0	2,10
125,0	2,50

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita todas as vezes que novas soluções reagentes forem preparadas ou sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

24.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COBRE TOTAL

- (a) Em tubos do tipo *eppendorf* de 2,0 mL adicionar 15 µL de amostra, já previamente diluída em água Milli-Q®, caso necessário;
- (b) adicionar 200 µL da solução redutora (hidroxilamina), tampar, agitar e aguarda reagir por 10 min à temperatura ambiente;
- (c) adicionar 650 µL da solução tampão de tartarato, tampar e homogeneizar a amostra;
- (d) adicionar 50 µL da solução de ácido bicinonínico (BCA 0,1%), tampar novamente e agitar em vórtex por alguns segundos;
- (e) após o completo desenvolvimento da cor (aguardar mais 10 min), transferir uma alíquota para cubeta de vidro com passo ótico de 1,0 cm e efetuar a leitura em comprimento de onda de 562 nm, zerando o espectrofotômetro com o branco, preparado com água ultrapura (Milli-Q®) no lugar da amostra.

Observações:

1) O procedimento acima descrito se refere à determinação da concentração de cobre total da amostra, ou seja, da soma das parcelas dos íons cuproso e cúprico (Cu⁺¹ e Cu⁺²). Caso se deseje analisar apenas a fração de íon no estado reduzido (Cu⁺¹) originalmente presente na amostra, substituir a adição da solução de hidroxilamina (item 24.9 (b)) por 200 µL de água Milli-Q® e seguir os passos subsequentes. A concentração de cobre no estado oxidado (Cu⁺²), por sua vez, pode ser obtida pela diferença entre a concentração de cobre total e cobre cuproso (Cu⁺¹).

2) Caso as amostras apresentem turbidez ou coloração excessiva, que possam ocasionar interferências na leitura, convém preparar um branco modificado consistindo da amostra e os reagentes sucessivos, com exceção do ácido bicinonínico (item 24.9 (d)). Adicionar 50 µL de água ultrapura no lugar do BCA e ler em conjunto com as amostras. Subtrair, então, o valor medido na leitura desse branco modificado do resultado da análise das amostras.

24.10. PRÉ-TRATAMENTO PARA REMOÇÃO DA INTERFERÊNCIA DEVIDA AO ÍON FÉRRICO (Fe^{3+})

Caso as amostras apresentem concentrações de íon férrico em concentração na ordem de grandeza próxima da concentração de cobre, adicionar 1,0 mL da solução tampão fosfato para cada 2,0 mL de amostra a ser tratada. Agitar e transferir 2,0 mL da mistura para tubo de *ependorf*, submetendo, em seguida, a 9.500 rpm na minicentrífuga, por 3 min, para a precipitação do Fe^{3+} . Utilizar o sobrenadante na realização da análise, multiplicando o resultado final pelo fator de diluição empregado ($f = 3,0/2,0 = 1,50$).

25. CLORETOS TOTAIS – MÉTODO DE MOHR (ARGENTOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

25.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O ânion cloreto (Cl^-) pode ser determinado por meio de métodos gravimétricos, volumétricos, potenciométricos ou colorimétricos. Os métodos volumétricos, como por exemplo, os métodos de Mohr e Volhard, são extensivamente utilizados, tendo sido desenvolvidos no século XVII. O método de Mohr consiste na determinação direta do íon cloreto através da titulação da amostra com uma solução padronizada de nitrato de prata (AgNO_3), tendo uma solução de cromato de potássio (K_2CrO_4) como indicador.

O cátion Ag^+ reage com o ânion Cl^- formando cloreto de prata (AgCl), um sólido branco e insolúvel em água. O ponto final da titulação é identificado após todos os íons Ag^+ terem se depositado sob a forma de AgCl , ocorrendo então a precipitação do cromato de prata (Ag_2CrO_4), visualizado pela coloração marrom-avermelhada (vermelho tijolo).

Essa titulação exige a manutenção do pH da amostra dentro da faixa de 7,0 a 10,0. Se o meio estiver ácido ($\text{pH} < 7,0$) o cromato de potássio não reagirá com a prata, pois seu equilíbrio será deslocado no sentido da formação de dicromato. Já se o meio estiver básico ($\text{pH} > 10,0$) a prata precipitará na forma de hidróxido.

Íons brometo, iodeto, cianeto e sulfeto interferem positivamente, sendo titulados em conjunto com o cloreto. Ortofosfatos acima de 25 mg/L precipitam como fosfatos de prata. Ferro acima de 10 mg/L poderá mascarar o ponto final da titulação.

Sulfeto, tiosulfato e sulfito podem ser removidos por tratamento da amostra com peróxido de hidrogênio. Cor ou turbidez também devem ser eliminadas previamente à titulação, o que pode ser realizado com a dosagem de uma suspensão de hidróxido de alumínio seguida de decantação e filtração.

25.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 1,2 μm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Almofariz e pistilo
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Balão volumétrico de 1.000 mL
- Bureta de vidro de 50,00 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Espátula dosadora
- Estufas a 60°C e 103-105°C
- Nitrato de Prata – AgNO_3 P.A.
- Cromato de Potássio – K_2CrO_4 P.A.
- Cloreto de Sódio – NaCl P.A.
- Peróxido de Hidrogênio – H_2O_2 30% P.A.
- Ácido Sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Suspensão de Hidróxido de Alumínio (ver item 25.9)
- Indicador Fenolftaleína: Dissolver 1 g de Fenolftaleína P.A. [$\text{C}_6\text{H}_4\text{COO.C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$] em 60 mL de álcool etílico 96%, diluindo com água deionizada até os 100 mL em balão volumétrico.

Observação: Utilizar apenas água isenta de íons cloreto (de preferência, água ultrapura – Milli-Q®) no preparo das soluções reagentes e na diluição das amostras, para evitar interferências devidas às concentrações residuais de cloretos oriundos da água de abastecimento.

25.3. SOLUÇÃO PADRÃO DE NITRATO DE PRATA 0,0141 N

ATENÇÃO: O Nitrato de Prata deve ser manuseado sempre com luvas e jaleco. Pode provocar queimaduras na pele. Em baixas concentrações provoca manchas escuras persistentes por alguns dias. Por ser inflamável e explosivo, manter longe de fontes de calor, e de outros reagentes, tais como etanol, hidróxido de sódio, água oxigenada, ácidos, etc. **Cuidado!**

- (a) Triturar com almofariz e pistilo cerca de 5 g de nitrato de prata (AgNO_3) e secar em estufa a 60°C por cerca de 24 h; resfriar em dessecador imediatamente antes do uso;
- (b) em balança analítica, pesar 2,395 g do nitrato de prata previamente seco, transferindo quantitativamente para balão volumétrico de 1.000 mL usando água ultrapura (Milli-Q®);
- (c) agitar para dissolver o reagente e completar o volume do balão com água Milli-Q®;
- (d) armazenar a solução em frasco âmbar, devidamente identificado e ao abrigo da luz.

25.4. SOLUÇÃO PADRÃO DE CLORETO DE SÓDIO 0,0141 N

- (a) Pesar 0,824 g de cloreto de sódio (NaCl) previamente seco em estufa a $103\text{-}105^\circ\text{C}$ (por, no mínimo, 2 h antes do uso) e resfriado em dessecador;
- (b) dissolver em balão volumétrico de 1.000 mL com água ultrapura (Milli-Q®);
- (c) a solução resultante apresentará uma concentração de cloreto igual a 500 mg/L.

25.5. SOLUÇÃO INDICADORA DE CROMATO DE POTÁSSIO (5%)

- (a) Dissolver 50 g de cromato de potássio (K_2CrO_4) em 100 mL de água ultrapura (Milli-Q®) e adicionar;
- (b) colocar a solução em agitação magnética e ir dosando, aos poucos, a solução de nitrato de prata (AgNO_3) até que haja formação de um precipitado marrom-avermelhado persistente;
- (c) deixar a solução descansar, ao abrigo da luz, por 12 h;
- (d) filtrar em membrana de 1,2 μm para remover o precipitado;
- (e) em seguida, diluir para 1.000 mL com água Milli-Q® usando balão volumétrico;
- (f) armazenar em frasco âmbar devidamente identificado e ao abrigo da luz.

25.6. SOLUÇÃO DE ÁCIDO SULFÚRICO 1 N

Na capela, com a exaustão ligada e auxílio de proveta de vidro graduada, adicionar **cuidadosamente** 107 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) a 800 mL de água Milli-Q®. Utilizar luvas nitrílicas e óculos de segurança para manusear o ácido. Aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando em seguida o volume com água Milli-Q®.

25.7. SOLUÇÃO DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1 N

Dissolver **cuidadosamente** cerca de 40 g de hidróxido de sódio (NaOH) em 500 mL de água Milli-Q®. Utilizar luvas, óculos de segurança e realizar esse procedimento na capela, sob exaustão. Aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando com água Milli-Q®.

25.8. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE NITRATO DE PRATA

- (a) Transferir 10 mL da solução padrão de cloreto de sódio 0,0141 N para Erlenmeyer de 250 mL e completar o volume com 90 mL de água ultrapura (Milli-Q®);
- (b) ajustar o pH da solução para a faixa de 7,0 a 10,0 utilizando algumas gotas da solução indicadora de fenolftaleína (elevar o pH da solução até cor rosa clara persistente com dosagem de NaOH 1 N, abaixando o pH em seguida até a viragem para incolor com dosagem de H₂SO₄ 1 N);
- (c) adicionar 1 mL da solução indicadora de cromato de potássio e homogeneizar;
- (d) titular lentamente com a solução de nitrato de prata até o aparecimento do precipitado marrom-avermelhado (vermelho tijolo);
- (e) calcular a normalidade real da solução de nitrato de prata conforme a equação a seguir:

$$N_{\text{AgNO}_3} = \frac{(V_{\text{NaCl}} \times N_{\text{NaCl}})}{V_{\text{AgNO}_3}} \quad \text{Equação 91}$$

Na qual:

V_{NaCl} = Volume da solução padrão de cloreto de sódio utilizada (mL)

N_{NaCl} = Normalidade da solução padrão de cloreto de sódio (N)

V_{AgNO_3} = Volume da solução de nitrato de prata gasto na titulação (mL)

N_{AgNO_3} = Normalidade corrigida da solução de nitrato de prata (N)

25.9. PROCEDIMENTOS PARA A PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

– Caso a amostra apresente cor ou turbidez significativa, adicionar cerca de 3 mL da suspensão de hidróxido de alumínio (Al(OH)₃) ao volume que será utilizado na titulação, homogeneizar e aguardar a decantação. Em seguida, submeter o sobrenadante à filtração em membrana de 1,2 µm. A suspensão de Al(OH)₃ deve ser preparada conforme apresentado anteriormente, no item 18.1.5, utilizando-se apenas água Milli-Q® e repetindo a lavagem da suspensão até que não seja mais observada a presença de íons cloretos no sobrenadante (separar o sobrenadante em béquer de vidro e testar com algumas gotas da solução de nitrato de prata; caso ocorra a formação de precipitado branco, ainda há cloretos a serem removidos).

– Para a remoção de interferências devida a sulfetos, tiosulfato e sulfito, adicionar cerca de 1 mL de água oxigenada (H₂O₂ 30%) ao volume que será titulado e manter em agitação magnética por cerca de 1 min.

– Em todos os casos, recomenda-se filtrar previamente amostras contendo material em suspensão utilizando membrana com diâmetro de poro de 1,2 µm.

25.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CLORETOS

- (a) Transferir 100 mL de amostra filtrada, ou menos, contendo entre 0,25 a 20 mg Cl⁻ para um erlenmeyer de 250 mL; caso necessário, completar com água Milli-Q® para obter um volume final de, no mínimo, 50 mL;

- (b) dosar algumas gotas do indicador fenolftaleína (ver observação*) e homogeneizar;
- (c) caso a solução permaneça rosa, abaixar o pH até o ponto de viragem (incolor) com algumas gotas da solução de H₂SO₄ 1 N;
- (d) caso a solução permaneça incolor, elevar o pH com algumas gotas da solução de NaOH 1 N até coloração rosa clara persistente, e abaixar novamente até o ponto de viragem (incolor) com a solução de H₂SO₄ 1 N;
- (e) adicionar 1 mL da solução indicadora de cromato de potássio 5% e misturar;
- (f) com auxílio de uma bureta, titular vagarosamente com a solução padronizada de nitrato de prata até o aparecimento de um precipitado marrom-avermelhado (vermelho tijolo);
- (g) calcular a concentração de cloretos na amostra conforme a equação a seguir:

$$\text{mg Cl}^- / \text{L} = \frac{(V_{\text{AgNO}_3} \times N_{\text{AgNO}_3})}{V_{\text{AMOSTRA}}} \times 35.450 \quad \text{Equação 92}$$

Na qual:

V_{AgNO_3} = Volume da solução padronizada de nitrato de prata utilizada (mL)

N_{AgNO_3} = Normalidade da solução padronizada de nitrato de prata (N)

V_{AMOSTRA} = Volume inicial de amostra utilizada (mL)

***Observação:** É preferível utilizar a solução indicadora de fenolftaleína no ajuste o pH da amostra para a faixa de 7,0 a 10,0 ao invés de recorrer a pHmetro com eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), o que poderia resultar em alterações no resultado da análise de cloretos.

25.11. DETERMINAÇÃO DO BRANCO

Caso seja necessário obter resultados com maior grau de precisão, titular uma amostra de 100 mL de água livre de cloretos (água ultrapura – Milli-Q®) ao mesmo procedimento para determinação da concentração de cloretos totais (item 25.10). Descontar o volume obtido na titulação do branco (V_{BRANCO} , usualmente entre 0,2 e 0,3 mL) do volume de nitrato de prata gasto na titulação das amostras reais. Nesse caso, a equação para o cálculo da concentração de cloretos fica como mostrado abaixo:

$$\text{mg Cl}^- / \text{L} = \left[\frac{(V_{\text{AgNO}_3} - V_{\text{BRANCO}}) \times N_{\text{AgNO}_3}}{V_{\text{AMOSTRA}}} \right] \times 35.450 \quad \text{Equação 93}$$

VIII. BIOGÁS E GASES DISSOLVIDOS⁶

- 26 Oxigênio Dissolvido – Método de Winkler (Titulométrico)
- 27 Metano Dissolvido – Método Cromatográfico Indireto
- 28 Biogás – Método do Deslocamento de Volume
- 29 Sulfeto Gasoso – Método Colorimétrico Indireto



⁶ As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

26. OXIGÊNIO DISSOLVIDO – MÉTODO DE WINKLER (TITULOMÉTRICO)

(AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

26.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) constitui um parâmetro chave para a avaliação da poluição das águas naturais e para o controle dos processos de tratamento de águas residuárias.

O método de Winkler, proposto em 1888, é o procedimento titulométrico mais preciso e confiável para a determinação do oxigênio dissolvido na água, sendo inclusive utilizado em ensaios de DBO, ou ainda para a calibração e verificação da acurácia de sondas destinadas à medição do OD *in situ*.

O método se baseia na oxidação do hidróxido manganoso ($Mn(OH)_2$) pelo oxigênio dissolvido na água, resultando na formação de um precipitado marrom, o hidróxido mangânico ($Mn(OH)_4$).

Quando um precipitado branco é obtido, não existe oxigênio dissolvido na amostra.

Após a fixação do oxigênio dissolvido (pela adição de sulfato manganoso e uma base forte) a amostra é acidificada e o iodo é liberado a partir da oxidação do íon iodeto (I^-).

Uma vez que o iodo liberado é proporcional à quantidade de oxigênio dissolvido presente, essa pode ser então determinada por meio da titulação do iodo com uma solução de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$). As interferências devidas à presença de íons nitrito são evitadas pela adição de azida sódica (NaN_3).

Amostras contendo ferro férrico (Fe^{3+}) devem ser tratadas pelo procedimento modificado do permanganato. Já altas concentrações de sólidos em suspensão devem ser previamente eliminadas por coagulação e floculação com alúmen de potássio ($AlK(SO_4)_2$). Para amostras de lodos ativados, as quais apresentam altas taxas de consumo de oxigênio dissolvido, a ação dos microrganismos deve ser previamente inibida pela adição de uma solução de sulfato de cobre + ácido sulfâmico. Todas essas modificações da metodologia original podem ser encontradas no *Standard Methods* (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

Vale lembrar que amostras para determinação de OD devem ser coletadas sempre com muito cuidado: Não deixá-las em contato com o ar e não agitá-las, pois qualquer perturbação pode provocar uma mudança no seu conteúdo gasoso. Proteger da luz e titular o mais rapidamente possível.

Sulfetos, compostos reduzidos de enxofre e cloro molecular residual devem estar ausentes!

26.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 1,2 μm de poro
- Agitador magnético e barra magnética
- Aerador com pedra porosa
- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Balão volumétrico de 1.000 mL
- Béquer de 1.000 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Espátula dosadora
- Frascos de DBO com tampa esmerilhada de 250 a 300 mL
- Micropipetas de 1.000 e 10.000 μL
- Pipeta de vidro de 1,0 mL
- Provetas graduadas de 50, 100 e 1.000 mL

- Sulfato Manganoso monohidratado – $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Iodeto de sódio – NaI P.A.
- Azida Sódica – NaN_3 P.A.
- Amido solúvel – $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ P.A.
- Tiossulfato de sódio pentahidratado – $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Dicromato de potássio – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Ácido sulfúrico concentrado – H_2SO_4 P.A.

26.3. ÁGUA DE DILUIÇÃO DESOXIGENADA

Para o preparo das soluções (quando indicado), coletar previamente um volume razoável de água deionizada (~ 4,5 litros), ferver por cerca de 5 min e manter sob fluxo de nitrogênio ou argônio durante o resfriamento (por cerca de 15 min).

26.4. SOLUÇÃO DE SULFATO MANGANOSO (MNSO_4)

- (a) Dissolver 364 g de sulfato manganoso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (ou 480 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, ou ainda 400 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) em aproximadamente 800 mL de água desoxigenada;
- (b) filtrar em membrana de 1,2 μm ;
- (c) diluir em balão volumétrico de 1.000 mL.

Observação: Esta solução não deve apresentar cor na presença de amido quando for adicionada a uma solução de iodeto de potássio acidificada.

26.5. SOLUÇÃO ALCALINA DE IODETO-AZIDA

ATENÇÃO: Não acidificar essa solução para evitar a emissão de vapores tóxicos e explosivos! Manter a azida sódica e suas soluções longe de ácidos fortes e de fontes de calor! **Cuidado!**

- (a) Colocar um béquer de 1.000 mL com cerca de 800 mL de água desoxigenada em banho de gelo, na capela, sob exaustão;
- (b) dissolver **cuidadosamente** 500 g de hidróxido de Sódio (NaOH) (ou 700 g de hidróxido de potássio – KOH) e 135 g de iodeto de sódio (NaI) (ou 150 g de iodeto de potássio – KI). Utilizar luvas, jaleco e óculos de segurança para realizar o procedimento;
- (c) diluir para a marca de 1.000 mL com água desoxigenada e aguardar esfriar;
- (d) adicionar 10 g de azida sódica (NaN_3) previamente dissolvida em 40 mL de água desoxigenada e homogenizar;
- (e) armazenar em frasco plástico devidamente identificado.

Observação: Esta solução se aplica apenas para amostras saturadas ou não saturadas. Amostras supersaturadas deverão ser tratadas com uma solução mais concentrada de iodeto (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005).

26.6. SOLUÇÃO INDICADORA DE AMIDO

- (a) Dissolver 5 g de amido solúvel em um pouco de água deionizada, misturando até formar uma pasta uniforme;
- (b) transferir para um béquer contendo 1.000 mL de água fervendo e promover a mistura;
- (c) aguardar esfriar e sedimentar por 24 h;
- (d) recolher o sobrenadante e adicionar a ele 1,25 g de ácido salicílico e 4 g de cloreto de zinco, para preservar a solução.

26.7. SOLUÇÃO PADRÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 0,025 N

- (a) Em balança analítica, pesar 6,205 g de tiossulfato de sódio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- (b) dissolver juntamente com 0,4 g de hidróxido de sódio (NaOH) em aproximadamente 800 mL de água desoxigenada;
- (c) transferir para um balão volumétrico de 1.000 mL e completar o volume com água desoxigenada;
- (d) armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz, e padronizar semanalmente (ou antes do uso) com a solução padrão de dicromato de potássio 0,1 N.

26.8. SOLUÇÃO PADRÃO DE DICROMATO DE POTÁSSIO 0,1 N

- (a) Em balança analítica, pesar com exatidão 4,9 g de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), previamente seco em estufa a 103-105°C por, no mínimo, 2 h antes do uso, e resfriado em dessecador;
- (b) transferir o sal quantitativamente para um balão volumétrico de 1.000 mL usando água deionizada;
- (c) homogeneizar a solução e completar o volume;
- (d) agitar bem e armazenar em frasco âmbar, ao abrigo da luz e devidamente identificado.

26.9. PADRONIZAÇÃO DA SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO

- (a) Transferir 10 mL da solução padrão de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 0,1 N para erlenmeyer de 250 mL;
- (b) adicionar cerca de 80 mL de água deionizada;
- (c) com pipeta de vidro, adicionar 1,0 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- (d) deixar a solução repousar por 6 min no escuro;
- (e) adicionar, em seguida, uma espátula (cerca de 1 g) de KI (iodeto de potássio) livre de iodato;
- (f) titular contra a solução de tiossulfato até o aparecimento de uma coloração amarelo-palha;
- (g) adicionar algumas gotas da solução indicadora de amido e prosseguir a titulação até a viragem do azul para o incolor;
- (h) calcular a normalidade real do tiossulfato conforme a equação a seguir:

$$N_{\text{TIOSSULFATO}} = \frac{(V_{\text{DICROMATO}} \times N_{\text{DICROMATO}})}{V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}}}$$

Equação 94

Na qual:

 $V_{\text{DICROMATO}}$ = Volume da solução padrão de dicromato de potássio utilizada (mL)

$N_{\text{DICROMATO}}$ = Normalidade da solução padrão de dicromato de potássio (N)

$V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}}$ = Volume da solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação (mL)

$N_{\text{TIOSSULFATO}}$ = Normalidade corrigida da solução de tiosulfato de sódio (N)

26.10. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO

- (a) Coletar a amostra para determinação de OD cuidadosamente e evitando turbulências em frasco de DBO com tampa esmerilhada (250 a 300 mL);
- (b) adicionar, gentilmente, 1 mL da solução alcalina de iodeto-azida seguida de 1 mL da solução de sulfato manganoso;
- (c) tampar com cuidado para excluir as bolhas de ar da garrafa (não deixar *headspace*) e misturar suavemente por inversão algumas vezes;
- (d) manter em repouso até o precipitado sedimentar abaixo da metade do volume da garrafa, adicionando em seguida 1 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- (e) tampar e misturar várias vezes até dissolução completa;
- (f) transferir cuidadosamente (deixando escorrer pela parede) cerca de 100 mL para erlenmeyer de 250 mL e colocar sob lenta agitação magnética;
- (g) adicionar algumas gotas da solução indicadora de amido, o que tornará a solução azul, e titular com solução de tiosulfato 0,025 N até que a cor desapareça;
- (h) calcular a concentração de oxigênio dissolvido (OD) conforme a equação a seguir:

$$\text{mg O}_2 / \text{L} = \frac{(V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}} \times N_{\text{TIOSSULFATO}})}{V_{\text{AMOSTRA}}} \times 8.000 \quad \text{Equação 95}$$

Na qual:

$V_{\text{TIOSSULFATO GASTO}}$ = Volume da solução padrão de tiosulfato gasto na titulação (mL)

$N_{\text{TIOSSULFATO}}$ = Normalidade real da solução de tiosulfato de sódio (N)

V_{AMOSTRA} = Volume inicial da amostra (mL)

Observação: Quando a cor for muito tênue, titule devagar. Caso a cor azul não volte após o término da titulação (até 20 s depois) é sinal de que foi adicionado mais agente titulante do que o necessário!

26.11. CALIBRAÇÃO DE OXÍMETRO (SONDA DE OD)

- (a) Manter cerca de 1 litro de água deionizada sob aeração por aproximadamente 2 h;
- (b) deixar em repouso de 15 a 30 min;
- (c) transferir a água para dois frascos de DBO (250 a 300 mL);
- (d) em um dos frascos, colocar a sonda do oxímetro e ligar o aparelho;
- (e) no outro frasco, adicionar 1 mL da solução alcalina de iodeto-azida seguida de 1 mL da solução de sulfato manganoso;
- (f) tampar e agitar vigorosamente por 10 vezes;
- (g) deixar o precipitado marrom sedimentar até metade do frasco;

- (h) adicionar 1 mL de ácido sulfúrico concentrado;
- (i) tampar e agitar mais 10 vezes;
- (j) retirar uma alíquota de 100 mL e transferir para erlenmeyer de 250 mL;
- (k) adicionar algumas gotas da solução de amido;
- (l) titular com a solução de tiosulfato de sódio 0,025 N até que a amostra se torne incolor;
- (m) calcular o oxigênio dissolvido (OD) através da Equação 95 e ajustar o valor de OD obtido no oxímetro;
- (n) na sequência, completar outros dois frascos de DBO (250 a 300 mL) com água deionizada;
- (o) adicionar sulfito de sódio em ambos (cerca de uma espátula), juntamente com uma ponta de espátula de cloreto de cobalto (traços);
- (p) em um dos frascos, adicionar 1 mL da solução alcalina de iodeto-azida e mais 1 mL da solução de sulfato manganoso;
- (q) caso haja formação de um precipitado branco, colocar a sonda no outro frasco e ajustar o zero no aparelho;
- (r) caso contrário, repetir a adição de sulfito de sódio nos dois frascos, até que se forme um precipitado branco após adição de 1 mL da solução alcalina de iodeto-azida, seguida de 1 mL da solução de sulfato manganoso no frasco de teste.

27. METANO DISSOLVIDO – MÉTODO CROMATOGRÁFICO INDIRETO

(SOUZA; CHERNICHARO; AQUINO, 2011; SOUZA, 2010)

27.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

Em digestores anaeróbios, parcela dos gases gerados podem permanecer dissolvida no meio líquido (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994; NOYOLA et al., 2006). Isso acontece porque o biogás é produzido quando a concentração de seus componentes na fase líquida excedem as suas concentrações de saturação (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994). Dessa forma, uma parte do biogás gerado acaba sendo perdida com o efluente, liberada para a atmosfera com a despressurização da corrente líquida do sistema.

As perdas práticas de metano em um reator UASB podem variar de 20 a 60% em função do metano dissolvido no efluente que acaba liberado para a atmosfera (VAN HAANDEL; LETTINGA, 1994; AGRAWAL et al., 1997; SINGH; VIRARAGHAVAN, 1998). Hartley e Lant (2006), desenvolveram a hipótese de que o metano dissolvido no efluente de reatores anaeróbios poderia estar supersaturado em relação à saturação teórica proposta pela lei de Henry, o que também pode estar relacionado com problemas de transferência de massa da fase líquida para a gasosa (PAUSS et al., 1990).

Esses estudos, vistos em perspectiva, apontam para a necessidade de um melhor entendimento da supersaturação do metano e de outros componentes gasosos do biogás gerados em sistemas anaeróbios. E isso tanto para evitar, no âmbito das estações de tratamento de efluentes, a emissão excessiva de gases responsáveis pelo efeito estufa, caso do CH_4 e do CO_2 , quanto para minimizar as perdas de metano que impactam negativamente na recuperação de energia pelo reaproveitamento do biogás.

O método aqui apresentado permite quantificar a fração de metano dissolvida no efluente de reatores anaeróbios, e foi proposto por Souza (2010). Destaca-se que o presente método é de fácil execução, e pode ser utilizado para quantificar também outros componentes gasosos presentes na forma dissolvida em efluentes de biorreatores (por exemplo, H_2 e CO_2).

27.2. MATERIAL

- Balança analítica
- Cromatógrafo gasoso
- Câmara termostática ou incubadora com temperatura controlada
- Seringa cromatográfica ou seringa com válvula *gas-tight*
- Frascos de antibiótico (60 mL) com tampas de borracha e lacres de alumínio
- Alicates lacrador/recravador (Crimper)
- Válvula *gas-tight*
- Agulha
- Mangueiras de poliuretano (PU)
- Linha de gás inerte (por exemplo: N_2 ou Argônio)

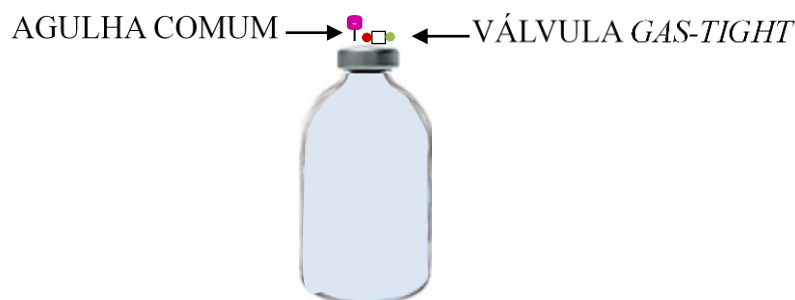
27.3. PREPARO DOS FRASCOS DE ENSAIO

Para o desenvolvimento da metodologia, separar frascos de antibiótico de 60 mL, aferindo o peso vazio de cada frasco (P_0 , em g) e o peso dos mesmos cheios de água (P_1 , em g). Pela diferença de peso, determinar o volume líquido (mL) de cada frasco ($P_f = P_1 - P_0$). Para efeito de cálculo, considerar a massa específica da água de 1,0 g/mL.

27.4. PROCEDIMENTO

- (a) Encher o frasco de antibiótico com água de torneira e lacrar o frasco. Conecte duas agulhas à tampa de butila, sendo que uma delas deverá estar acoplada à válvula *gas-tight* (ver Figura 10).

Figura 10: Esquema de frasco de antibiótico cheio de água com duas agulhas conectadas à tampa de butila, sendo uma agulha comum e a outra agulha conectada à válvula *gas-tight*



Fonte: Os autores.

- (b) conecte a válvula *gas-tight* aberta à linha de gás (os tubos PU de 4 mm são os mais indicados) e fluxione N_2 ou argônio até esvaziar completamente o frasco (Figura 11). A água será expulsa pelo orifício da outra agulha. Dessa forma, garantimos que toda atmosfera do frasco lacrado conterá apenas gás inerte;

Figura 11: Demonstração de esvaziamento do líquido do frasco de antibiótico com gás inerte.



Fonte: Os autores.

- (c) após o esvaziamento do frasco, deixe fluxionando gás inerte por mais 2-3 min, assegurando que todo o frasco estará exclusivamente cheio do gás inerte, sem oxigênio. Ao final desse tempo, desligue o fluxionamento do gás e retire a agulha comum, deixando apenas a agulha com a válvula *gas-tight* na posição fechada. Dessa forma, o frasco estará submetido a uma atmosfera anaeróbia em pressão atmosférica;
- (d) na sequência, coletar cerca de 25 ml do efluente com uma seringa;

- (e) transferir o líquido da seringa para o frasco de antibiótico preparado conforme os itens anteriores (injetar a amostra através da agulha com válvula *gas-tight*, fechando a válvula antes de retirar a seringa para evitar escape ou contaminação da fase gasosa);
- (f) caso a amostra não seja analisada imediatamente, conservar em geladeira;
- (g) imediatamente antes de realizar a análise, ambientar os frascos por, no mínimo, 50 min à temperatura controlada (25°C). De preferência, mantê-los em incubadora, com agitação por cerca de 10 min, para o estabelecimento do equilíbrio entre as fases líquida e gasosa. Caso não seja possível, agitar manualmente os frascos por alguns minutos, deixando descansar um pouco antes de efetuar a amostragem do gás;
- (h) com seringa própria, amostrar uma alíquota da fase gasosa, permitindo o equilíbrio da pressão na seringa com a pressão do *headspace* do frasco;
- (i) determinar a composição com auxílio de cromatografia gasosa, de acordo com as recomendações do equipamento e metodologia de uso corrente;
- (j) o cálculo é então efetuado de acordo com a equação a seguir:

$$[\text{CH}_4]_d = \frac{\frac{[\% \text{CH}_4]_g}{100} \cdot [\text{dens} \cdot V_{\text{gás}} + (P_{\text{local}} - P_{\text{vap}}) \cdot K_H \cdot V_{\text{líq}}]}{V_{\text{líq}}}}{\quad} \quad \text{Equação 96}$$

Na qual:

$[\text{CH}_4]_d$ é a concentração de metano dissolvido no efluente (mg/L);

$[\% \text{CH}_4]_g$ é a fração de metano no *headspace* do frasco (%);

dens é a densidade do metano (595,4 mg/L a 25°C e 0,91 atm);

$V_{\text{gás}}$ é o volume da fase gasosa do frasco, obtido pela diferença entre o volume total do frasco (item 27.3) e o volume de amostra líquida (mL);

P_{local} é a pressão atmosférica local (atm);

P_{vap} é a pressão de vapor de água (0,032 atm a 25 °C);

K_H é a constante da Lei de Henry para o metano (21,5 mg/L.atm a 25°C);

$V_{\text{líq}}$ é o volume da fase líquida (amostra) no frasco (mL).

Por fim, para transformação dos valores em termos de vazão de metano dissolvido, aplicar o cálculo que segue:

$$P_{\text{CH}_4} = \frac{[\text{CH}_4]_d \cdot Q_{\text{efl}}}{\text{dens}} \quad \text{Equação 97}$$

Na qual:

P_{CH_4} é a vazão volumétrica diária de metano dissolvido perdido no efluente do reator (L CH_4 /d a 25°C);

$[\text{CH}_4]_d$ é a concentração de metano dissolvido no efluente (mg/L);

dens é a densidade do metano (595,4 mg/L a 25°C e 0,91 atm);

Q_{eff} é a vazão diária de efluente líquido produzido pelo o reator (L/d).

Observações:

1) Para a correção da constante de Henry para outras condições de temperatura e pressão, bem como para consultar os valores das constantes de outros constituintes do biogás, utilizar a compilação de dados e cálculos reportados por Sander (1999).

2) A injeção de um volume de amostra no frasco lacrado provocará uma alteração na pressão interna do mesmo. No entanto, como os volumes em questão são pequenos, essa variação pode ser negligenciada. Vale pontuar que a medição de pressão com os transdutores disponíveis no LPB também provocam uma pequena variação a cada medição, e portanto, também introduzem erros na medição. Assim, recomenda-se adotar a pressão atmosférica para os efeitos dos cálculos.

3) Um outro protocolo para preparo do frasco envolve utilizar uma válvula de três vias para criar vácuo no frasco lacrado. Nesse caso, ao adicionar um volume de amostra líquida, deve-se necessariamente proceder à medição da pressão interna com um transdutor. O operador deverá estar atento à possibilidade de ocorrência de pressões parciais negativas e ao uso de equipamentos adequados (nem todos os transdutores disponíveis no LPB são capazes de efetuar a medição de pressões negativas).

28. BIOGÁS – MÉTODO DO DESLOCAMENTO DE VOLUME

(AQUINO et al., 2007; WALKER et al., 2009)

28.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A produção de biogás é medida com o auxílio de um gasômetro composto por um erlenmeyer ou frasco Duran® adaptado (selo hídrico) e uma pipeta graduada de 25,0 a 50,0 mL (para reatores em batelada) ou um frasco de Mariotte (para reatores com produção contínua).

O biogás que sai do reator atravessa o selo hídrico, o qual contém uma solução fortemente alcalina (para a retenção do CO₂ e do H₂S) ou uma solução salina acidificada (para minimizar a solubilização dos gases presentes), deslocando um volume de líquido que é igual ao volume de metano ou hidrogênio produzido (no primeiro caso), ou ao volume de biogás total produzido (no segundo caso).

28.2. MATERIAL

- Balança semi-analítica (precisão ± 0,01 g)
- Béquer de 2.000 mL
- Erlenmeyers com rolha (ou frascos Duran® com tampa de butila)
- Frasco de Mariotte
- Pipetas de vidro graduadas de 25,0 e 50,0 mL
- Proveta graduada de 1.000 e 2.000 mL
- Pipeta de Pasteur ou dosador tipo conta-gotas
- Espátula dosadora
- Mangueiras (Tygon® ou PU)
- Ácido Sulfúrico concentrado – H₂SO₄
- Cloreto de Sódio – NaCl
- Hidróxido de Sódio – NaOH
- Indicador Fenolftaleína: Dissolver 1 g de Fenolftaleína P.A. [C₆H₄COO.C(C₆H₄OH)₂] em 60 mL de álcool etílico 96%, diluindo com água deionizada até os 100 mL em balão volumétrico.
- Indicador Alaranjado de Metila: Dissolver 0,1 g de Alaranjado de Metila [C₁₄H₁₄N₃NaO₃S] em 100 mL de água deionizada.

28.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES SELETIVAS PARA O SELO HÍDRICO (WALKER ET AL., 2009)

28.3.1. SOLUÇÃO ALCALINA (NAOH 12% – PH > 14)

- (a) Em balança semi-analítica e usando béquer de 2.000 mL, pesar cerca de 120 g de hidróxido de sódio (NaOH);
- (b) na capela, com a exaustão ligada, colocar o béquer com a massa de hidróxido em banho de água com gelo e adicionar, **com cuidado e vagorosamente**, cerca de 1 litro de água;
- (c) misturar a solução com bastão para homogeneizar e aguardar o resfriamento;
- (d) dosar cerca de 10 a 20 gotas da solução indicadora de Fenolftaleína e homogeneizar: uma cor violeta forte deverá surgir brevemente, desaparecendo em seguida, uma vez que a Fenolftaleína perde a coloração em soluções alcalinas muito concentradas;

- (e) com o passar do tempo, depois de colocada em uso, essa solução deverá se tornar novamente violeta, o que indica a absorção do CO_2 (e H_2S) e a queda do pH da solução. Quando se tornar rosa clara, antes de voltar a ficar transparente, a solução deverá ser substituída.

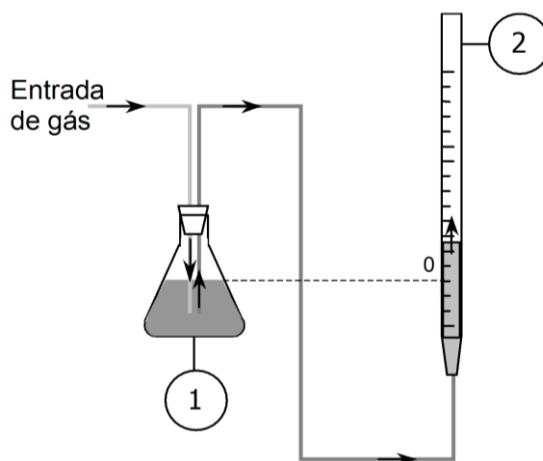
28.3.2. SOLUÇÃO SALINA ACIDIFICADA (NaCl 75% DE SATURAÇÃO – pH ~ 2,0)

- (a) Em balança semi-analítica e usando béquer de 2.000 mL, pesar cerca de 270 g de cloreto de sódio (NaCl);
- (b) adicionar 1.000 mL de água e manter em agitação magnética vigorosa até a completa dissolução do sal;
- (c) em seguida, dosar 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) para abaixar o pH da solução até próximo de 2,0;
- (d) por fim, adicionar cerca de 10 a 20 gotas da solução indicadora de alaranjado de metila até a obtenção de uma coloração avermelhada (pH < 3,2). A solução deve ser trocada sempre que perder a coloração original.

28.4. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO EM REATORES EM BATELADA

Figura 12: Esquema de gasômetro utilizado para medir a produção de biogás de reator em batelada.

(1 – selo hídrico contendo a solução seletiva; 2 – pipeta graduada).



Fonte: Os autores.

A saída de gás do reator em batelada é conectada a uma mangueira, a qual entra pelo selo hídrico (confeccionado a partir de um erlenmeyer ou frasco Duran® com rolha ou tampa) e é mergulhada na solução de NaOH 12% (120 g/L e pH > 14). Outra mangueira, também mergulhada na solução de NaOH, liga a solução alcalina do selo hídrico à pipeta. Desta forma, o volume dos gases produzidos no reator entra no selo hídrico, sendo lavado pela solução alcalina. Em seguida, o metano (ou hidrogênio) é liberado para o *headspace* do selo hídrico e causa um aumento na pressão, levando ao deslocamento da solução de NaOH na pipeta, permitindo assim a quantificação direta do CH_4 ou H_2 produzido, enquanto CO_2 e H_2S são retidos pela solução de NaOH (

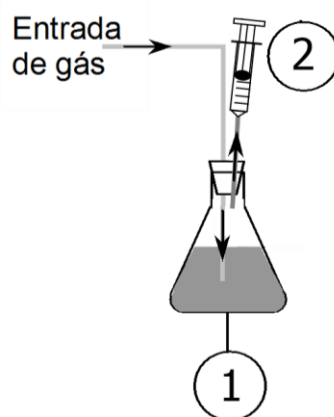
Figura 12). A solução alcalina deve ser substituída sempre que passar de incolor para violeta seguida de rosa clara, o que indica a saturação do líquido pela absorção do CO_2 .

Caso se deseje aferir o volume de biogás total produzido, trocar a solução de NaOH do selo hídrico por uma solução salina acidificada (NaCl 75% de saturação e pH \sim 2,0), para minimizar a solubilidade dos gases (especialmente do CO₂) no líquido do selo hídrico.

Outra forma de efetuar a medição direta do volume de metano, hidrogênio ou biogás produzido em batelada é a utilização de uma seringa de vidro esmerilhada (a qual não oferece resistência ao deslocamento) conectada pela agulha à rolha ou tampa do selo hídrico (Figura 13). O biogás, que borbulha na solução seletiva, causa o aumento da pressão no *headspace* do frasco, impulsionando o êmbolo da seringa:

Figura 13: Esquema de gasômetro utilizado para medir a produção de biogás de reator em batelada.

(1 – selo hídrico contendo a solução seletiva; 2 – seringa esmerilhada com agulha conectada à rolha do selo).



Fonte: Os autores.

Antes de iniciar a medida da produção de gás, imediatamente após a etapa de carga do sistema, deve-se sempre circular nitrogênio no *headspace* do reator com a finalidade de eliminar qualquer possível resíduo de biogás da batelada anterior, evitando assim qualquer interferência na medida.

A medida de biogás em reator ASBR (reator anaeróbio em bateladas sequenciais) consiste do seguinte procedimento:

- (a) Fluxo de N₂ no *headspace* do reator por 3 min;
- (b) conexão do gasômetro (fechar outras mangueiras do reator), sendo que a tampa do reator e a entrada do eixo de agitação não podem apresentar vazamentos;
- (c) para evitar a pressurização do reator, medir o deslocamento de volume do gasômetro em intervalos de tempo que não excedam a altura de 10 cm;
- (d) retirar amostra do *headspace* do reator para análise da composição do biogás (quando for o caso);
- (e) fazer a purga do sistema, abrindo a tampa ou rolha do selo hídrico (manter as mangueiras afogadas) e aguardar a despressurização do *headspace* do reator, e também a equalização das alturas da solução no selo hídrico e na pipeta graduada (quando for o caso);
- (f) marcar os tempos inicial e final da amostragem para o cálculo da vazão de biogás produzido.

Observação: Ao manusear o gasômetro, tomar cuidado para que a solução do selo hídrico não retorne e seja sugada para dentro do reator!

Por se tratar de sistemas em batelada, a determinação da produção em reatores do tipo ASBR se dá a partir do seu acompanhamento através de um perfil temporal, que corresponde ao tempo de ciclo ao qual o sistema está submetido.

Durante um perfil temporal, inicialmente determina-se a pressão atmosférica local. Após o tempo de purga do sistema (cerca de 3 min de N₂), inicia-se a determinação da produção de metano/hidrogênio ou biogás total, acompanhando-se os valores de temperatura, intervalo de tempo da medição e volume deslocado. A correção para as CNTP é feita através da seguinte equação:

$$\frac{P_a \times V_a}{T_a + 273,15} = \frac{P_{\text{CNTP}} \times V_{\text{CNTP}}}{T_{\text{CNTP}}} \quad \text{Equação 98}$$

Na qual:

P_a = pressão atmosférica à qual o reator é submetido (mm Hg);

V_a = volume de biogás (ou metano/hidrogênio) nas condições do ensaio (mL);

T_a = temperatura à qual o reator é submetido (°C);

P_{CNTP} = pressão atmosférica nas CNTP (730 mmHg);

V_{CNTP} = volume de biogás (ou metano/hidrogênio) nas CNTP (mL);

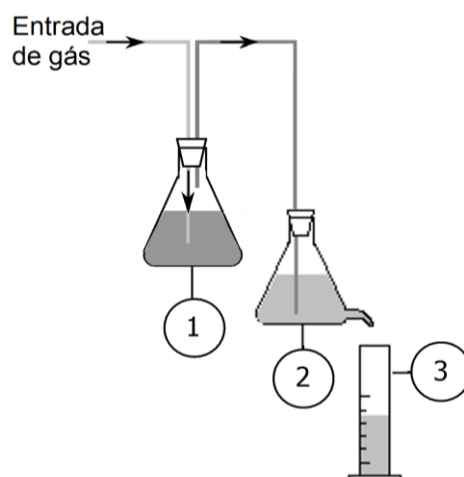
T_{CNTP} = temperatura nas CNTP (0°C).

A variação do volume no intervalo de tempo (dV/dt), ou seja, a vazão do biogás (ou de metano/hidrogênio) produzido, é determinada pela razão $V_{\text{CNTP}} / \Delta t_{\text{LEITURA}}$.

28.5. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO EM REATORES CONTÍNUOS

Figura 14: Esquema de gasômetro utilizado para medir a produção de biogás em reator contínuo.

(1 – selo hídrico contendo a solução seletiva; 2 – frasco de Mariotte contendo água; 3 – proveta graduada).



Fonte: Os autores.

A saída de gás do reator, perfeitamente hermético, é mergulhada na solução alcalina do selo hídrico (erlenmeyer ou frasco Duran® selado) para absorção do CO₂ e do H₂S do biogás. O *headspace* do selo hídrico é conectado ao fundo do frasco de Mariotte. Após borbulhar na solução alcalina (NaOH 12% e pH > 14), o

metano ou hidrogênio ocasiona o aumento da pressão no *headspace* do selo hídrico e, conseqüentemente, do frasco de Mariotte, cuja abertura elimina água, coletada pela proveta (Figura 14).

O volume deslocado de líquido corresponde ao volume de gás introduzido, ou seja, o volume de água medida na proveta é igual ao volume de CH₄ ou H₂ produzido. A solução alcalina deve ser trocada de tempos em tempos, sempre que passar de incolor para violeta seguida de rosa clara, indicando a saturação do meio líquido pelo CO₂ e a queda do pH.

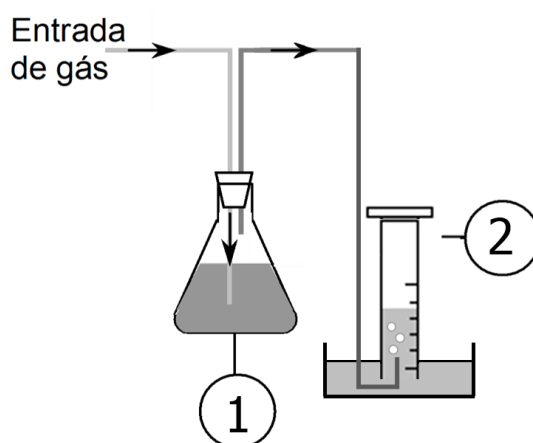
Para efetuar a medição da produção de biogás total, e não somente de metano ou hidrogênio, trocar a solução alcalina do selo hídrico por uma solução salina acidificada (NaCl 75% de saturação e pH ~ 2,0), minimizando assim a solubilidade dos gases (principalmente do CO₂) no líquido do selo. É importante, nesse caso, utilizar a solução salina acidificada também para preencher o frasco de Mariotte.

Uma alternativa adicional para medição do biogás em reatores contínuos é a da proveta emborcada (Figura 15), a qual consiste em utilizar uma proveta graduada cheia de líquido, fixada de cabeça para baixo, com a boca submersa em recipiente parcialmente repleto do mesmo líquido que a proveta. O biogás que atravessa o selo hídrico é transportado por uma mangueira até a entrada da proveta. A saída do biogás (afogado no meio líquido) provoca um deslocamento na coluna líquida da proveta, cujo volume pode ser aferido visualmente.

Como no caso do Mariotte, se o objetivo da medição for apenas determinar a porção de metano ou hidrogênio presente no biogás, deve-se colocar a solução de NaOH no selo hídrico, enquanto que na proveta basta colocar água. Já para medir o volume de biogás total, convém preencher também a proveta com a solução salina acidificada.

Para efetuar a correção da produção de biogás para as CNTP, aplicar a Equação 98.

Figura 15: Esquema de gasômetro utilizado para medir a produção de biogás em reator contínuo. (1 – selo hídrico contendo a solução seletiva; 2 – proveta graduada emborcada em recipiente adequado).



Fonte: Os autores.

Observação: É *fortemente recomendável* a inserção de um selo de retenção previamente ao selo hídrico, constituído por um erlenmeyer ou frasco Duran® vazio e lacrado, o qual o biogás atravessa entrando e saindo pela parte superior. Caso as soluções do selo hídrico retornem, ficarão retidas no selo de retenção, mantendo o reator a salvo.

29. SULFETO GASOSO – MÉTODO COLORIMÉTRICO INDIRETO

29.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A presente metodologia, idealizada no LPB, propõe realizar a quantificação do sulfeto de hidrogênio (H_2S) proveniente de amostras gasosas utilizando o método colorimétrico do azul de metileno, o mesmo utilizado na determinação de sulfeto total em amostras líquidas (item 20.1). Para esta finalidade, a amostra gasosa deverá ser transferida para um tubo à vácuo contendo uma solução de acetato de zinco, na qual o gás sulfídrico é fixado sob a forma de sulfeto de zinco (ZnS). Hidróxido de sódio é empregado para elevar o pH da solução e promover a precipitação do ZnS .

29.2. MATERIAL

- Espectrofotômetro
- Cilindro de H_2S padrão
- Tubos de coleta de sangue à vácuo (ou frascos de antibiótico lacrados à vácuo)
- Seringa cromatográfica ou seringa com válvula *gas-tight*
- Seringas (tipo BD®) e agulhas
- Micropipetas de 100 e 200 μL , e de 5 mL
- Termômetro para aferição da temperatura ambiente
- Tubos de DQO padrão HACH®
- Reagentes HACH® para sulfeto: *Sulfide Reagent 1* (ref. 1816-32) e *Sulfide Reagent 2* (ref. 1817-32)
- Solução de Acetato de Zinco 1 M (preparo conforme item 20.1.3)
- Solução de Hidróxido de Sódio 10 M (preparo conforme item 20.1.4)

29.3. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO (0,02 – 0,2 $\mu MOLS H_2S$)

- (a) Preparar os tubos à vácuo para coleta do H_2S gasoso, injetando, com o auxílio de uma seringa e agulha, 5 mL de uma solução consistindo de 4,7 mL de água deionizada e 200 μL da solução de acetato de zinco (1 M);
- (b) preparar os pontos da curva de calibração injetando lentamente, e com o auxílio de uma seringa cromatográfica (ou seringa com válvula *gas-tight*), o H_2S gasoso padrão diretamente na solução de acetato de zinco (mantendo a ponta da agulha imersa na solução). Os volumes de H_2S para cada ponto da curva de calibração são apresentados na Tabela 37. **ATENÇÃO:** É fundamental que cada ponto da curva seja preparado em triplicatas. O número de mols de H_2S para cada ponto da curva foi calculado através da equação dos gases ideais ($PV = nRT$), considerando-se uma temperatura ambiente de 25°C, a qual deve ser corrigida conforme a temperatura medida no momento da coleta. Levantar em conta também o teor de H_2S do cilindro, corrigindo proporcionalmente os volumes empregados (no presente caso, considerou-se um cilindro de H_2S com pureza de 99,9%);
- (c) adicionar, com o auxílio de seringa e agulha, 100 μL de NaOH (10 M) para elevar o pH e favorecer a precipitação do sulfeto de zinco (ZnS);
- (d) agitar o frasco para ressuspender o precipitado de forma homogênea, abrir e retirar rapidamente uma alíquota da mistura. Devido à alta concentração de H_2S no cilindro em questão, uma diluição

- de 200 vezes deverá ser empregada. Para isto, transferir com auxílio de micropipeta 25 µL da mistura para a cubeta do ensaio (tubo de DQO), completando com 4975 µL de água deionizada;
- (e) efetuar a leitura dos padrões conforme o mesmo procedimento descrito na sequência para as amostras (item 29.4 (f) em diante);
- (f) construir a curva de calibração plotando o número de mols de H₂S em função dos respectivos valores médios de absorvância obtidos em cada nível de concentração.

Tabela 37: Volumes requeridos de H₂S gasoso para preparar a curva de calibração. O número de mols estimado para cada nível já se encontra corrigido de acordo com o fator de diluição adotado.

Número de mols de H ₂ S estimado a 25°C (µmols)	Volume (µL) de H ₂ S gasoso (99,9%)
0,0 (branco)	0
0,020	100
0,041	200
0,061	300
0,082	400
0,102	500
0,123	600
0,143	700
0,164	800
0,184	900
0,204	1.000

Observação: A curva de calibração deverá ser refeita sempre que o aparelho passe por manutenção.

Fonte: Os autores.

Observação: Caso não haja disponibilidade de tubos de coleta à vácuo, podem ser preparados frascos de antibiótico com tampas de borracha e lacres de alumínio. Nesse caso, utilizar bomba à vácuo equipada com seringa e agulha na ponta da mangueira para gerar o vácuo adequado no interior do frasco.

29.4. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE MOLS DE H₂S EM AMOSTRAS GASOSAS

- (a) Coletar um volume adequado do biogás a ser analisado, conforme o teor esperado de sulfeto, utilizando para isso seringa cromatográfica (ou seringa com válvula *gas-tight*);
- (b) preparar os tubos à vácuo para coleta do H₂S gasoso injetando, com auxílio de seringa e agulha, 5,0 mL de uma solução consistindo de 4,7 mL de água deionizada e 200 µL da solução de acetato de zinco (1 M);
- (c) injetar lentamente a amostra gasosa diretamente na solução de acetato de zinco, mantendo a ponta da agulha imersa na solução;
- (d) na sequência, adicionar, com o auxílio de seringa e agulha, 100 µL da solução de NaOH (10 M) para elevar o pH e favorecer a precipitação do sulfeto de zinco (ZnS);
- (e) agitar o frasco para ressuspender o precipitado de forma homogênea, abrir e retirar rapidamente uma alíquota da mistura. Geralmente, para amostras de biogás real, pode-se transferir diretamente 5,0 mL da mistura para a cubeta do ensaio (tubo de DQO), omitindo a etapa de diluição;

- (f) preparar, em conjunto com as amostras, um branco consistindo de 5 mL de água deionizada diretamente no tubo de DQO;
- (g) em seguida, adicionar a todas as cubetas, com auxílio de micropipeta, 200 μL do reagente 1 (*Sulfide Reagent 1*);
- (h) acrescentar 200 μL do reagente 2 (*Sulfide Reagent 2*);
- (i) tampar e misturar por inversão suave dos tubos;
- (j) selecionar absorvância de 665 nm no espectrofotômetro e acionar o cronômetro;
- (k) após 5 min de reação, zerar o equipamento com o branco (preparado ao mesmo tempo que as amostras) e efetuar a leitura das absorvâncias;
- (l) calcular o número de mols de H_2S da amostra interpolando o resultado na curva de calibração.

29.5. CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE H_2S NO BIOGÁS

A concentração de H_2S em diferentes unidades é obtida a partir das seguintes equações:

$$\text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol/L}) = \frac{n (\text{mols})}{V \times 10^{-6}} \quad \text{Equação 99}$$

$$\text{H}_2\text{S} (\text{ppm}) = \text{H}_2\text{S} (\mu\text{mol/L}) \times \text{MM} \times 10^{-3} \quad \text{Equação 100}$$

$$\text{H}_2\text{S} (\text{ppmv}) = \frac{\text{H}_2\text{S} (\text{ppm}) \times R \times (273 + T) \times 1000}{\text{MM}} \quad \text{Equação 101}$$

Nas quais:

V é o volume de amostra gasosa em μL ;

T é a temperatura do biogás no momento da coleta em $^{\circ}\text{C}$;

MM é a massa molar do H_2S , equivalente a 34,1 g/mol;

R é a constante universal dos gases ideais, equivalente a 0,082 atm.L/mol.K;

ppmv (partes por milhão em volume) é equivalente a mL/m³.

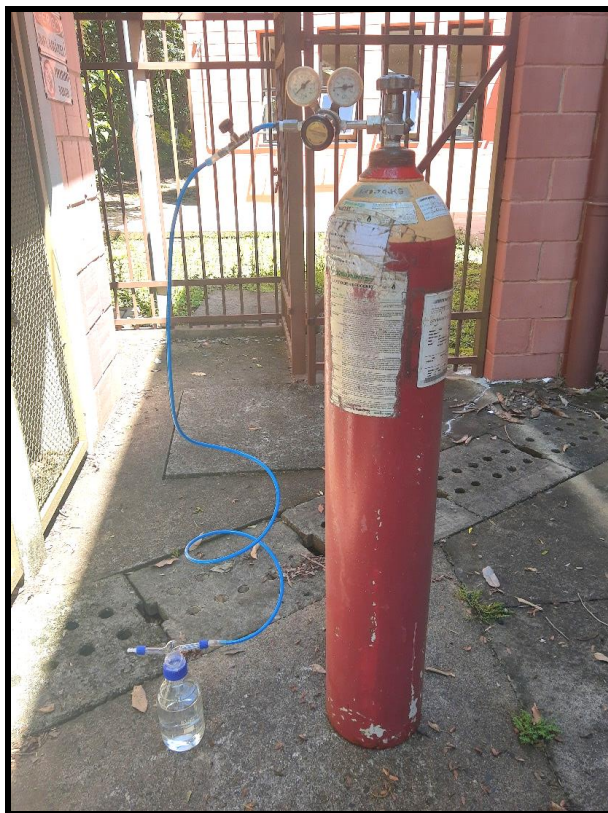
29.6. CUIDADOS PARA COLETA DO H_2S PARA LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

ATENÇÃO: Para realizar a coleta do H_2S gasoso do cilindro de gás padrão, seguir as medidas de segurança abaixo elencadas:

- (1) Utilizar máscara facial para gases ácidos;
- (2) Realizar a coleta do gás em ambiente externo, aberto e arejado;
- (3) O cilindro deve ser conectado a um frasco lavador de gás contendo NaOH (10 M), no qual o sulfeto é borbulhado, enquanto a amostragem é efetuada com seringa em um trecho de silicone da mangueira (Figura 16);

- (4) A solução de NaOH deve ser trocada periodicamente, sempre que se mostrar saturada. Para isso, pode ser útil empregar fenolftaleína como indicador (Ver item 28.3.1).

Figura 16: Foto do sistema utilizado para coleta de H₂S composto pelo cilindro de gás e frasco lavador de gás.



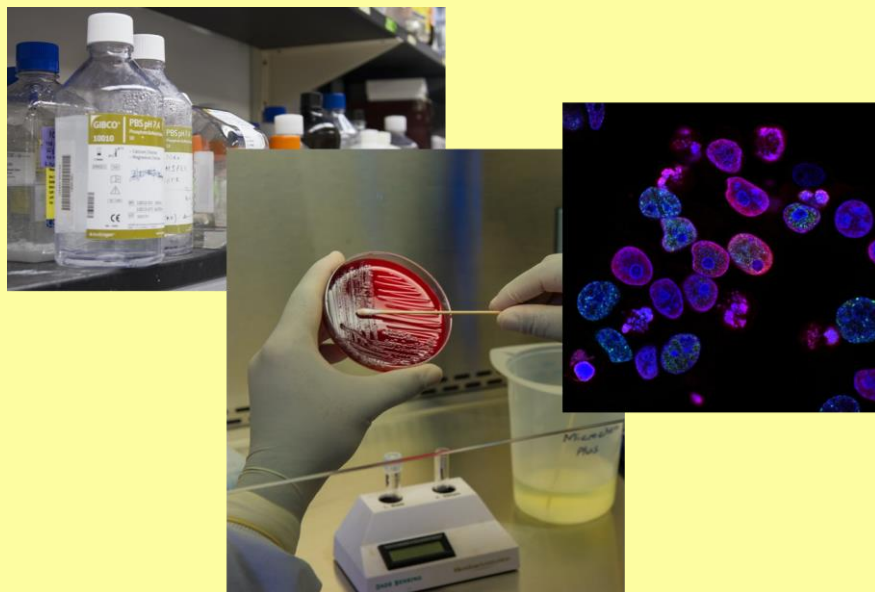
Fonte: Os autores.

IX. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA⁷

30 Granulometria de Lodos Biológicos – Método de Processamento de Imagem

35 Clorofila – Método Espectrofotométrico

36 Atividade Enzimática da Celulase – Método do Papel de Filtro



⁷ As imagens desta página foram retiradas do site <https://unsplash.com/>, conforme a licença de uso disponível.

30. GRANULOMETRIA DE LODOS BIOLÓGICOS – MÉTODO DE PROCESSAMENTO DE IMAGEM

(ALVES et al., 2018)

30.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

O sucesso do uso da tecnologia UASB para o tratamento de uma ampla gama de efluentes está fortemente relacionado ao fenômeno da granulação do lodo anaeróbio. As características do grânulo na manta de lodo estão associadas a inúmeros fatores relacionados à natureza das águas residuárias e às características de projeto e operação do reator, como apontado por Grotenhuis et al. (1991). O processo de agrupamento celular, que começa quando os microrganismos se tornam sensíveis aos parâmetros ambientais ou à condições de estresse, compreende uma importante estratégia de sobrevivência, uma vez que as células são protegidas contra agressões externas.

A imobilização adequada de microrganismos é o que fará a diferença entre um sistema de tratamento de alta taxa bem-sucedido e os outros, independentemente do sistema de tratamento considerado. A imobilização de biomassa é um arranjo metabólico complexo e estável que permite condições ambientais ideais para todos os seus membros (MACLEOD; GUIOT; COSTERTON, 1990).

O fenômeno de granulação ocorre continuamente nos reatores UASB e o aumento ou redução do tamanho dos grânulos acontece de acordo com as condições impostas às unidades operacionais. O monitoramento da dinâmica do tamanho de lodo granular é uma ferramenta poderosa na previsão da estabilidade do reator que, associada a outros parâmetros de monitoramento, pode esclarecer possíveis causas de desequilíbrio do processo anaeróbio durante diferentes períodos operacionais (LETTINGA et al., 1997).

O sintrofismo microbiano que a imobilização da biomassa beneficia é requisito fundamental para o desenvolvimento do processo de digestão anaeróbia. A manta de lodo dos reatores é composta por microrganismos que formam naturalmente grânulos com tamanho geralmente dentro da faixa de 0,5 a 5 mm de diâmetro, os quais resistem ao arraste para fora do reator graças às suas propriedades de sedimentação, mesmo sob cargas hidráulicas elevadas (SHOW et al., 2004). A predominância de grânulos menores também já foi reportada em alguns trabalhos da literatura. Lu et al. (2013), por exemplo, relataram uma maior frequência de grânulos com diâmetros na faixa de 0,4 a 4 mm. Gagliano et al. (2017), por sua vez, encontraram grânulos com tamanho na faixa de 0,5 a 3 mm. Enquanto Del Nery et al. (2008) observaram grânulos com diâmetros que variavam de 0,1 a 3,5 mm.

Embora seja cada vez mais crescente o interesse em entender o processo de granulação e manutenção da manta de lodo, não há nenhum relatório disponível na literatura até o presente momento no qual a metodologia de determinação granulométrica de lodo seja detalhadamente exposta, com número significativo de grânulos analisados, de forma relativamente rápida e simples.

O protocolo de determinação de grânulos biológicos aqui proposto (ALVES et al., 2018) baseou-se na metodologia utilizada anteriormente por Del Nery et al. (2008). O software indicado para analisar a dimensão de grânulos anaeróbios é o Image Pro-Plus 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Esta ferramenta é capaz de verificar diâmetro e área, entre outras funções de análise de imagem.

Para demonstrar a precisão e a confiabilidade da medida granulométrica, um teste de aferição do software utilizando-se esferas metálicas calibradas de tamanhos variados (simulando os grânulos biológicos) foi realizado por Alves et al. (2018), tendo sido observada uma alta correlação ($R^2 > 0,999$) entre as medidas de diâmetros obtidas e esperadas, comprovando assim a validade da técnica aqui apresentada.

30.2. MATERIAL

- Software Image Pro-Plus 6.0*
- Software para aquisição e análise de dados (Microsoft Excel® ou similar)
- *Scanner* para digitalização de imagem
- Régua
- Béquer de 1.000 mL
- Provetas graduadas de 10 e 100 mL
- Placas de Petri
- Pipeta de Pasteur de plástico

**Observação: Qualquer software de processamento de imagem com características e funções similares pode ser utilizado.*

30.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE GRÂNULOS

É importante que a amostra a ser analisada seja representativa. Por exemplo, se o objetivo for avaliar a manta de lodo de um reator UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), diversas amostras de mesmo volume devem ser retiradas de vários pontos do perfil reacional do reator e homogeneizadas para que, de fato, a amostra represente os grânulos de toda a manta de lodo. A coleta deve ser realizada do ponto mais alto para o mais baixo do perfil vertical do reator devido à acomodação dos grânulos no sistema (fator importante em reatores menores, em escalas de bancada ou piloto). Em reatores de escala piloto ou real, que contam com maior volume de lodo granular, pode-se coletar uma amostra composta de 1 litro no total, coletando-se de 100 a 200 mL em cada ponto ao longo do perfil reacional, a depender da quantidade disponível de pontos de amostragem. O volume de amostra para a análise de granulometria é retirado, então, da amostra composta.

Se o objetivo for analisar os grânulos da manta de lodo em diferentes pontos do reator, então a coleta deve ser pontual (Por exemplo: base, meio e ponto mais alto da manta de lodo do reator).

30.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA

Misturar 10 mL da amostra de lodo granular em aproximadamente 1 litro de água em béquer graduado. Após a mistura, é necessário esperar a sedimentação dos grânulos (1 a 2 min) para descarte do sobrenadante (entre 700 e 800 mL). Repete-se este processo por mais duas vezes, completando-se novamente o volume do béquer com água e descartando-se o sobrenadante. Durante a presente etapa de lavagem, grânulos muito finos ($\varnothing < 0,4$ mm) e sem propriedade de sedimentação são descartados.

30.5. ENSAIO DE DETERMINAÇÃO GRANULOMÉTRICA

O ensaio de determinação granulométrica ocorre em duas etapas: captura e análise de imagem. Na primeira, a amostra de água contendo os grânulos que sedimentaram durante a etapa de lavagem é distribuída em placas de Petri, com atenção em manter os grânulos separados uns dos outros. Para isso, posicionar as placas de Petri no *scanner* e verter em cada placa uma porção da amostra contendo os grânulos lavados. Lembrar-se de homogeneizar a amostra antes de transferir cada alíquota para as placas de Petri.

Em seguida, é de suma importância que a separação espacial dos grânulos seja feita de forma criteriosa, uma vez que o programa interpretará dois ou mais objetos escuros aglomerados como sendo um único objeto. Além disso, deve-se evitar também que os grânulos se acomodem muito próximo da borda da

placa de Petri, o que dificultará o reconhecimento deles pelo software. Os grânulos que estiverem próximos da borda deverão ser trazidos mais para dentro do contorno circular da placa. Veja um exemplo da disposição espacial dos grânulos na Figura 21.

O manuseio dos grânulos deve ser realizado com cuidado, evitando danos que modifiquem a estrutura dos grânulos. Assim, para a separação espacial dos mesmos é necessário utilizar alguma ferramenta que não danifique a amostra. No presente manual propõe-se a utilização de uma pipeta de Pasteur de plástico.

Após o arranjo dos grânulos nas placas de Petri, a imagem é obtida pelo *scanner* e salva. Cada imagem pode conter até 6 placas de Petri (quantidade máxima que os *scanners* convencionais comportam) reduzindo, assim, o tempo de análise. Repetir o procedimento até que toda a amostra aquosa contendo os grânulos lavados tenha sido analisada.

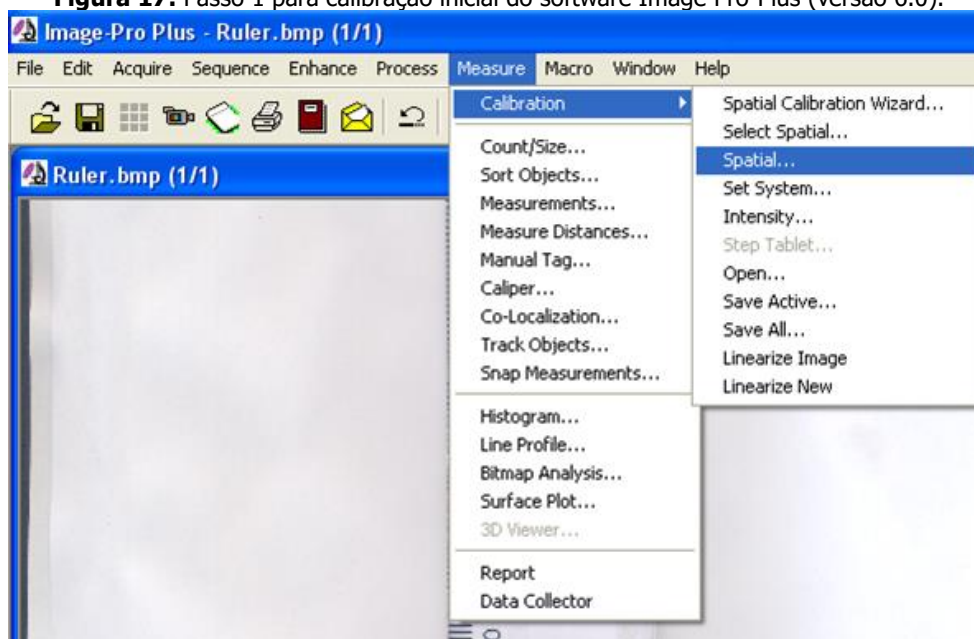
Na etapa de análise de imagem deve-se fazer uma calibração inicial do software (conforme descrito a seguir, no item 30.5.1). Na sequência, efetua-se a análise das imagens capturadas, conforme descrito mais a frente, no item 30.5.2.

30.5.1. CALIBRAÇÃO INICIAL DO SOFTWARE ANALISADOR DE IMAGEM

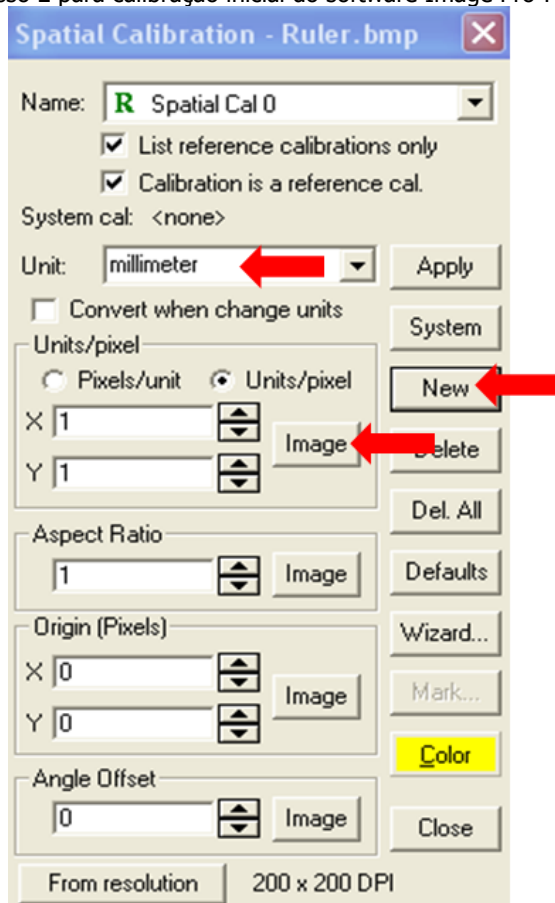
Para calibração inicial do software, seguem-se os passos elencados a seguir:

- (a) Faz-se captura da imagem de uma régua utilizando o *scanner*. **É importante checar se o *scanner* não causa distorção da imagem!**
- (b) abre-se, por meio do software Image Pro-Plus (versão 6.0), a imagem capturada da régua;
- (c) selecionam-se as opções "Measure" > "Calibration" > "Spatial" (**Figura 17**);
- (d) selecionam-se as opções "New" > Altera-se a unidade para milímetro > "Image" (**Figura 18**);
- (e) delimita-se o comprimento e informa-se ao software o valor em milímetros do comprimento delimitado (**Figura 19**). Aqui foram selecionados 10 mm de comprimento;
- (f) dá-se o nome desejado para a calibração realizada ou mantém-se a opção do software (Spatial Cal 0) > "Apply" (**Figura 20**);

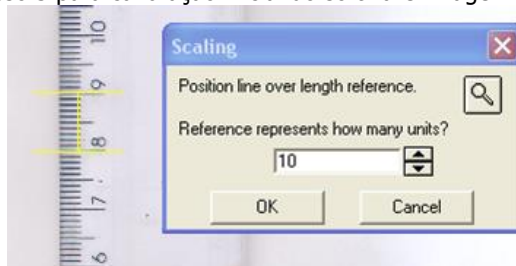
Figura 17: Passo 1 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0).



Fonte: Os autores.

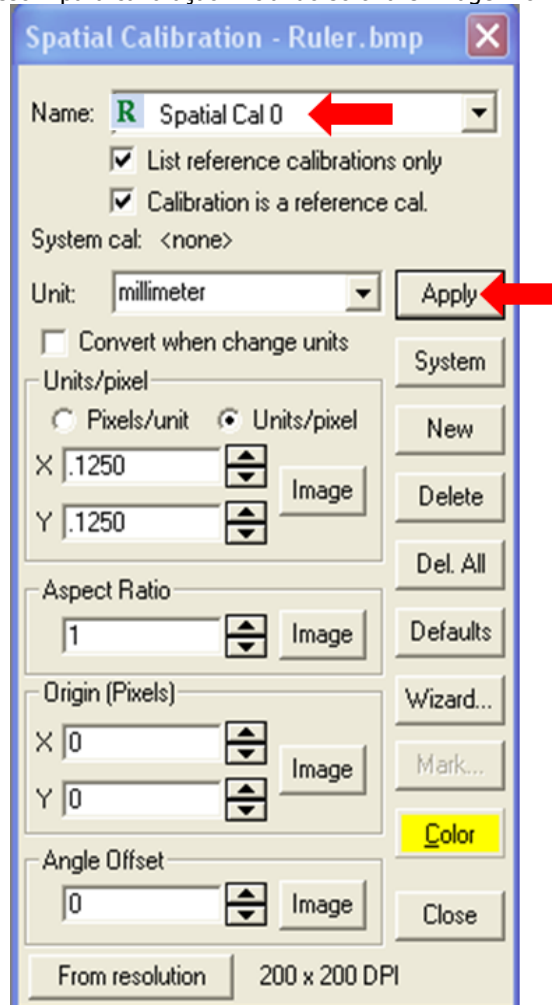
Figura 18: Passo 2 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0).

Fonte: Os autores.

Figura 19: Passo 3 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0).

Fonte: Os autores.

Figura 20: Passo 4 para calibração inicial do software Image Pro-Plus (versão 6.0).



Fonte: Os autores.

30.5.2. PROCEDIMENTO PARA MEDIÇÃO DO TAMANHO DOS GRÂNULOS

- (a) Abre-se, por meio do software Image Pro-Plus (versão 6.0), a primeira imagem capturada que se quer analisar;
- (b) selecionam-se as opções "Measure" > "Calibration" > "Select Spatial" > Seleciona-se a opção de calibração feita antecipadamente "Spatial Cal 0" (esta seleção deve ser realizada sempre que uma nova imagem for aberta para análise) > "Apply" (**Figura 21**);
- (c) seleciona-se a opção de delimitação "Ellipse" > Delimita-se a placa de Petri contida na imagem (cuidadosamente para não selecionar a borda da placa) (**Figura 22** e **Figura 23**);
- (d) selecionam-se as opções "Measure" > "Count/Size" (**Figura 24**);
- (e) selecionam-se as opções "Measurements" > "Select Measurements" (**Figura 25**);
- (f) seleciona-se a função "Diameter Mean" (e/ou outra função de interesse) > "Ok" (**Figura 26**);
- (g) seleciona-se "Count" (verificar se os objetos escuros de interesse, os grânulos, foram delimitados em vermelho pelo software) (**Figura 27**);
- (h) selecionam-se as opções "File" > "Clipboard" (**Figura 28**);
- (i) transferem-se os valores copiados para uma página do Excel (ou programa equivalente) para posterior análise estatística dos dados;

- (j) repete-se o procedimento para cada placa de Petri da imagem (a circunferência obtida pela função de delimitação "Elipse" pode ser arrastada com o mouse);
- (k) repete-se o procedimento para as demais imagens (como já dito, é necessário selecionar a calibração inicial "Spatial Cal 0", feita antecipadamente, sempre que abrir uma nova imagem).

ATENÇÃO: Não esquecer de selecionar a calibração sempre que uma nova imagem for analisada. Caso contrário, as informações obtidas estarão erradas!

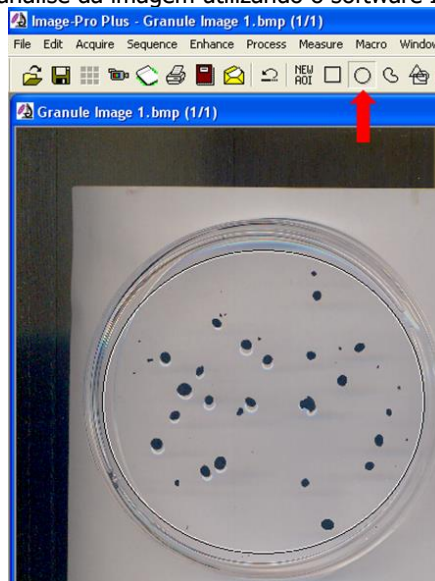
Figura 21: Passo 1 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



Fonte: Os autores.

Observação: Na Figura acima, note como os grânulos foram dispostos separadamente e longe das bordas, de forma a se evitarem erros no reconhecimento individual e na medida do tamanho de cada grânulo.

Figura 22: Passo 2 para análise da imagem utilizando o software ImagePro-Plus (versão 6.0).



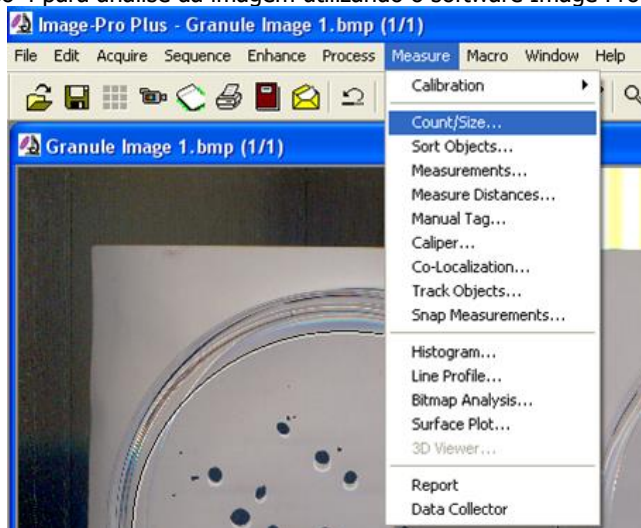
Fonte: Os autores.

Figura 23: Passo 3 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



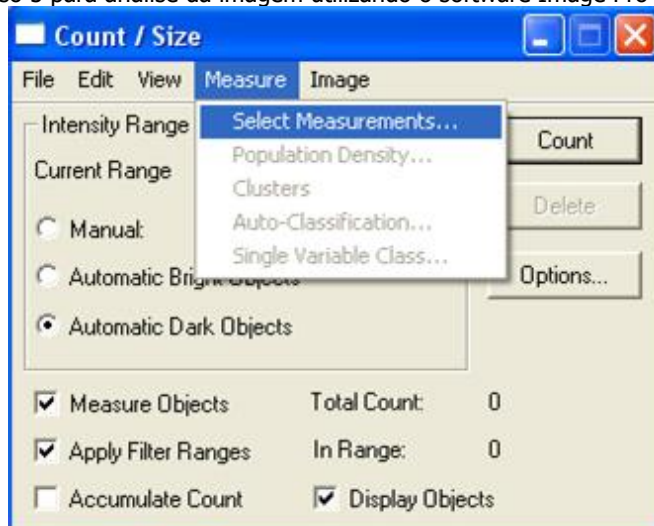
Fonte: Os autores.

Figura 24: Passo 4 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



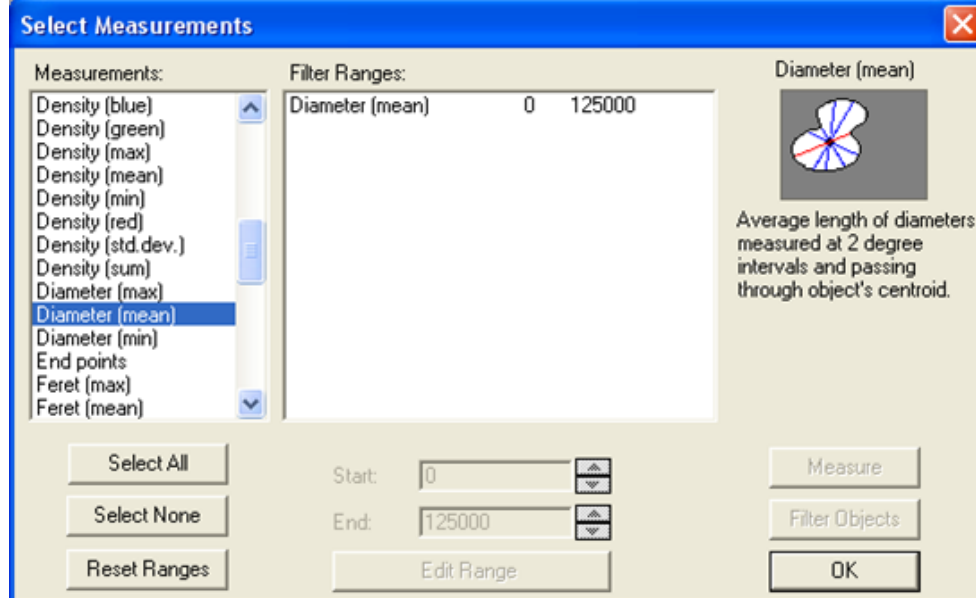
Fonte: Os autores.

Figura 25: Passo 5 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



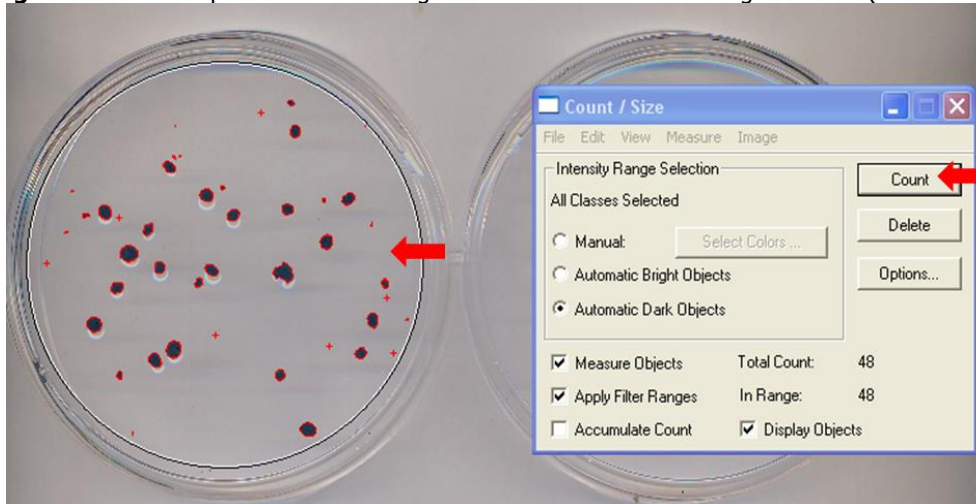
Fonte: Os autores.

Figura 26: Passo 6 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



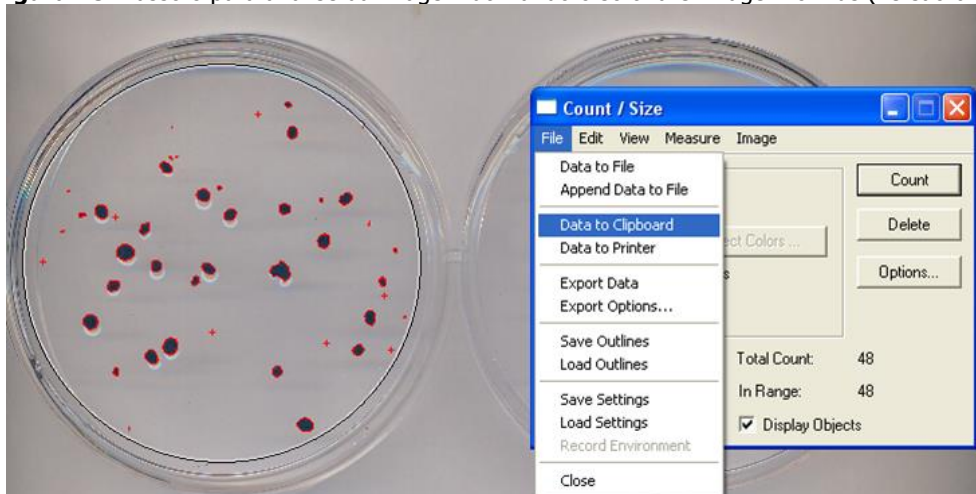
Fonte: Os autores.

Figura 27: Passo 7 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



Fonte: Os autores.

Figura 28: Passo 8 para análise da imagem utilizando o software Image Pro-Plus (versão 6.0).



Fonte: Os autores.

31. CLOROFILA – MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO

(ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005)

31.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A clorofila (*a*, *b*, *c*, e *d*) consiste de um dos principais grupos de pigmentos responsáveis pela fotossíntese em organismos fototróficos pluri- e unicelulares. Todas as plantas verdes, algas e cianobactérias apresentam clorofila do tipo *a* em suas células, a qual pode representar de 1 a 2% da massa seca das algas planctônicas. Clorofilas dos tipos *b*, *c* e *d*, por outro lado, são encontradas em organismos mais específicos, sendo a última observada apenas em rodófitas marinhas (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014). Assim, a presença ou ausência de alguns tipos de clorofila é utilizada para classificar as algas conhecidas em diferentes grupos.

A determinação de clorofila *a* em corpos d'água, por sua vez, é frequentemente utilizada como parâmetro indicador do crescimento de biomassa fitoplanctônica, o que pode estar relacionado com a proliferação excessiva de microalgas devido ao aumento na concentração de nutrientes (fósforo e nitrogênio) resultante da poluição, fenômeno esse chamado de eutrofização (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014).

A medida do teor de clorofila constitui, então, uma importante ferramenta no monitoramento das condições tróficas de um ecossistema aquático, assim como permite o acompanhamento do crescimento de microrganismos fotossintéticos em culturas especialmente dedicadas a esse objetivo.

Entre os métodos espectrofotométricos mais utilizados para a quantificação de clorofila, encontra-se o método tricromático (RICHARDS; THOMPSON, 1952; CREITZ; RICHARDS, 1955), o qual se baseia na leitura da amostra em três comprimentos de onda, empregados na estimativa dos teores de clorofila dos tipos *a*, *b* e *c*. Uma vez que a clorofila *a* é o pigmento predominante em microrganismos vegetais e fitoplanctônicos, o método monocromático, consistindo da leitura da amostra em um único comprimento de onda, também é frequentemente utilizado.

Por outro lado, as moléculas de clorofila são altamente instáveis, podendo sofrer rápida degradação devido às alterações nas condições ambientais (mudanças de temperatura, pH, luminosidade excessiva, etc.), originando substâncias conhecidas por feopigmentos. A feofitina *a*, por exemplo, é um pigmento resultante da perda do átomo de magnésio por parte da clorofila *a*, podendo causar interferências na medida espectrofotométrica da clorofila, por apresentar absorção de luz em comprimento de onda próximo que essa última (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2005). Partindo dessa observação, Lorenzen (1967) propôs um método eficiente para a estimativa da clorofila *a* e da feofitina *a*, por meio da leitura espectrofotométrica da amostra antes e após a acidificação da mesma. Dessa forma, o resultado da análise de clorofila *a* pode ser corrigido descontando-se a concentração de feofitina *a* da amostra.

31.2. MATERIAL

- [Aparato de filtração a vácuo](#) com membrana filtrante de 1,2 µm de poro
- Membrana filtrante de [microfibra de vidro](#) com abertura de poro na faixa de 0,45 – 1,0 µm
- Agitador Vórtex
- Balança analítica (precisão ± 0,0001 g)
- Centrífuga refrigerada

- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro com largura de banda espectral de 0,5 a 2,0 nm
- Refrigerador (4°C)
- Freezer (-20°C ou -80°C)
- Almofariz e pistilo
- Bastão de vidro fino
- Balões volumétricos de 100 e 1.000 mL
- Provetas de vidro graduadas de 100 e 1.000 mL
- Pipetas de vidro graduadas de 2,0, 5,0 e 10,0 mL
- Micropipetas de 1.000 e 5.000 µL
- Béquer de 100 mL
- Funil de vidro pequeno
- Tubos de centrifugação tipo *falcon* de 15 mL em polipropileno
- Pinça metálica com ponta achatada
- Carbonato de Magnésio – MgCO₃ P.A.
- Acetona – CH₃(CO)CH₃ P.A.
- Ácido Clorídrico concentrado – HCl P.A.

Observação: Todos os procedimentos que envolvam a manipulação da amostra devem ser realizados **em ambiente com baixa luminosidade (penumbra)**, evitando a incidência de luz diretamente sobre a amostra, de forma a minimizar a rápida degradação da clorofila!

31.3. SOLUÇÃO SATURADA DE CARBONATO DE MAGNÉSIO (MgCO₃ 10 g/L)

Adicionar 1,0 g de MgCO₃ finamente pulverizado (macerar previamente em almofariz com pistilo) em 100 mL de água deionizada. Filtrar a vácuo através de membrana com poro de até 1,20 µm.

31.4. SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO (ACETONA 90%)

ATENÇÃO: Por se tratar de um composto altamente volátil, inflamável e explosivo, a acetona deve ser manuseada com cuidado, mantida longe de fontes de calor e chamas de fogo. Evitar inalação!

Transferir 100 mL da solução saturada de carbonato de magnésio para balão volumétrico de 1.000 mL e completar com acetona. Armazenar o frasco devidamente tampado, para evitar a evaporação do solvente.

Observação: Caso necessário a solução de extração pode ser substituída por etanol anidro.

31.5. SOLUÇÃO DE ACIDIFICAÇÃO (HCL 0,1 N)

Com auxílio de pipeta de vidro graduada, transferir 8,4 mL de ácido clorídrico concentrado (HCl) para béquer de vidro de 100 mL contendo cerca de 80 mL de água deionizada (**Cuidado:** Manusear o ácido na capela, usando luvas nitrílicas e óculos de segurança!). Aguardar a solução esfriar e transferir para balão volumétrico de 1.000 mL, completando com água deionizada.

31.6. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

Homogeneizar cuidadosamente a amostra e filtrar a vácuo o mais rapidamente possível, logo após a coleta, em membrana de microfibras de vidro com abertura de poro de 0,45 a 1,0 μm . Filtrar o maior volume possível (entre 0,2 e 5 litros) até a saturação da membrana e aferir o volume filtrado em proveta de vidro graduada (O tempo de filtração não deve exceder 10 min). O volume filtrado é função da concentração de clorofila na amostra. Para amostras muito concentradas, volumes menores podem ser satisfatórios.

Caso a filtração deva ser adiada, armazenar a amostra em recipiente opaco ou âmbar, a 4°C ou em caixa térmica com gelo, ao abrigo da luz, por até 24 h.

Com auxílio de pinça metálica, dobrar a membrana filtrante ao meio (de modo que o material filtrado fique protegido, voltado para dentro) e transferir para tubo *falcon* de 15 mL, previamente revestido de papel alumínio (ou papel pardo). Utilizar tubos resistentes à acetona (polipropileno).

Caso seja necessário interromper o procedimento nesse passo, tampar e armazenar o tubo em freezer, a -20°C por até 30 dias, ou a -80°C por mais tempo. Antes de efetuar a extração, retirar os tubos do freezer e aguardar o descongelamento dos filtros por cerca de 12 h, no escuro. Amostras com pH ácido estão sujeitas à rápida degradação da clorofila, devendo ser analisadas o quanto antes.

Com auxílio de pipeta de vidro, adicionar 4,0 mL da solução de acetona 90% ao tubo e macerar bem o filtro com auxílio de bastão de vidro, rompendo as células, até transformar o filtro em uma pasta. Em um béquer pequeno, lavar totalmente a ponta do bastão com 4,0 mL da solução de acetona e recolher no tubo. Por fim, repassar o béquer com 2,0 mL da solução de acetona e transferir para o tubo (volume final de 10 mL). Tampar bem e agitar em vórtex para ressuspender o material (usar velocidade moderada para evitar respingos). Acondicionar o tubo em refrigerador (4°C), no escuro, e deixar em repouso de 2 a 24 h.

Em seguida, centrifugar o extrato por 10 min a 6.000 rpm em temperatura de 4°C. Retirar os tubos da centrífuga, tomando cuidado para não ressuspender o material sedimentado. Submeter esse extrato a um dos procedimentos espectrofotométricos descritos nos itens a seguir.

Caso o extrato apresente turbidez excessiva, filtrar o sobrenadante através de filtro de seringa resistente a solvente (por exemplo, PVDF) com abertura de poro de até 1,0 μm .

31.7. DETERMINAÇÃO DA CLOROFILA A NA PRESENÇA DE FEOFITINA A (MÉTODO MONOCROMÁTICO)

- (a) Com pipeta de vidro graduada, transferir 3 mL do extrato obtido para cubeta de vidro com passo ótico de 1,0 cm;
- (b) zerar o espectrofotômetro em 750 e 664 nm com 3 mL da solução de acetona 90%;
- (c) efetuar a leitura da amostra nos dois comprimentos de onda;
- (d) subtrair a densidade ótica (absorbância) obtida em 750 nm (OD_{750}) da leitura obtida em 664 nm (OD_{664}) para descontar a interferência da turbidez;
- (e) acidificar o extrato dosando 0,1 mL da solução de acidificação (HCl 0,1 N) diretamente na cubeta. Tratar o branco da mesma forma;
- (f) agitar suavemente para homogeneizar e aguardar 1,5 min (não demorar mais que 2 min);
- (g) decorrido esse tempo, zerar o espectrofotômetro com o branco acidificado nos comprimentos de onda de 750 e 665 nm e efetuar nova leitura do extrato;
- (h) subtrair a densidade ótica obtida em 750 nm (OD_{750}) da leitura obtida em 665 nm (OD_{665}) para descontar a interferência relativa à turbidez;

- (i) aplicar as equações a seguir para calcular as concentrações de clorofila *a* e feofitina *a* na amostra (em mg/m³ = µg/L):

$$\text{Clorofilaa (mg/m}^3) = \frac{26,7 \times (664a - 665f) \times V_1}{V_2 \times L} \quad \text{Equação 102}$$

$$\text{Feofitinaa (mg/m}^3) = \frac{26,7 \times [(1,7 \times 665f) - 664a] \times V_1}{V_2 \times L} \quad \text{Equação 103}$$

No qual:

664a = Diferença entre as densidades óticas antes da acidificação (OD₆₆₄ – OD₇₅₀), referente à clorofila *a*;

665f = Diferença entre as densidades ótica após a acidificação (OD₆₆₅ – OD₇₅₀), referente à feofitina *a*;

V₁ = volume de extração (solução de acetona utilizada) em litros (no caso, 10 mL = 0,01 L);

V₂ = volume original da amostra filtrada (em m³);

L = caminho ótico da cubeta utilizada (cm).

Observações:

1) Quando uma solução de clorofila *a* pura é convertida totalmente em feofitina por acidificação, tem-se uma razão entre as densidades óticas antes e após a acidificação (664a / 665f) de 1,70. Ou seja, amostras com essa razão não contêm feofitina *a*, apresentando-se em excelentes condições fisiológicas. Soluções de feofitina pura não apresentam redução na densidade ótica de 665 nm após acidificação (razão 664a/ 665f = 1,0). Assim, misturas de clorofila *a* e feofitina *a* têm razões dos picos de absorção variando entre 1,0 e 1,7.

2) A densidade ótica em 664 nm antes da acidificação (OD₆₆₄) deve variar entre 0,1 e 1,0. Para extratos muito diluídos, pode-se utilizar cubetas com passo ótico maior. Nesse caso, aumentar o volume de ácido proporcionalmente ao volume do extrato na cubeta e substituir o valor de L (cm) nas equações acima apresentadas. Para amostras muito concentradas, aumentar o volume da solução de acetona utilizado na etapa de extração ou diluir convenientemente o extrato em solução de acetona antes da leitura e calcular o fator de diluição para corrigir o resultado.

31.8. DETERMINAÇÃO DE CLOROFILA A, B, E C (MÉTODO TRICROMÁTICO)

- (a) Com pipeta de vidro graduada, transferir 3 mL do extrato obtido para cubeta de vidro com passo ótico de 1,0 cm;
- (b) zerar o espectrofotômetro em 750, 664, 647 e 630 nm com 3 mL da solução de acetona 90%;
- (c) efetuar a leitura da amostra nos quatro comprimentos de onda;
- (d) subtrair a densidade ótica (absorbância) obtida em 750 nm (OD₇₅₀) da leitura obtida em cada um dos outros comprimentos de onda (OD₆₆₄, OD₆₄₇ e OD₆₃₀) para descontar a interferência relativa à turbidez;
- (e) aplicar as equações a seguir para calcular as concentrações de clorofila *a*, *b* e *c* na amostra em questão (em mg/m³ = µg/L):

$$Ca \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[11,85 \times (664a) - 1,54 \times (647b) - 0,08 \times (630c)]}{V_2 \times L} \times V_1$$

Equação
104

$$Cb \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[21,03 \times (647b) - 5,43 \times (664a) - 2,66 \times (630c)]}{V_2 \times L} \times V_1$$

Equação
105

$$Cc \text{ (mg/m}^3\text{)} = \frac{[24,52 \times (630c) - 7,60 \times (647b) - 1,67 \times (664a)]}{V_2 \times L} \times V_1$$

Equação
106

No qual:

Ca, Cb e Cc = concentrações de clorofila *a*, *b* ou *c*, respectivamente (mg/m³ = µg/L);

664a = densidade ótica corrigida referente à clorofila *a* (OD₆₆₄ – OD₇₅₀);

647b = densidade ótica corrigida referente à clorofila *b* (OD₆₄₇ – OD₇₅₀);

630c = densidade ótica corrigida referente à clorofila *c* (OD₆₃₀ – OD₇₅₀);

V₁ = volume de extração (solução de acetona utilizada) em litros (no caso, 10 mL = 0,01 L);

V₂ = volume original da amostra filtrada (em m³);

L = caminho ótico da cubeta utilizada (cm).

31.9. PREPARO DE SOLUÇÕES PADRÕES DE CLOROFILA (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2014)

O método espectrofotométrico para clorofila não exige o levantamento de curva de calibração (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1997). No entanto, quando determinações mais acuradas são necessárias, um padrão de clorofila comercialmente disponível pode ser utilizado para verificar a qualidade da medida do espectrofotômetro (padrão de verificação), ou ainda quando houver a necessidade de efetuar a calibração de outros equipamentos (fluorímetros ou cromatógrafos).

Nesse caso, uma ampola contendo 1 mg de clorofila *a* de espinafre, por exemplo, pode ser adquirida para o preparo de 100 mL de uma solução padrão (solução estoque) contendo 10 mg/L (10.000 mg/m³) de clorofila *a*, conforme o procedimento descrito a seguir (lembrar de trabalhar sempre em ambiente com baixa luminosidade para evitar a deterioração do padrão):

- (a) Quebrar a ampola e lavar sucessivas vezes a ampola com a solução de acetona 90% (lavar também a ponta da ampola), recolhendo cuidadosamente todo o conteúdo em balão volumétrico de 100 mL, com auxílio de funil de vidro, até não se notarem mais traços de coloração na ampola;
- (b) aferir o volume do balão com a solução de acetona 90% e homogeneizar;
- (c) em seguida, separar diversas alíquotas da solução padrão em frascos de vidro âmbar com tampa (*vials* de 4 mL). Armazenar os frascos em freezer a -80°C, ao abrigo da luz. O armazenamento nessa temperatura garante a estabilidade do padrão por tempo indeterminado. Já a -20°C o padrão pode ser armazenado por cerca de 6 meses;
- (d) o espectrofotômetro pode ser verificado sempre que necessário utilizando-se essa solução padrão, cuja concentração de clorofila *a* é conhecida. Para isso, colocar a solução na cubeta e realizar a leitura conforme o procedimento descrito para as amostras (item 35.7), antes e após a acidificação, zerando com a solução de acetona 90%;

- (e) determinar a concentração observada de clorofila *a* na solução padrão e comparar com o valor esperado, calculando a recuperação obtida (em %), de forma a evidenciar a qualidade da medida do equipamento;
- (f) algumas diluições da solução estoque também podem ser preparadas em acetona 90%, com concentrações variando de 0,1 a 10 mg/L de clorofila *a* (isto é, de 100 a 10.000 mg/m³ = µg/L), e lidas no espectrofotômetro.

32.ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE – MÉTODO DO PAPEL DE FILTRO

(GHOSE, 1987; WOOD; BHAT, 1988; ADNEY; BAKER, 1996)

32.1. CONCEITOS FUNDAMENTAIS

A hidrólise de materiais lignocelulósicos até monossacarídeos, como a glicose, é realizada através de enzimas celulasas que atuam, principalmente, extracelularmente.

A atividade enzimática da celulase é determinada pela quantidade de açúcar reduzido formada a partir da hidrólise de papel de filtro, conforme análise referenciada pela IUPAC (GHOSE, 1987). Por meio deste método podem-se comparar pesquisas que utilizaram inóculos diferentes e também utilizar uma mesma carga enzimática para hidrólise de diferentes substratos celulósicos.

A atividade celulolítica total (FPAse) pode ser determinada como atividade de papel de filtro (*Filter Paper Unit*) por volume de caldo enzimático original, o que se expressa em FPU/mL, sendo que a atividade de 1 FPU corresponde a 1 μmol de glicose liberado em 60 min de reação (GHOSE, 1987).

Em termos práticos, uma vez que a liberação de açúcares redutores não é necessariamente uma função linear da concentração de enzimas do meio (GHOSE, 1987), o presente método consiste em medir a atividade enzimática de duas ou mais diluições da solução enzimática original, interpolando então o resultado para se determinar, com razoável confiabilidade, a atividade da solução.

32.2. MATERIAL

- Balança analítica (precisão $\pm 0,0001$ g)
- Banho termostático (50°C e 100°C)
- Cronômetro digital
- Espectrofotômetro
- Medidor de pH de bancada (pHmetro)
- Balão volumétrico de 1.000 mL
- Micropipeta de 1.000 μL
- Proveta de vidro graduada de 50 mL
- Espátula ou colher dosadora
- Pinça metálica pequena
- Tubos de DQO padrão HACH®
- Papel filtro de celulose Whatman n° 1
- Ácido Cítrico monohidratado – $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ P.A.
- Hidróxido de Sódio – NaOH P.A.
- Reagente DNS (preparo conforme item 3.2.3)

32.3. PREPARO DA SOLUÇÃO TAMPÃO CITRATO 0,05 M

Dissolver 10,5 g de ácido cítrico monohidratado ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 37,5 mL de água deionizada.

Posteriormente, com auxílio de espátula ou colher dosadora, adicionar hidróxido de sódio (NaOH) à solução até pH 4,3 (aproximadamente 2,5 g). Completar o volume para 50 mL em proveta graduada e medir novamente o pH. Se necessário, adicionar mais hidróxido de sódio à solução até pH final de 4,5. A solução preparada até aqui consiste de uma solução tampão citrato de 1 mol/L.

Para obter a solução tampão de interesse (concentração de 0,05 M) transferir a solução para um balão volumétrico de 1.000 mL, completando em seguida o volume com água deionizada. O pH final da solução deverá ser da ordem de 4,8.

32.4. PROCEDIMENTO

Para a determinação da atividade enzimática, realizar diluições da solução enzimática em tampão citrato 0,05 mmol/L (pH ~ 4,8).

Observação: Preparar ao menos duas diluições do extrato enzimático sendo, de preferência, uma diluição capaz de liberar pouco mais de 2,0 mg de glicose (em massa) e outra um pouco menos de 2,0 mg de glicose.

Em tubos de DQO adicionar 1,0 mL da solução tampão citrato seguidos de 50,0 mg do papel filtro Whatman nº 1 enrolado, com auxílio de pinça metálica, tomando cuidado para que este fique totalmente imerso na solução tampão. Colocar os tubos tampados em banho termostático a 50°C e aguardar atingirem o equilíbrio da temperatura (cerca de 10 min). Após esse tempo, adicionar 0,50 mL de cada uma das diluições dos extratos enzimáticos aos tubos e incubar por mais 60 min.

Ao final deste período, interromper a reação enzimática adicionando 3,0 mL do reagente DNS (Miller, 1959), preparado conforme descrito no item 3.2.3. Manter os tubos em banho de água em ebulição por 5 min e transferir, em seguida, para um banho de gelo para interromper a reação. Na sequência, homogeneizar manualmente as amostras por sucessivas inversões dos tubos. Aguardar a polpa de papel restante assentar (até cerca de 20 min) e medir a absorbância da solução em espectrofotômetro a 540 nm. Caso seja necessário, centrifugar brevemente a mistura para melhor separação do resíduo do papel antes da leitura.

Durante as reações, parte da concentração da glicose quantificada pode ser oriunda da própria enzima e/ou do substrato, uma vez que o complexo enzimático pode conter açúcares nutrientes, assim como as extremidades da celulase podem, às vezes, serem quantificadas como glicose antes do ataque da enzima ser efetuado. Por esta razão, preparar tubos de controle, consistindo: (a) no extrato enzimático sem substrato e (b) no substrato sem o extrato enzimático. Subtrair os valores das absorbâncias obtidas para os tubos controles das absorbâncias encontradas para os tubos reacionais contendo a amostra (enzimas) + o substrato (filtro de papel).

Assim, para a correta quantificação da glicose através do método DNS três categorias de tubos reacionais serão preparados:

- I) Tubos contendo as amostras a serem analisadas (enzimas + papel filtro);
- II) Tubos do branco reacional, para zerar o espectrofotômetro; e
- III) Tubos controle da enzima (a) e do substrato (b).

Para o preparo do branco reacional (II), adiciona-se 1,5 mL de tampão citrato ao tubo reacional e após os 60 min de reação aplica-se o método DNS como descrito anteriormente.

Para o preparo dos tubos controle da enzima (III-a) adiciona-se 1,0 mL do tampão citrato e 0,5 mL de cada diluição da enzima. O tubo controle do substrato (III-b) é preparado por meio da adição de 1,5 mL do tampão citrato e 50 mg de papel filtro enrolado. Após o aquecimento e ao final do período de reação (60 min), ambos os controles também são analisados por meio do método DNS.

O espectrofotômetro deve ser zerado com o branco (II) e a leitura da absorbância das amostras e dos controles é efetuada em 540 nm. Por fim, descontar as absorbâncias dos controles (III-a e III-b) da absorbância obtida para a amostra. Esse valor final é a absorbância corrigida da amostra (ABS_{FINAL}).

32.5. LEVANTAMENTO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

A construção da curva de calibração para determinação de açúcares redutores liberados pela celulase através do método do DNS é realizada partindo-se de uma solução estoque de glicose 10,0 mg/mL preparada em tampão citrato (0,05 mol/L) e realizando diluições em tampão citrato para obtenção de padrões de glicose na faixa de 0 a 10,0 mg/mL, o que equivale a uma massa absoluta de glicose variando de 0 a 5,0 mg em 0,5 mL de amostra.

As reações com DNS são realizadas adicionando-se, em cada tubo de ensaio, 1,0 mL de tampão citrato seguidos de 0,5 mL de cada um dos padrões de glicose diluídos previamente em tampão citrato.

Na sequência, 3,0 mL do reagente DNS são adicionados e os tubos são mantidos por 5 min em banho de água em ebulição. Transferir posteriormente para um banho de gelo para interromper a reação (~ 5 min).

Por fim, o espectrofotômetro é zerado com o teste em branco (tampão citrato sem glicose) e a leitura dos padrões é efetuada em 540 nm. Plotar a curva da absorbância versus massa absoluta de glicose em 0,5 mL de amostra (mg/0,5 mL).

32.6. CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CELULASE

De posse das leituras das absorbâncias (ABS_{FINAL}) obtidas após a hidrólise enzimática do papel filtro e utilizando a equação obtida através da curva padrão determina-se a massa de açúcares redutores totais (ART) liberados pelo extrato enzimático em cada uma das diluições ensaiadas.

Na sequência é traçada uma reta relacionando a concentração da enzima em cada uma das diluições testadas [enzima diluída] em função da massa de glicose liberada pelos 0,50 mL do extrato enzimático diluído.

Levar em conta que, para a celulase, uma unidade da atividade de enzima (FPU) é baseada na liberação de exatos 2,0 mg de glicose equivalente, isto é, 2,0/0,18016 μmol de glicose a partir de 50 mg de papel de filtro por 0,50 mL de enzima diluída em 60 min de reação (sendo a massa molar da glicose igual a 0,18016 mg/ μmol). Assim, interpolar os dados obtidos para determinar a diluição necessária que resulta na liberação de 2 mg de glicose e determinar a atividade enzimática (FPU por mL de solução enzimática original) pela aplicação da equação abaixo:

$$\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} = \frac{2,0}{0,18016 \times 0,50 \times 60 \times [\text{enzima diluída}]} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{Equação 107}$$

$$\frac{\text{FPU}}{\text{mL}} = \frac{0,37}{[\text{enzima diluída}]} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1} \quad \text{Equação 108}$$

No qual o termo **[enzima diluída]** refere-se à proporção adimensional da solução enzimática original presente em cada diluição enzimática (ou seja, o número de mL da solução original presente em cada mL da diluição testada).

33. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21st ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 2005.

ASTM INTERNATIONAL. **ASTM D516-02**: standard test method for sulfate ion in water. West Conshohocken: ASTM International, 2002.

ADNEY, B.; BAKER, J. **Measurement of cellulase activities**. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 1996. Technical Report NREL/TP-42628.

AGRAWAL, L. K.; HARADA, H.; OKUI, H. Treatment of dilute wastewater in a UASB reactor at a moderate temperature: performance aspects. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 179-184, 1997.

ALVES, I.; DEL NERY, V.; POZZI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; PIRES, E. C. Determining the distribution of granule diameter from biological sludge. **MethodsX**, Amsterdam, v. 5, p. 727–736, 2018.

AMEEL, J. J.; AXLER, R. P.; OWEN, C. J. Persulfate digestion for determination of total nitrogen and phosphorus in low nutrient waters. **American Environmental Laboratory**, Shelton, v. 10, 1993.

ANDERSON, G. K.; YANG, G. Determination of bicarbonate and total volatile acid concentration in anaerobic digestors using a simple titration. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 64, n. 1, p. 53–59, 1992.

ANWAR, M. A.; IQBAL, M.; QAMAR, M. A.; REHMAN, M.; KHALID, A. M. Technical communication: determination of cuprous ions in bacterial leachates and for environmental monitoring. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 16, p. 135-138, 2000.

AQUINO, S. F.; CHERNICHARO, C. A. L.; FORESTI, E.; SANTOS, M. L. F.; MONTEGGIA, L. O. Metodologias para determinação da atividade metanogênica específica (AME) em lodos anaeróbios, **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 192–201, 2007.

AQUINO, S. F.; SILVA, S. Q.; CHERNICHARO, C. A. L. Considerações práticas sobre o teste de demanda química de oxigênio (DQO) aplicado à análise de efluentes anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 4, p. 295–304, 2006.

BACHA, C. B. **Determinação do teor de lignina em amostras de gramíneas ao longo do crescimento através de três métodos analíticos e implicações com as equações de Cornell Net Carbohydrate and Protein System**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BERK, S. G.; GUNDERSON, J. H. **Wastewater organisms: a color atlas**. Boca Raton: CRC Press, 1993.

BHADURI, S.; DEMCHICK, P. H. Simple and rapid method for disruption of bacteria for protein studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 941-943, 1983.

BARKER, S. B.; SUMMERSON, W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 138, n. 46, p. 535, 1941.

BENDSCHNEIDER, K.; ROBINSON, R. J. A new spectrometric method for the determination of nitrite in sea water. **Journal of Marine Research**, New Haven, v. 11, p. 87–96, 1952.

BISSCHOPS, I.; SPANJERS, H. Literature review on textile wastewater characterization. **Environmental Technology**, London, v. 24, p. 1399–1411, 2003.

BLUNDI, C. E.; POVINELLI, J.; LALLUCE, C. Determinação de matéria orgânica em águas residuárias (2), **Revista DAE**, São Paulo, v. 159, n. 107, p. 5–13, 1990.

BLUNDI, C. E.; GADÊLHA, R. F. Metodologia para determinação de matéria orgânica específica em águas residuárias. *In*: CHERNICHARO, C.A.L. (coord.). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos**. Belo Horizonte: PROSAB, 2001. p. 9–17.

- BUCHANAN, I. D.; NICELL, J. A. Model development for horseradish peroxidase catalyzed removal of aqueous phenol. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 54, n. 3, p. 251–261, 1997.
- BUCHAUER, K. A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in effluents to wastewater and sludge treatment processes. **Water SA**, Pretoria, v. 1, n. 24, p. 49–56, 1998.
- BULLOCK, C. M.; BICHO, P.; ZHANG, Y.; SADDLER, J. N. A solid chemical oxygen demand (COD) method for determining biomass in wastewaters. **Water Research**, New York, v. 30, p. 1280–1284, 1996.
- CARNEIRO, R. B. **Utilização de glicerol como fonte de carbono para desnitrificação e remoção biológica de fósforo em reator submetido à aeração intermitente**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.
- CAVALCANTI, P. F. F.; VAN HAANDEL, A. Comparação entre os métodos titrimétricos Kapp e DiLallo para determinação da alcalinidade e AGV. *In*: CHERNICHARO, C. A. L. (coord.). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios**: aspectos metodológicos. Belo Horizonte: PROSAB, 2001. p. 25–34.
- CAWSE, P. A. The determination of nitrate in soil solutions by ultravioleta spectrophotometry. **Analyst**, New York, v. 92, p. 311–315, 1967.
- CHITIKELA, S.; DENTEL, S. K.; ALLEN, H. E. Modified method for the analysis of anionic surfactants as methylene blue active substances, **Analyst**, New York, v. 120, p. 2001–2004, 1995.
- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Determinação de clorofila a e feofitina a**: método espectrofotométrico. 3. ed. São Paulo: CETESB, 2014. Norma Técnica L5.306.
- CONNELY, A. Conductivity of a solution. 2017. Disponível em: <https://andyconnelly.wordpress.com/2017/07/14/conductivity-of-a-solution/>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- CONTRERAS, E. M.; BERTOLA, N. C.; GIANNUZZI, L.; ZARITZKY, N. E. A modified method to determine biomass concentration as COD in pure cultures and in activated sludge systems. **Water SA**, Pretoria, v. 28, n. 4, p. 463–468, 2002.
- COSTA, A. G.; PINHEIRO, F. G. C.; PINHEIRO, G. C.; SANTOS, A. B.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível: revisão. **Revista DAE**, São Paulo, v. 159, n. 194, p. 36–51, 2013.
- CREITZ, G. I.; RICHARDS, F. A. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis: III. A note on the use of "Millipore" membrane filters in the estimation of plankton pigments. **Journal of Marine Research**, New Haven, v. 14, n. 3, p. 211–216, 1955.
- DAMASCENO, L. H. S. **Tratamento de soro de queijo no ASBR**: influência da estratégia de alimentação. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.
- DEL NERY, V.; POZZI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z.; DOMINGUES, M. R.; ZAIAT, M. Granules characteristics in the vertical profile of a full-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor treating poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, p. 2018–2024, 2008.
- DILALLO, R.; ALBERTSON, O. R. Volatile acids by direct titration, **Journal Water Pollution Control Federation**, Washington, v. 23, n. 4, p. 356–365, 1961.
- SANTOS, A. B.; CERVANTES, F. J.; VAN LIER, J. B. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 98, p. 2369–2385, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- ELLIOTT, R. J.; PORTER, A. G. A rapid cadmium reduction method for the determination of nitrate in bacon and curing brines. **Analyst**, New York, v. 96, p. 522–527, 1971.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 420.1. Phenolics (spectrophotometric, manual 4-aap with distillation)**. Washington: Environmental Protection Agency, 1978.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 9038. Sulfate (turbidimetric)**: revision 0. Washington: Environmental Protection Agency, 1986.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 446.0. In vitro determination of chlorophylls a, b, c + c and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry**: revision 1.2. Washington: Environmental Protection Agency, 1997.

FERNANDES, A. **A medida de pH e condutividade**. [S. l.]: Gehaka, 2013. Disponível em: https://www.gehaka.com.br/downloads/apresentacao_sanepar.pdf. Acesso em: 10 nov. 2020.

FERREE, M. A.; SHANNON, R. D. Evaluation of a second derivative UV/visible spectroscopy technique for nitrate and total nitrogen analysis of wastewater sample. **Water Research**, New York, v. 35, n. 1, p. 327–332, 2001.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinates in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 73, n. 2, p. 627–650, 1927.

FREIRE, D. D. C.; SANT'ANNA JR, G. L. A proposed method modification for the determination of COD in saline water. **Environmental Technology**, London, v. 19, p. 1243–1247, 1998.

FUKUSHIMA, R.S.; HATFIELD, R.D. Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, n. 7, p. 3133–3139, 2001.

FUKUSHIMA, R. S.; HATFIELD, R. D. Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 12, p. 3713–3720, 2004.

GAGLIANO, M. C.; ISMAIL, S. B.; STAMS, A. J. M.; PLUGGE, C. M.; TEMMINK, H.; VAN LIER, J. B. Biofilm formation and granule properties in anaerobic digestion at high salinity. **Water Research**, New York, v. 121, p. 61–71, 2017.

GARCÍA-BALBOA, C.; VICENTE, M. S.; BLAZQUEZ, M. L.; GONZÁLEZ, F.; MUÑOZ, J. A.; BALLESTER, A. Iron speciation in dissimilatory Fe(III)-reducing cultures. **Geomicrobiology Journal**, Philadelphia, v. 28, p. 371–379, 2011.

GAUGUSH, R. F.; HEATH, R. T. A rapid manual method for nitrate determination in small volumes by a modification of the cadmium reduction method. **Water Research**, New York, v. 18, n. 4, p. 449–450, 1984.

GERCHACOV, S. M.; HATCHER, P. G. Improved technique for analysis of carbohydrates in the sediment. **Limnology and Oceanography**, Lawrence, v. 17, p. 938–943, 1972.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**, Research Triangle Park, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.

GODOI, L. A. G.; SANTOS, C. E. D.; FORESTI, E.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Evaluating and refining alkalinity calculations due to sulfide and bicarbonate accessed by titration in anaerobic sulfate-reducing bioreactors. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 228, n. 9, p. 1–12, 2017.

GODOI, L. A. G. **Potencial do reator anaeróbico de leito fixo-estruturado e fluxo descendente para o tratamento de drenagem ácida de minas em co-digestão com vinhaça**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

GODOI, L. A. G.; GUERRERO, R. B. S.; SANTOS, C. E. D.; FORESTI, E.; ZAIAT, M.; DAMIANOVIC, M. H. R. Z. Rapid and easy quantification of elemental sulphur in aqueous samples from biological reactors: the turbidimetric method revisited. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, Abingdon, v. 99, n. 9, p. 809–823, 2019.

GOLTERMAN, H. L. **Methods for chemical analysis of fresh waters**. 3th ed. Glasgow: Bell and Bain, 1969.

GORDON, G. E. Colorimetric determination of phenolic materials in refinery waste waters: removal of sulfides by silver nitrate. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 32, n. 10, p. 1325–1326, 1960.

GREENHILL, S. **Method for determination of free and combined glycerin in biodiesel**. Depositante: S. Greenhill. US 20040137546A1. Depósito: 22 dez. 2003.

GRIFFITHS, R. I.; WHITELEY, A. S.; O'DONNELL, A. G. Rapid method for coextration of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA and rRNA-based microbial community composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5488–5491, 2000.

GROSS, A.; BOYD, C. E. A digestion procedure for the simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in pond water. **Journal of the World Aquaculture Society**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 300–303, 1998.

GROSS, A.; BOYD, C. E.; SEO, J. Evaluation of the ultraviolet spectrophotometric method for the measurement of total nitrogen in water. **Journal of the World Aquaculture Society**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 388–393, 1999.

GROTHUIS, J. T. C.; KISSEL, J. C.; PLUGOE, C. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Role of substrate concentration in particle size distribution of methanogenic granular sludge in UASB reactors. **Water Research**, New York, v. 25, n. 1, p. 21–27, 1991.

HADŽIJA, O. A simple method for the quantitative determination of muramic acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 60, p. 512–517, 1974.

HART, M. G. R. A turbidimetric method for determining elemental sulphur. **Analyst**, New York, v. 86, p. 472–475, 1961.

HARTLEY, K.; LANT, P. Eliminating non-renewable CO₂ emissions from sewage treatment: an anaerobic migrating bed reactor pilot plant study. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 95, n. 3, p. 384–398, 2006.

HAYASHI, K. A rapid determination of sodium dodecyl sulfate with Methylene Blue. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 67, p. 503–506, 1975.

HILLER, A.; GREIF, R. L.; BECKMAN, W. W. Determination of protein in urine by the biuret method. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 176, p. 1421–1429, 1948.

JENKINS, D.; RICHARD, M. G.; DAIGGER, G. T. **Manual on the causes and control of activated sludge bulking, foaming, and other solids separation problems**. 3th ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 2003.

JENKINS, S. R.; MORGAN, J. M.; ZHANG, X., Measuring the usable carbonate alkalinity of operating anaerobic digesters, **Research Journal of the Water Pollution Control Federation**, Alexandria, v. 63, n. 1, p. 28–34, 1991.

JONES, M. N. Nitrate reduction by shaking with cadmium: alternative to cadmium columns. **Water Research**, New York, v. 18, n. 5, p. 643–646, 1984.

JURADO, E.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; NÚÑEZ-OLEA, J.; LUZÓN, G.; LECHUGA, M. Simplified spectrophotometric method using methylene blue for determining anionic surfactants: applications to the study of primary biodegradation in aerobic screening tests. **Chemosphere**, v. 65, p. 278–285, 2006.

KLOSTER, M. B.; KING, M. P. The determination of sulfide with DPD. **Journal - American Water Works Association**, Denver, v. 69, p. 544–546, 1977.

KOGA, M.; YAMAMICHI, Y.; NOMOTO, Y.; IRIE, M.; TANIMURA, T.; YOSHINAGA, T. Rapid determination of anionic surfactants by improved spectrophotometric method using methylene blue. **Analytical Sciences**, Tokyo, v. 15, p. 563–568, 1999.

LETTINGA, G.; FIELD, J.; VAN LIER, J. B.; ZEEMAN, G.; HULSHOFF POL, L. W. Advanced anaerobic wastewater treatment in the near future. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 10, p. 5–12, 1997.

LEWIS, A. M. Review of metal sulphide precipitation. **Hydrometallurgy**, Amsterdam, v. 104, p. 222–234, 2010.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheopigments: spectrophotometric equations, **Limnology and Oceanography**, Lawrence, v. 12, n. 2, p. 343–346, 1967.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LU, Y.; SLATER, F.; BELLO-MENDOZA, R.; BATSTONE, D. J. Shearing of biofilms enables selective layer based microbial sampling and analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 110, n. 10, p. 2600–2605, 2013.

MACLEOD, F. A.; GUIOT, S. R.; COSTERTON, J. W. Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1598–1607, 1990.

MENDONÇA, L. C. **Microbiologia e cinética de sistema de lodos ativados como pós-tratamento de efluente de reator anaeróbio de leito expandido**. 2002. Tese (Doutorado em Engenharia Civil: Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals: part one chemistry and microbiology. **Public Works**, Thousand Oaks, p. 107-112, Sept. 1964a.

MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals: part two requirements and control. **Public Works**, Thousand Oaks, p. 123-126, Oct. 1964b.

MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals: part three toxic materials and their control. **Public Works**, Thousand Oaks, v. 95, p. 91-94, 1964c.

MCCARTY, P. L. Anaerobic waste treatment fundamentals: part four process design. **Public Works**, Thousand Oaks, v. 95, p. 95-99, 1964d.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MILLER, B. F.; MUNTZ, J. A. A method for the estimation of ultramicro-quantities of lactic acid. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 126, p. 413–421, 1938.

MIWA, A. C. P.; FALCO, P. B.; CALIJURI, M. C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 2, p. 236–242, 2008.

MORAES, E. M.; ADORNO, M. A. T.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Determinação das alcalinidades real e total em amostras de reatores anaeróbios por titulações condutométricas. *In*: CHERNICHARO, C. A. L. (coord.). **Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: aspectos metodológicos**. Belo Horizonte: PROSAB, 2001. p. 19–24.

MORRISON, I.M., Semi-micro method for determination of lignin and its use in predicting digestibility of forage crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 23, p. 455-463, 1972a.

MORRISON, I. M. Improvements in the acetyl bromide technique to determine lignin and digestibility and its application to légumes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 23, p. 1463-1469, 1972b.

MOTA, V. T.; SANTOS, F. S.; ARAUJO, T. A.; AMARAL, M. C. S. Evaluation of titration methods for volatile fatty acids measurement: effect of the bicarbonate interference and feasibility for the monitoring of anaerobic reactors. **Water Practice & Technology**, London, v. 10, n. 3, p. 486–495, 2015.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 695–700, 1993.

NATION, J. L. A new method using hexamethyldisilazane for preparation of tissues for scanning electron microscopy. **Stain Technology**, New York, v. 58, p. 347–351, 1983.

NORMAN, R. J.; EDBERG, J. C.; STUCKI, J. W. Determination of nitrate in soil extracts by dual-wavelength ultraviolet spectrophotometry. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 49, p. 1182–1185, 1985.

NOYOLA, A.; SAGASTUME, J. M. M.; HERNANDEZ, J. E. L. Treatment of biogas produced in anaerobic reactors for domestic wastewater: odor control and energy/resource recovery. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Dordrecht, v. 5, p. 93–114, 2006.

OMNILAB. **FoodALYT D 5000**: Steam Distillation Unit. Bremen: [s. n.], 2009.

PAUSS, A.; ANDRE, G.; PERRIER, M.; GUIOT, S. R. Liquid-to-gas mass transfer in anaerobic processes: inevitable transfer limitations of methane and hydrogen in the biomethanation process. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 6, p. 1636–1643, 1990.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 83, p. 346–356, 1977.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos, **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 268–277, 1996.

POINAPEN, J.; EKAMA, G. A.; WENTZEL, M. C. Biological sulphate reduction with primary sewage sludge in an upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactor – part 2: modification of simple wet chemistry analytical procedures to achieve COD and S mass balances. **Water SA**, Pretoria, v. 35, n. 5, p. 535–542, 2009.

POSTGATE, J. R. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. London: Cambridge University Press, 1984.

POSTMA, T.; STROES, J. A. P. Lipid screening in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 22, p. 569–578, 1968.

RAMPINELLI, L.R. **Isolamento e caracterização de uma nova espécie de bactéria redutora de sulfato obtida de drenagem ácida de mina**. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2007.

RAUNKJÆR, K.; HVITVED-JACOBSEN, T.; PER HALKJAER, N. Measurement of pools of protein: carbohydrate and lipid in domestic wastewater. **Water Research**, New York, v. 28, n. 2, p. 251–262, 1994.

RIBAS, M. M. F.; MORAES, E. M.; FORESTI, E. Avaliação da acurácia de diversos métodos para determinação de ácidos graxos voláteis e alcalinidade a bicarbonato para monitoramento de reatores anaeróbios. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 240–246, 2007.

RICHARDS, F. A.; THOMPSON, T. G. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis: II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. **Journal of Marine Research**, New Haven, v. 11, n. 2, p. 156–172, 1952.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digester of high-strength wastes. **Journal Water Pollution Control Federation**, Washington, v. 58, n. 5, p. 406–411, 1986.

ROBINSON, J. W.; HSU, C. J. Spectroscopic studies of the chromotropic acid-nitrate reaction. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 44, p. 51–58, 1969.

ROSSUM, J. R.; VILLARRUZ, P. A. Suggested method for turbidimetric determination of sulfate in water. **Journal - American Water Works Association**, Denver, v. 53, n. 7, p. 873–876, 1961.

SANDER, R. **Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry**. Mainz: Max-Plan Institute of Chemistry, 1999.

COMPANHIA DO SANEAMENTO BÁSICO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Determinação de ferro total**: método da 1,10-fenantrolina. São Paulo: SABESP, 2001. Norma técnica NTS 010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANLATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350–1354, 1985.

SAKAMOTO, I. K. **Comportamento do consórcio microbiano existente em um lodo granulado anaeróbio metanogênico submetido a adições crescentes de sulfato**. 1996. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1996.

SAKAMOTO, I. K.; VARESCHE, M. B. A. Quantificação de bactérias redutoras de sulfato por NMP. *In*: VARESCHE, M. B. A. (coord.). **Curso de treinamento para desenvolvimento, consolidação e aplicação de técnicas cromatográficas e microbiológicas para monitoramento de reatores**. São Carlos: Rede de Laboratórios Nacionais de Microbiologia Aplicada ao Saneamento, 2009. Apostila 1.

SCHMIDT, E. L.; BELSER, L. W. Nitrifying bacteria. *In*: PAGE, A. L. (ed.). **Methods of soil analysis: part 2 chemical and microbiological properties**. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 1027-1042.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1995.

SHOW, K. Y.; WANG, Y.; FOONG, S. F.; TAY, J. H. Accelerated start-up and enhanced granulation in upflow anaerobic sludge blanket reactors. **Water Research**, New York, v. 38, p. 2292–2303, 2004.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. B. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantification of the analytical methods. **Chronicles of Young Scientists**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 21–25, 2011.

SINGH, K. S.; VIRARAGHAVAN, T. Start-up and operation of UASB reactors at 20°C for municipal wastewater treatment. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 85, n. 6, p. 609-614, 1998.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**. Denver: National Renewable Energy Laboratory, 2012.

SOUZA, C. L.; CHERNICHARO, C. A. L.; AQUINO, S. F. Quantification of dissolved methane in UASB reactors treating domestic wastewater under different operating conditions. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 64, n. 11, p. 2259-2264, 2011.

SOUZA, C. L. **Estudo das rotas de formação, transporte e consumo dos gases metano e sulfeto de hidrogênio resultantes do tratamento de esgoto doméstico em reatores UASB**. 2010. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

SPEECE, R. E. **Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters**. Nashville: Archae Press, 1996.

SRIDHAR, M. K. C.; PILLAI, S. C. Proteins in wastewater and wastewater sludges. **Water Pollution Control Federation**, Washington, v. 45, n. 7, p. 1595–1600, 1973.

STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. **Journal of General Microbiology**, London, v. 5, p. 698–703, 1951.

STOOKEY, L.L., Ferrozine: a new spectrophotometric reagent for iron. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 42, n. 7, p. 779–781, 1970.

STRICKLAND, J. D. H.; PARSONS, T. R. Determination of reactive Nitrite. *In*: **A practical handbook of seawater analysis**. Ottawa: Ministère des approvisionnements et services, 1968. p. 71-75. (Bulletin Fisheries Research Board of Canada, 167).

- TAYLOR, K. A. C. C. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, p. 49–58, 1996.
- THEANDER, O.; WESTERLUND, E. A. Studies on dietary fibre. 3. Improved procedures for analysis on dietary fibre. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Washington, v. 34, n. 2, p. 330-336, 1986.
- TIEDJE, J. Denitrification, in: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis: part 2** chemical and microbiological properties. 2nd ed. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p. 1011-1026.
- TZENG, J. H.; CHEN, S. C. Preliminary silver chloride separation for chemical oxygen demand analysis in saline water samples. **Journal of the Chinese Institute of Environmental Engineering**, Taipei, v. 3, n. 4, p. 237–240, 1993.
- VALDERRAMA, J. C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. **Marine Chemistry**, Amsterdam, v. 10, p. 109–122, 1981.
- VALDEZ, H. C.; AMADO, R. S.; SOUZA, F. C.; D'ELIA, E.; VIEIRA, E. C. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 601–607, 2012.
- VAN HAANDEL, A. C.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente**. Campina Grande: [s. n.], 1994.
- VAN SOEST, P. J. Use of detergents in analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of Official Agricultural Chemists**, Washington, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.
- VAN SOEST, P. J.; WINE, R.H. The determination of lignin and cellulose in acid-detergent fibre with permanganate. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 51, n. 4, p. 780-785, 1968.
- VELÁSQUEZ, A. V. **Comparação dos métodos lignina detergente ácido (LDA), lignina permanganato de potássio (LPer), lignina Klason (LK) e lignina brometo de acetila (LBA) na determinação do teor de lignina em plantas forrageiras e correlação com digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.
- VICH, D. V. **Atividade metanogênica e comunidade microbiana envolvidas na degradação de metilamina**. 2006. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- VIOLLIER, E.; INGLET, P. W.; HUNTER, K.; ROYCHOUDHURY, A. N.; VAN CAPPELLEN, P. The ferrozine method revisited: Fe(II)/Fe(III) determination in natural waters. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 15, p. 785–790, 2000.
- VOGEL, A. I. **Quantitative chemical analysis**. 5th ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1989.
- VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996a. v. 1.
- VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996a. v. 2.
- VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996a. v. 4.
- WALKER, M.; ZHANG, Y.; HEAVEN, S.; BANKS, C. Potential errors in the quantitative evaluation of biogas production in anaerobic digestion processes. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 100, p. 6339–6346, 2009.
- WATSON, J. D.; MYERS, R. M.; CAUDY, A. A.; WITKOWSKI, J. A. **DNA recombinante: genes e genomas**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

WEST, P. W.; RAMACHANDRAN, T. P. Spectrophotometric determination of nitrate using chromotropic acid. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 35, p. 317–324, 1966.

WOOD, T. W.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulase activities. *In*: WOOD, T. W.; KELLOGG, S. T. (eds.). **Methods in Enzymology**, v. 160, n. 9, p. 87–112. London: Academic Press Inc., 1988.

WU, J.; EITEMAN, M. A.; LAW, S. E. Evaluation of membrane filtration and ozonation processes for treatment of reactive-dye wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, v. 124, p. 272–277, 1998.

WU, J.; HONG, Y.; GUAN, F.; WANG, Y.; TAN, Y.; YUE, W.; WU, M.; BIN, L.; WANG, J.; WEN, J. A rapid and high-throughput microplate spectrophotometric method for field measurement of nitrate in seawater and freshwater. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2016.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391–411, 2003.



2021