



LEARNING TOXICOLOGY
THROUGH OPEN EDUCATIONAL
RESOURCES

AMOSTRAGEM AMBIENTAL E MEDIÇÕES ANALÍTICAS

Camelia DRAGHICI, Ileana MANCIULEA

Transilvania University of Braşov

c.draghici@unitbv.ro, i.manciulea@unitbv.ro

Traduzido e adaptado por Dina Isabel Sousa Carvalho das Neves, Ana Margarida Lopes da Silva e Fernando Remião (remiao@ff.up.pt) do Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (Portugal).



1. INTRODUÇÃO

Dando seguimento ao fluxo de monitorização ambiental, esta unidade irá descrever como implementar a etapa de execução (Figura 1.):

- princípios de amostragem e preparação de amostra para análise ambiental (U 2.1);
- princípios dos métodos analíticos com aplicabilidade para a determinação de poluentes no ambiente e requisitos de qualidade para análise ambiental (U 2.2).



Figura 1. Fluxo de monitorização ambiental, etapas de execução e avaliação.

No final da Unidade 2, os estudantes serão capazes de:

- descrever os princípios dos métodos disponíveis para amostragem ambiental e preparação de amostra;
- selecionar os métodos de amostragem e preparação de amostra apropriados para uma amostra do ambiente específica;
- descrever os princípios dos métodos analíticos disponíveis para a análise ambiental;
- identificar e selecionar os métodos analíticos apropriados para as medições de poluentes em amostras do ambiente.
- descrever conceitos introdutórios e aplicabilidade da metrologia (ciência da medição) em química para análise ambiental.

Existem diversas áreas nas quais a amostragem e análise ambiental são necessárias:

1. **monitorização de rotina** – por exemplo para medir a concentração de poluentes no ambiente e identificar tendências a curto e longo prazo;
2. **resposta de emergência** – por exemplo para detetar uma libertação accidental de poluentes no ambiente e avaliar o risco e toxicidade para humanos e biota;
3. **aplicação e cumprimento da regulamentação** – por exemplo para medir a quantidade de poluentes que são libertados no ambiente

(emissões gasosas, descargas de águas residuais) de modo a cumprir com os requisitos regulamentares.

4. **investigação científica** – por exemplo para estudar o destino e transporte de contaminantes e avaliar a eficiência dos sistemas de remediação.

Como apresentado na U1., amostra é uma porção de um sistema (ambiente), representativa do local e momento de amostragem. Amostras são sistemas complexos homogéneos (soluções) ou heterogéneos. Raramente analisa-mos uma amostra de um componente só; na maioria dos casos, as amostras reais são sistemas de vários componentes, constituídas por compostos presentes como componentes maioritários ou componentes vestigiais. Considerando a complexidade de uma amostra ambiental é óbvia a razão pela qual a caracterização dessas amostras é um processo completo e rigoroso que requer um conhecimento inicial mínimo do local de amostragem e composição.

Alguma delimitação de termos deve ser mencionada:

- *componente/composto/substância* é uma porção de matéria delimitada por uma determinada composição elementar e com uma fórmula química atribuída;
- *analito* representa o composto de interesse que é sujeito à análise;
- *analitos* são sujeitos a *determinação*;
- *amostras* são sujeitas a *análise*.

Alguns possíveis compostos poluentes típicos que diferem quando o ar, água ou solo são monitorizados, são apresentados na **Tabela 1.**

Tabela 1. Compostos típicos presentes no ar, água e solo.

Compostos	Ar	Água	Solo
gases inorgânicos	O ₂ , CO ₂ , CO, SO _x , NO _x , Cl ₂ , H ₂ S, HCl	oxigénio dissolvido (OD)	
aniões	nitrito, nitrato, sulfureto, cloreto, formato, acetato...		
metais pesados	muito raro	Cu ²⁺ , Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ²⁺	
VOCs ⁽¹⁾	VOCs	raro	muito raro
POPs ⁽²⁾	PAHs ⁽³⁾ , PCBs ⁽⁴⁾ , pesticidas, explosivos		
outros	partículas de matéria	detergentes	detergentes, ácidos húmicos e fúlvicos

⁽¹⁾ Compostos Orgânicos Voláteis; ⁽²⁾ Poluentes Orgânicos Persistentes; ⁽³⁾ Hidrocarbonetos Poliaromáticos; ⁽⁴⁾ Bifenil Policlorados

A tabela não apresenta os parâmetros de monitorização regulamentados, mas sim alguns dos grupos de compostos expectáveis, de acordo com diversos critérios: estado de agregação, natureza da amostra e origem, composição e hidrofobicidade dos compostos. É importante notar que os compostos encontrados na água e solo são praticamente semelhantes, devido à chamada “solução de solo” que contem a maioria das substâncias solúveis em água dispersas nas zonas intersticiais do solo.

2. AMOSTRAGEM AMBIENTAL

Amostragem é o termo genérico que consiste em dois grupos de operações distintos:

- *operações pré-laboratoriais* – consistem em (i) recolha/colheita de amostras no local (usualmente denominado “amostragem”), (ii) conservação no local, (iii) transporte e armazenamento;
- *operações laboratoriais* – consistem no pré-tratamento da amostra e preparação para análise; estes incluem separação, purificação, concentração e outras operações.

2.1. AMOSTRAGEM

Para os compostos que podem sofrer transformações consideráveis durante o transporte para o laboratório, as amostras devem ser analisadas no local. Para essas medições, equipamento adequado, baseados em sensores seletivos e kits de reagentes estão disponíveis. Embora o equipamento disponível não seja suficientemente sensível e preciso para análises de rastreamento, a informação obtida de medições no local de recolha são muito valiosas e visam completar a caracterização final da amostra.

A **Tabela 2** apresenta as sete etapas da vida da amostra, desde o planeamento da amostragem até à libertação da amostra, quando esta está expirada ou não é mais necessária ou válida. A tabela também enumera algumas questões a ter em conta de forma a passar pelas sete etapas da vida da amostra.

Tabela 2. Sete etapas da vida da amostra.

7 etapas da vida da amostra	Aspetos relacionados
1. a amostragem é planeada	<ul style="list-style-type: none">• quando recolher amostras• com que frequência recolher amostras• que amostras recolher (ar, água, solo)• quem deve recolher as amostras (cadeia de custódia da amostra)
2. pontos de amostragem são identificados	<ul style="list-style-type: none">• onde recolher amostras
3. amostras são recolhidas	<ul style="list-style-type: none">• como recolher amostras• quantas amostras recolher• que quantidade de amostra é necessária
4. amostras são transferidas para o laboratório	<ul style="list-style-type: none">• como conservar as amostras• quanto tempo estarão as amostras estáveis
5. amostras são preparadas e analisadas	<ul style="list-style-type: none">• que propriedade analisar (física, química, biológica)
6. amostras são transformadas em chemical data point	
7. amostras expiram e são libertadas	

2.1.1. IMPORTÂNCIA DA AMOSTRAGEM

A amostragem é uma atividade com elevada importância, tendo em conta que se as amostras não são recolhidas devidamente ou se não são representativas do local e momento de amostragem, os dados analíticos obtidos não serão confiáveis, os dados corresponderão a outras evidências.

A amostragem depende da complexidade e quantidade das amostras e analitos mas, também, dos requisitos de qualidade do laboratório: **padrões** disponíveis para métodos analíticos a serem usados na etapa de medição, equipamento, reagentes e material de referência ou pessoal especializado. Qualquer informação sobre a **história da amostra** será útil para a escolha do método analítico ideal.

2.1.2. CONSERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

Para os compostos que são estáveis ou podem ser conservados durante o período de pré-tratamento, o procedimento de conservação é utilizado. Desde o local de amostragem, as amostras conservadas são transportadas para o laboratório e armazenadas. Estas etapas e operações são realizadas de acordo com **normas** (se disponíveis) e toda a informação deve ser cuidadosamente registada nos rótulos das amostras e em **formulários normalizados**, para ser utilizada na formulação do resultado final.

Os rótulos das amostras contêm informação sobre:

- nome da pessoa responsável por executar a amostragem;
- data, hora e local de colheita da amostra.

As amostras são acompanhadas por um **formulário normalizado** que contém informação sobre:

- finalidade e objetivos da amostragem;
- tipo de análises futuras;
- tipo de recipiente para amostra e seu estado;
- observações relacionadas com as fontes e extensão de poluição;
- informação meteorológica;
- condições de conservação da amostra.

Conservação e armazenamento de amostras ambientais são etapas pré-laboratoriais com a finalidade de evitar processos físicos e químicos (**Tabela 3.**) que podem ocorrer durante o transporte das amostras para o laboratório.

Tabela 3. Conservação e armazenamento de amostras ambientais.

Processos evitados		Conservação / armazenamento da amostra
físicos	volatilização, difusão, adsorção, absorção	<ul style="list-style-type: none">• refrigeração / arrefecimento• escolha do recipiente de armazenamento adequado
químicos / bioquímicos	degradação microbiana, reações químicas, reações fotoquímicas	<ul style="list-style-type: none">• refrigeração / arrefecimento• escolha do recipiente de armazenamento adequado• adição de reagentes químicos (conservantes)

Processos físicos como volatilização, difusão, absorção ou adsorção são evitados através da refrigeração e através da escolha adequada do recipiente de amostragem e armazenamento.

Processos químicos e bioquímicos, tal como a degradação microbiana e reacções químicas ou fotoquímicas, são também evitados através da refrigeração e através da escolha adequada dos recipientes e, adicionalmente, pela adição de reagentes químicos, denominados conservantes. Os reagentes usados como conservantes reagirão com certos compostos presentes na amostra, sendo isto uma prática aceite desde que a reacção química seja completa e controlada qualitativa e quantitativamente. Estes processos químicos serão tidos em conta durante a fase de cálculos que irá levar à expressão do resultado final.

Na **Figura 2.** estão presentes diversas amostras recolhidas para análise ambiental, armazenadas em diferentes recipientes, como frascos ou sacos de plástico.



Figure 2. Exemplos de amostras recolhidas para análise ambiental.

A **Tabela 4.** apresenta exemplos de conservação de amostras ambientais, que reagentes são utilizados e que processos de degradação podem ser evitados para diversos compostos de interesse, de origem orgânica ou inorgânica. Por exemplo:

- de modo a evitar a precipitação de metais na sua forma de óxidos ou hidróxidos é adicionado ácido nítrico, formando nitratos de metal solúveis;
- para evitar a reacção do cianeto com cloro, ácido ascórbico (vitamina C) é adicionado;

- para evitar a volatilização de compostos orgânicos voláteis, é necessário um enchimento completo do recipiente de amostragem;
- a recolha da amostra num recipiente de vidro escuro é utilizado para evitar a fotodegradação dos produtos de petróleo.

Tabela 4. Conservação de amostras ambientais.

Analito	Processos evitados	Conservação da amostra
metais	precipitação de óxidos / hidróxidos	HNO ₃ (pH<2)
NH ₃	volatilização	H ₂ SO ₄ (pH<2)
H ₂ S e sulfuretos	volatilização	acetato de Zn e NaOH (pH>9)
cianeto	volatilização	NaOH (pH>9)
	reação química com Cl ₂	ácido ascórbico
compostos orgânicos dissolvidos	reação química com Cl ₂	tiosulfato de sódio
éster ftálico	difusão através de plásticos	frascos de vidro ou Teflon
VOCs*	volatilização	enchimento completo dos frascos
oxigénio dissolvido	incorporação de oxigénio do ar	enchimento completo dos frascos
PAHs**	degradação fotoquímica	frascos de vidro escuro
produtos de petróleo	adsorção nos plásticos	frascos de vidro

* VOCs – compostos orgânicos voláteis; ** PAHs – hidrocarbonetos poliaromáticos

2.2. PRÉ-TRATAMENTO / TRATAMENTO DA AMOSTRA

O pré-tratamento / tratamento da amostra é o segundo grupo de operações, pertencente à etapa pré-analítica, a ser realizado nas amostras, no laboratório. A finalidade da preparação das amostras é convertê-las numa forma mensurável.

As operações de preparação de amostra visam tanto a amostra como o analito:

- operações referentes à amostra:
 - pesagem, secagem, peneiração – usadas para homogeneizar a amostra ou remover humidade;
 - alteração da fase da amostra (líquida) – adequação para instrumentos analíticos;
- operações referentes ao analito:
 - aumento/diminuição da concentração do analito (concentração/diluição) – dependente da concentração do analito na amostra;
 - dissolução – baseada nas propriedades de solubilidade do analito; por vezes a dissolução é também baseada em reações químicas (dissolução química);
 - remoção de interferentes – separação / purificação do analito na matriz da amostra; é realizado de forma a distinguir o(s) analito(s) de interesse do resto dos compostos presentes na amostra; estas “impurezas” podem introduzir informação semelhante à do(s) analito(s) de interesse, contribuindo assim para erros e incerteza no resultado final;
 - libertação do analito de interesse da matriz da amostra – aumento da resposta do detetor;
 - modificação da estrutura química do analito – derivatização química que consiste na transformação química do analito num composto novo, adequado para sistemas de medição e/ou detecção.

Tendo em consideração as modificações físico-químicas que ocorrem durante o pré-tratamento da amostra (tanto operações simples como mais complexas), a **Tabela 5.** apresenta exemplos de tais operações de preparação de amostras.

Tabela 5. Operações de preparação de amostras.

Operação Física		Operação Química	
Simple	Complexa		
<ul style="list-style-type: none">• pesagem• secagem• concentração• diluição	<ul style="list-style-type: none">• dissolução• destilação• filtração• ad/absorção• extração	<ul style="list-style-type: none">• dissolução química• precipitação• troca iónica• quelatação• derivatização química	

Método de separação usado no pré-tratamento da amostra

A maior parte das operações utilizadas no pré-tratamento da amostra são baseadas em processos de separação e existem várias formas de os classificar e agrupar. A classificação que propomos é baseada no equilíbrio das diferentes fases:

- *equilíbrio gás-líquido*: absorção, extração, destilação;
- *equilíbrio gás-sólido*: adsorção, extração;
- *equilíbrio líquido-líquido*: técnicas de extração líquido-líquido;
- *equilíbrio líquido-sólido*: filtração, centrifugação, ad/absorção, extração em fase sólida (microextração em fase sólida, extração com solvente, extração com Soxhlet, extração por sonicação, extração assistida por micro-ondas).

Todos estes processos contribuem para a separação de analitos específicos do resto da matriz. As operações de separação estão, hoje em dia, a ser desenvolvidas relativamente ao método (princípio) e técnica (equipamento) porque os analistas aperceberam-se da importância da amostragem (incluindo a fase de pré-tratamento) para o processamento de medições e de dados. Somente uma amostra com um adequado pré-tratamento pode assegurar uma incerteza limitada no resultado final.

De todos os possíveis compostos poluentes dados na **Tabela 1.**, iremos de seguida apresentar as duas principais classes de poluentes, considerados de interesse para monitorização ambiental, com exemplos de procedimentos típicos de pré-tratamento;

1. catiões de metais pesados, da classe de poluentes inorgânicos;
2. compostos orgânicos, agrupados de acordo com propriedades específicas (VOCs, POPs), composição específica (PAHs, PCBs) ou uso específico (pesticidas, detergentes).

2.2.1. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DE METAIS PESADOS

A amostragem para análise de metais pesados é baseada num princípio muito simples: converter os catiões numa *forma solúvel, estável e mensurável*:

- a. tanto os catiões monoatômicos (Cu^{2+} , Fe^{2+} , etc.);
- b. como também os compostos metálicos (inorgânicos ou orgânicos), nos quais os átomos metálicos estão ligados a outro grupo de átomos, formando diferentes espécies mensuráveis – iões ou moléculas neutras.

Técnicas de Pré-Tratamento Usadas para Amostras Líquidas

De modo a solubilizar metais pesados são utilizadas a *troca iónica*, *precipitação* ou *quelatação*, transformando o composto de interesse numa forma extraível, seguida da sua extração. Logo que as formas solúveis e extraíveis dos metais pesados são obtidas, as suas soluções estão prontas para análise química.

Das técnicas de extração utilizadas para a preparação de metais pesados para análise a partir de amostras líquidas, mencionamos as seguintes:

- **extração líquido-líquido (LLE)** – com solventes de diferentes polaridades;
- **extração em fase sólida (SPE)** – consiste na retenção / adsorção de espécies metálicas numa fase sólida adequada, seguida da dessorção com um solvente orgânico ou inorgânico apropriado, como a água.

Técnicas de Pré-Tratamento Usadas para Amostras Sólidas

O pré-tratamento de amostras para análise de metais pesados a partir de amostras sólidas é realizado através de uma simples dissolução em água (água fria ou quente), de mineralização ou digestão. **Mineralização** consiste na transformação de espécies inorgânicas e orgânicas em compostos simples inorgânicos (minerais).

As seguintes técnicas de **digestão** estão disponíveis para a preparação de amostras com vista a análise de metais pesados:

- digestão ácida – com ácidos fortes ou mistura de ácidos fortes com potentes oxidantes (HCl, HF, HNO₃, água régia, H₂SO₄ com H₂O₂);
- digestão alcalina – com NaOH ou KOH, especialmente quando os metais pesados de interesse possuem carácter anfotérico (Cr, Mn);
- desagregação através da fusão com **fondants** (NaOH ou K₂S₂O₈) seguida de dissolução dos compostos obtidos;
- calcinação a elevada temperatura – seguida de dissolução dos compostos resultantes na cinza de calcinação, nas condições ácidas ou alcalinas acima mencionadas;
- digestão a elevada pressão – em bombas de digestão;
- digestão assistida por microondas – combina o efeito da pressão e da temperatura.

2.2.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ANÁLISE DE POLUENTES ORGÂNICOS

O pré-tratamento das amostras para análise de compostos orgânicos é baseada num princípio semelhante àquele usado para análise de metais pesados: extracção do composto orgânico da matriz numa forma solúvel e estável. Esta etapa de preparação depende do estado de agregação da matriz da amostra: líquido ou sólido.

Devido às estruturas mais complexas observadas nos compostos orgânicos (comparativamente aos compostos inorgânicos), as técnicas de extracção usadas no pré-tratamento são baseadas em diferentes propriedades físicas dos analitos: transformação de fase, propriedades de absorção e solubilidade em solventes polares ou não polares.

Extracção de Poluentes Orgânicos de Amostras Líquidas

Os compostos orgânicos voláteis (VOC) são separados por extracção em “headspace” estática (extracção em vapores saturados) ou por extracção purga e armadilha (vaporização seguida de condensação). Compostos orgânicos semi-voláteis (SVOC) e compostos orgânicos não voláteis (NVOC) são separados em duas etapas: a primeira visa obter um líquido homogéneo e é seguida do passo de extracção.

Para a separação de poluentes SVOC e NVOC a partir de amostras líquidas é usada:

1. extracção líquido-líquido (LLE)
2. extracção em fase sólida (SPE) e microextracção em fase sólida (SPME)

Extracção de Poluentes Orgânicos de Amostras Sólidas

Para a extracção de compostos orgânicos semi-voláteis e não voláteis a partir de amostras sólidas, as seguintes técnicas são frequentemente aplicadas:

- extracção em Soxhlet (automatizada),
- **extracção acelerada por solventes (ASE),**
- **extracção ultrasónica por solventes (USE),**
- **extracção sob pressão por solventes (PSE),**
- extracção assistida por microondas (MAE).

Como uma aplicação específica, de seguida exemplificamos técnicas de extracção de pesticidas a partir de amostras líquidas e sólidas. Na Tabela 6. estão apresentadas técnicas de extração com as aplicações respetivas dependendo do estado de agregação dos compostos, nomeadamente, da amostra. Pode também ser de interesse algumas informações técnicas (como o tempo de extração) e custos.

Tabela 6. Exemplos de extração de pesticidas a partir de amostras ambientais líquidas e sólidas.

Técnica de Extração	Aplicações	Custo	Tempo de Extração
LLE	VOC, SVOC, NVOC em amostras líquidas	baixo	1 h
SPE		médio	30 min
SPME		baixo	30 min
Soxhlet	SVOC, NVOC em amostras sólidas	baixo	12–48 h
USE		médio	15–30 min
MAE		médio	15 min
ASE (PSE)		elevado	20–30 min

Com base na complexidade da amostra, o analista irá escolher as operações de pré-tratamento mais adequadas, a menos que estas sejam sujeitas a padronização, considerando diferentes critérios de selecção baseados nas características de performance: especificidade, precisão e exatidão, reprodutibilidade, recuperabilidade.

Informação particular para a amostragem e pré-tratamento de amostras de ar, água e solo serão apresentados no Tópico 6.4.

3. ANÁLISE AMBIENTAL

A maior parte das análises ambientais estão reguladas por normas que são sujeitas a revisão periódica, dependendo do estado de desenvolvimento dos métodos analíticos e equipamentos nesse momento. Além disso, por vezes a amostra pode ser mais complexa do que o **standard** disponível. Por isso, o objectivo dos próximos parágrafos é apresentar os *princípios básicos dos métodos analíticos e não as normas ambientais europeias ou outras normas internacionais*. Consideramos que a compressão dos princípios dos métodos

analíticos e técnicas contribuirão para o seu uso adequado e para correlação de toda a informação disponível.

Química analítica é a ciência que estuda e usa métodos e instrumentos desenvolvidos para separar, identificar e quantificar a composição de matéria/amostra.

Análise química representa a soma das operações locais ou no laboratório realizadas para fornecer informação qualitativa e quantitativa acerca da composição de uma amostra complexa. A análise química de uma amostra consiste na caracterização da mesma do ponto de vista da sua composição química e, por princípio, é baseada numa propriedade mensurável do soluto (analito) e, por vezes, da solução (amostra).

3.1. PRINCÍPIOS DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Os **princípios dos métodos analíticos** são baseados numa propriedade mensurável (P) do analito (A): massa, volume, propriedade térmica, elétrica ou ótica.

O desenvolvimento de **métodos analíticos**, em termos de mecanismos ou equipamentos, permitiu o desenvolvimento de novas **técnicas analíticas** do mesmo método, sendo que, a técnica analítica é definida pela mesma propriedade mensurável. As técnicas analíticas pertencem ao mesmo método, tendo o mesmo princípio mas sendo desenvolvidas com base em diferentes mecanismos de medição.

A determinação da composição química de uma amostra impõe a aquisição de dois tipos de informação: *informação qualitativa* (análise qualitativa ou identificação); *informação quantitativa* (análise quantitativa ou quantificação). Análise quantitativa significa encontrar a *propriedade mensurável* (P) que pode ser relacionada em função da *concentração do analito* (C_A), baseada em leis físico-químicas: $P=f(C_A)$. Nenhuma informação quantitativa confiável pode ser determinada sem uma caracterização qualitativa da amostra correta e completa.

3.2. CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS AMBIENTAIS

Os métodos analíticos podem ser agrupados em duas categorias:

- **métodos analíticos clássicos** – também denominados **métodos químicos wet (wet chemical methods)**;
- **métodos analíticos modernos ou instrumentais**; os analitos são sujeitos a transformações físicas durante as medições, sendo estes métodos não destrutivos; estes métodos recorrem a curvas de calibração para determinações quantitativas obtidas a partir de soluções padrão $P=f(C_A)$.

Os métodos químicos (clássicos) foram os primeiros a serem desenvolvidos sendo dependentes do desenvolvimento tecnológico na altura; são baseados em reacções químicas que ocorrem entre o analito e reagentes específicos e, por isso, são métodos destrutivos. Os métodos analíticos instrumentais foram desenvolvidos mais recentemente e são baseados em transformações físicas do analito e, por isso, são métodos não destrutivos.

Por vezes, a combinação de transformações físicas e químicas é necessária, correspondendo a métodos físico-químicos. Geralmente, ocorre um pré-tratamento químico do analito (ex.: derivatização) seguido de transformação de uma propriedade física.

Na **Tabela 7.** estão apresentados os principais métodos analíticos e respetivas técnicas com informação sobre as propriedade determinadas, dos quais os mais comumente utilizados serão apresentados mais tarde: técnicas gravimétricas, **volumétricas (titrimetric)**, espectrométricas e cromatográficas.

Table 7. Métodos e técnicas utilizados na análise ambiental.

Métodos	Técnicas	Propriedade determinada
Gravimétricos ^{(1), (2)}	<ul style="list-style-type: none">• eletro-gravimetria• termo-gravimetria	massa de um analito puro ou de uma mistura
Volumétricos ^{(1), (2)}	<ul style="list-style-type: none">• ácido-base• redox• precipitação• complexação	volume de solução de um reagente padrão que reage com o analito

Métodos Eletroquímicos ^{(3), (4)}	<ul style="list-style-type: none"> • voltametria • potenciometria • condutimetria 	Propriedades elétricas do analito em solução: potencial, força eletromotriz, condutibilidade
Espectrometria ^{(3), (4)}	<ul style="list-style-type: none"> • espectrometria atômica / molecular • espectrometria de absorção / emissão 	comprimento de onda e intensidade da radiação eletromagnética emitida ou absorvida pelo analito
Cromatografia ^{(3), (4)}	<ul style="list-style-type: none"> • cromatografia gasosa • cromatografia líquida 	Repartição do analito entre duas fases imiscíveis (fase móvel e estacionária)

(1) – análise quantitativa; (2) – concentração dos poluentes **at major, minor level, sometimes traces**; (3) – análise qualitativa e quantitativa; (4) – concentração dos poluentes **at major, minor or traces level**.

3.2.1. WET CHEMICAL METHODS E APLICAÇÕES EM ANÁLISE AMBIENTAL

Gravimetria é um método químico clássico, cujo *princípio* se baseia na medição da massa do analito ou, na maioria dos casos, a massa de um produto obtido durante uma reação química.

O método em amostras ambientais para a determinação do conteúdo em humidade, sólidos, óleos ou gordura.

Volumetria é também um método químico clássico, cujo *princípio* é baseado na reacção do analito com um reagente específico (reagente ácido/base, redox, de precipitação ou complexação), medindo o volume de uma solução padrão de um composto envolvido na reação de volumetria.

Técnicas de volumetria são usadas para análise ambiental, tais como:

- volumetria ácido-base para determinação de acidez ou alcalinidade;
- volumetria redox para determinação de cloro e sulfureto residual;
- volumetria de precipitação para a determinação de cloretos;
- volumetria de complexação para determinação de cianetos.

3.2.2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS E APLICAÇÕES EM ANÁLISE AMBIENTAL

A **Tabela 7.** apresenta algumas técnicas espectrométricas com informação relativa ao princípio do método e exemplos de aplicações na análise ambiental. As técnicas espectrométricas podem ser de absorção ou emissão, para determinações moleculares ou atómicas. Esta ampla gama de princípios permite o uso das técnicas espectrométricas na determinação de um grande número de poluentes em amostras ambientais. Por exemplo, a espectrometria de absorção atómica é usada para determinar metais pesados em análises vestigiais e, por outro lado, a espectrometria de absorção molecular permite a determinação de compostos orgânicos insaturados e inorgânicos (**Tabela 8.**).

3.2.3. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS E APLICAÇÕES EM ANÁLISE AMBIENTAL

Outro grupo de métodos analíticos usado na análise é a cromatografia, útil na obtenção de informação complexa: *separação, qualitativa, quantitativa e, também estrutural.* O *princípio* da cromatografia é a distribuição diferencial de analitos entre duas fases imiscíveis, uma fase móvel (gasosa ou líquida) e uma fase estacionária (líquida ou sólida).

Tabela 8. Técnicas espectrométricas e suas aplicações em análise ambiental.

Técnica	Acrónimo	Princípio	Aplicações
Espectrometria de emissão atómica	AES ICP-AES	emissão atómica em arco , em chama; emissão atómica em plasma	metais e não metais (vestigios)
Espectrometria atómica de fluorescência		fluorescence atomic emission	Hg, hidretos não metálicos (vestigios)
Fluorimetria		emissão molecular	PAHs
Espectrometria de absorção atómica	AAS	absorção atómica	metais e não metais (vestigios)
Espectrometria UV-VIS	UV-VIS	absorção molecular	espécies inorgânicas e compostos orgânicos insaturados

Espectrometria IV	IV	absorção molecular	gases, soluções ou compostos sólidos inorgânicos ou orgânicos
Espectrometria de massa	MS	ionização e fragmentação molecular	identificação e análise estrutural de compostos orgânicos

Cromatografia gasosa, cromatografia líquida e cromatografia iônica têm tido aplicabilidade na separação e determinação qualitativa e quantitativa de poluentes em amostras ambientais (Tabela 9.). Por exemplo, a cromatografia gasosa é usada para análise de poluentes gasosos e compostos orgânicos voláteis ou semi-voláteis.

Tabela 9. Técnicas cromatográficas e suas aplicações em análise ambiental.

Técnica cromatográfica	Applications
Cromatografia gasosa (GC)	gases, VOCs, SVOCs
Cromatografia líquida (LC)	SVOCs, NVOCs (pesticidas, PAHs, PCBs)
Cromatografia iônica (IC)	espécies iônicas e moléculas polares

As técnicas cromatográficas são **hyphenated techniques** adequadas, acoplando a espectrometria de massa (MS), que desempenha um papel importante da identificação (informação estrutural) de compostos orgânicos:

- GC-MS; GC-MS-MS;
- LC-MS; LC-MS-MS.

3.2.4. ETAPAS DAS MEDIÇÕES AMBIENTAIS QUE REQUEREM METODOLOGIA (STAGES IN ENVIRONMENTAL MEASUREMENTS REQUIRING METHODOLOGY)

Para a análise ambiental, normalmente, estão disponíveis métodos padronizados para amostragem, preparação da amostra e análise, no entanto, por vezes a amostra pode ser demasiado complexa e inadequada para uma norma em particular. Por isso, todas essas operações são sujeitas a desenvolvimento de métodos (Figura 3.).

Os métodos analíticos registaram um longo período de desenvolvimento, levado a cabo por analistas químicos em laboratórios profissionais especializados em investigação. Posteriormente, considerando a importância

da amostragem e preparação da amostra na incerteza total do resultado final, novos métodos e técnicas relacionadas com essas etapas analíticas foram também desenvolvidos.

Quando não estão disponíveis normas ou quando estão disponíveis mas não são aplicáveis num determinado laboratório, o analista está em posição de escolher os métodos e técnicas mais adequados, tanto para a preparação da amostra como para a sua análise. A escolha dessas técnicas deve ter em conta diferentes critérios de avaliação: dependendo da amostra, da performance e validação dos métodos e do laboratório analítico.

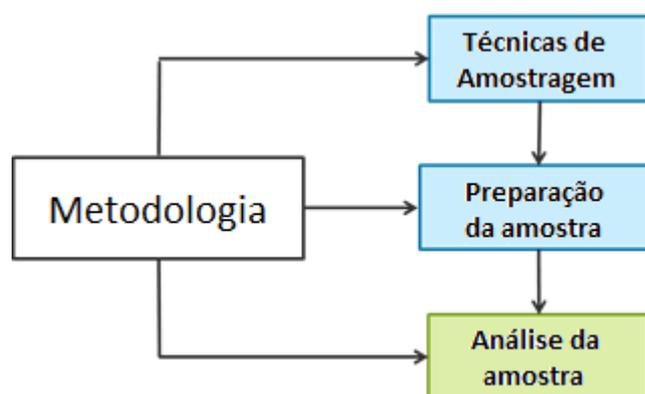


Figura 3. Etapas dos processos analíticos que requerem desenvolvimento de métodos.

3.3. REQUISITOS DE QUALIDADE PARA MEDIÇÕES AMBIENTAIS

Considerando as etapas de execução do fluxo de monitorização, a **Figura 4.** Apresenta todo o processo analítico que é sujeito a garantia de qualidade e controlo de qualidade (GQ/CQ).

A sociedade moderna é baseada em medições. 40% das directivas da UE referem-se a medições, na tecnologia, comércio, regulamentação, confirmando assim a afirmação. A sociedade moderna requer qualidade nos resultados das medições químicas, de modo a torná-las acessíveis em qualquer lugar. Existem duas formas de assegurar a qualidade das medições químicas: (1) aplicando sistemas de gestão e acreditação de qualidade (ISO/IEC 17025, 1999); (2) aplicando princípios da ciência da medição às medições químicas (Metrologia em Química – MiC). Assim, MiC foi desenvolvida a partir da necessidade de comparação e de ter um sistema uniforme de relatar os resultados.

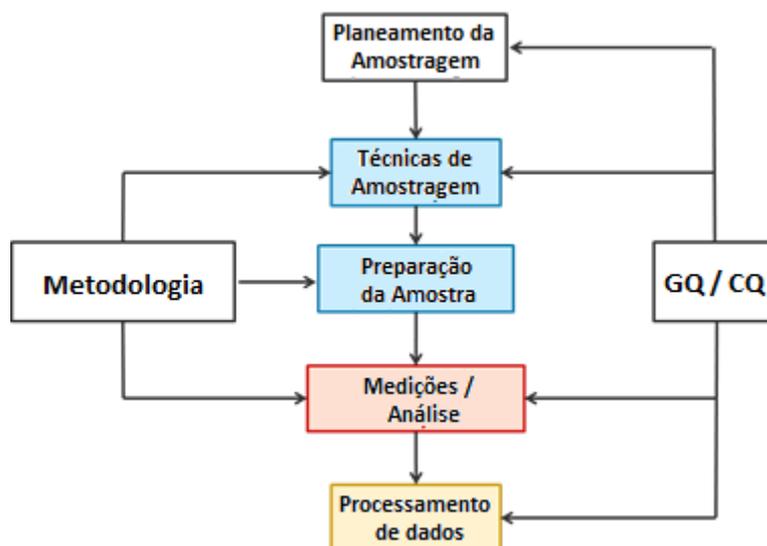


Figura 4. Processos analíticos que requerem garantia e controlo de qualidade.

De forma a garantir a qualidade nos resultados de medições químicas, em 1999 foi lançada a norma de acreditação ISO/IEC 17025 (a última versão é de 2017), concebida como orientação para requisitos gerais para a competência de realizar testes e/ou calibrações, incluindo amostragem, com métodos padronizados, métodos não-padronizados e ainda, métodos desenvolvidos no laboratório. ISO/IEC 17025 é baseada nos seguintes objetivos:

- Fornecer uma base a ser usada por organismos de acreditação ao avaliar a competência dos laboratórios;
- Estabelecer requisitos gerais para demonstrar a conformidade dos laboratórios para realizar testes específicos ou calibrações;
- Assistir no desenvolvimento e implementação do Sistema qualidade de um laboratório.

A acreditação permite ao laboratório demonstrar que os resultados são justificáveis à luz de uma norma reconhecida e não sofrem alterações quando o pessoal ou circunstâncias no laboratório modificam. ISO/IEC 17025 é aplicável a qualquer organização que realize testes e/ou calibrações. É usada por: (i) laboratórios acreditados no processo de acreditação; (ii) organizações de acreditação; (iii) autoridades de regulamentação.

De modo a obter acreditação, o laboratório necessita de fornecer informação relacionada com a origem do método (padronizado ou não padronizado), a comparação com os métodos padronizados que pretendem substituir (se aplicável) tal como os dados de validação do procedimento.

3.4. METROLOGIA EM QUÍMICA

A metrologia em química assume que a análise química é baseada na amostragem e medições, sendo que ambos os passos contribuem para a incerteza da medição. Os princípios metroológicos são importantes para todos os analistas que lidam com medições químicas, sendo que de entre os tópicos mais relevantes para MiC, *validação do método e estimativa da incerteza* serão apresentados nesta unidade:

- a. estabelecimento de *rastreabilidade* dos resultados das medições;
- b. utilização de *métodos validados* para análise;
- c. estimativa da *incerteza dos resultados de medição*;
- d. utilização de *materiais de referência certificados* (MRCs) e
- e. participação nos programas de *testes de proficiência* (TP) & comparação interlaboratorial (CILs).

EURACHEM é uma rede de organizações na Europa com o objectivo de estabelecer um sistema internacional de rastreabilidade de medições químicas e de promover boas práticas de qualidade. EURACHEM têm vindo a publicar uma variedade de tópicos de interesse mencionados acima (a – e). Todos os Guias estão disponíveis no website da EURACHEM.

3.4.1. VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS

De acordo com o Guia EURACHEM (2014), a validação dos métodos é o processo de definição de um requisito analítico e confirmação de que o método em consideração possui capacidade de desempenho consistente relativamente ao que o requisito impõe. Validação é também considerada para fornecer confirmação através da examinação e provisão de evidências objetivas de que os requisitos particulares de um uso específico são cumpridos ou **adequados ao propósito**. Um método deve ser validado sempre que uma alteração ao processo analítico ocorre e o laboratório necessita de demonstrar que os seus parâmetros de performance são adequados para o seu uso num problema analítico particular, isto é:

- um novo método foi desenvolvido;
- o método existente foi revisto;
- o método está a mudar com o tempo; (**method is changing with time**)
- o método é usado num laboratório diferente ou com analistas ou instrumentos diferentes;
- o método é equivalente a outro, por exemplo, a um método padronizado.

Para validar um método é obrigatório demonstrar os seguintes critérios de performance do método: especificidade / seletividade, precisão, veracidade, linearidade e intervalo de linearidade, limite de deteção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez (**Robustness and ruggedness**). Como apresentado na Tabela 10, nem todos os parâmetros de performance do método são necessários para qualquer procedimento de validação. Estes dependem do propósito da análise: testes de identificação, testes de impurezas, testes de ensaio.

Tabela 10. Critérios de performance do método dependentes do propósito analítico.

Parâmetro de performance do método	Teste de indentificação	Teste de impureza		Teste de ensaio
		Teste de impureza limite	Teste quantitativo de impureza	
seletividade e especificidade	+	+	+	+
veracidade	-	-*	+	+
precisão	-*	-	+	+
linearidade e intervalo de linearidade	-*	-	+	+
limite de deteção (LD)	-*	+	-	-
limite de quantificação (LQ)	-*	-	+	-
Robustez (Robustness and ruggedness)	+	+	+	+

* pode ser realizado

Seletividade e especificidade são medidas que avaliam a confiança das medições na presença de interferentes. Um método é seletivo se produz uma resposta para um grupo de entidades químicas ou analíticos que podem ser distinguíveis entre si, enquanto que, o método é específico se origina uma única resposta para um único analítico.

Exatidão fornece o grau de amplitude dos dados e é estudada como dois componentes: *precisão* e *veracidade*.

Veracidade de um método é uma medida de quanto é que a média de um conjunto de resultados (obtidos pela aplicação do método) se aproxima do valor real. Dado que o valor real nem sempre é conhecido, este é substituído por um valor de referência e estimado pelo valor médio. A avaliação prática da veracidade baseia-se na comparação da média dos resultados de um método

com os valores de referência, sendo o teste de recuperação (R) o mais utilizado. Este baseia-se na adição de uma quantidade conhecida do composto de interesse estável e puro (valor de referência) a uma amostra em branco e realizar o cálculo com a equação 1.

Precisão de um método é uma medida de o quão próximos os resultados estão uns dos outros. Pode ser avaliada como: repetibilidade intra-laboratorial; precisão de reprodutibilidade intra-laboratorial (ou precisão intermediária); precisão de reprodutibilidade inter-laboratorial. Usualmente, a precisão é expressa por medidas como desvio padrão (s ou SD), dispersão (s^2), ou desvio padrão relativo (RSD%), de acordo com as equações 2-3:

$$R = \frac{C_F - C_I}{C_A} 100 \quad 1.$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{X} - X_i)^2}{n-1}} \quad 2.$$

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad 3.$$

onde: C_F é a concentração final do branco pós-adição; C_I é a concentração inicial da do branco pré-adição; C_A é a concentração de solução adicionada à ao branco; X_i are discrete measured values, \bar{X} é a média dos valores de n medições repetidas.

Linearidade e intervalo de linearidade fornece informação relativa à habilidade to método produzir sinais de resposta (propriedade mensurável) numa relação linear com a concentração (ou quantidade) do analito. Na extremidade inferior do intervalo de concentração os fatores limitantes são os valores do limite de deteção e/ou quantificação.

Limite de deteção (LD) representa o menor valor de conteúdo de analito que pode ser determinado com uma certeza estatística razoável. Este fornece uma informação “qualitativa”.

Limite de quantificação (LQ) representa o menor valor de conteúdo de um analito que pode ser determinado com precisão aceitável nas condições estabelecidas no teste. Este fornece uma informação “quantitativa”.

Robustez (Robustness and ruggedness) é uma medida da habilidade do método produzir resultados não afectados por variações relacionadas com os parâmetros do método (**robustness**) ou condições de operação (**ruggedness**).

3.4.2. ESTIMATIVA DA INCERTEZA

De acordo com o Guia EURACHEM (2012), incerteza (I) é um parâmetro associado com o resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que podem razoavelmente ser atribuídas ao mensurado (resultado). A incerteza pode ser expressa como desvio padrão relativo (RSD) e intervalo de confiança.

A estimativa da incerteza **é necessária** quando:

- um novo procedimento/método é introduzido no laboratório;
- um importante parâmetro do processo é modificado (equipamento, tipo de amostra);
- um novo método é validado;
- **não é necessário** para análises de rotina.

A **Tabela 11** apresenta as fontes de incerteza que surgem tanto da amostragem como das medições analíticas.

Tabela 11. Fontes e estimativa da incerteza

Contribuições para a incerteza	Símbolo	Fontes de incerteza
Contribuição da amostragem	I_A	amostragem, transporte, armazenamento
Contribuição das medições	I_M	equipamento, pureza de reagentes, condições de medição
Incerteza total	I	$I = I_A + I_M$

Existem dois passos a seguir de modo a estimar a incerteza:

1. identificação das fontes de incerteza e construção do diagrama de Ishikawa;
2. cálculo da incerteza tendo em consideração as fontes que têm uma contribuição mais relevante para a incerteza total.

O diagrama de Ishikawa pode ser construído separadamente considerando as fontes de incerteza da amostragem, das medições e das soluções padrão

REFERÊNCIAS

1. Chirila, E., Draghici, C., Analytical Approaches for Sampling and Sample Preparation for Pesticides Analysis in Environmental, Food and Biological Samples, in Simeonov, L.I., Macaev, F.Z., Simeonova, B.G. (Eds.), Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2013, 37-54.
2. Chirila, E., Draghici, C., Analytical Approaches for Sampling and Sample Preparation for Heavy Metals Analysis in Biological Materials, in Simeonov, L.I., Kochubovski, M.V., Simeonova, B.G. (Eds.), Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2011, 129-143.
3. Chunlong C.Z., Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis, John Wiley & Sons, Hoboken NJ, USA, 2007.
4. Colbeck, I., Draghici, C., Perniu, D., (Eds), Environmental Pollution and Monitoring, in EnvEdu series, ISSN 1584-0506, ISBN 973-27-1169-8, Romanian Academy Press, Bucharest, 2003.
5. Draghici, C., Chirila, E., Complex Characterization of Polluted Samples, in L. Simeonov, M. Hassanien (Eds.), Exposure and Risk Assessment of Chemical Pollution – Contemporary Methodology, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2009, 165-180.
6. Draghici, C., Galan, E., Stoian, M.G., Method Validation for Pesticides Identification, in Simeonov, L.I., Kochubovski, M.V., Simeonova, B. G. (Eds.), Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2013, 365-380.
7. Draghici, C., Jelescu, C., Dima, C., Coman, Gh., Chirila, E., Heavy Metals Determination in Environmental and Biological Samples, in Simeonov, L.I., Kochubovski, M.V., Simeonova, B. G. (Eds.), Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2011, 145-158.
8. Patnaik P., Handbook of Environmental Analysis, 2nd Edition, Chemical Pollutants in Air, Water, Soil, and Soil Wastes, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton FL, USA, 2010.
9. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance, Trends in Analytical Chemistry, 23(8), 2004, 535- 552.
10. ISO/IEC 17025:1999; ISO/IEC 17025:2005; ISO/IEC 17025:2017.
11. Terminology in Analytical Measurement: Introduction to VIM 3.
12. EURACHEM Guide to Quality in Analytical Chemistry - 3rd edition (2016).

13. EURACHEM Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: Second edition (2014).
14. EURACHEM Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 3rd Edition (2012).
15. EURACHEM Guide, Measurement uncertainty arising from sampling (2007).
16. EURACHEM Guide, Traceability in Chemical Measurement (2003).
17. EURACHEM Guide, The Selection and use of Reference Materials (2002).
18. EURACHEM Guide, Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes by Laboratories (2011).
19. <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>
20. <https://www.eea.europa.eu/>
21. <https://ec.europa.eu/jrc/en/research-topic/environmental-monitoring>



**VNiVERSIDAD
DSALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA



South-Eastern Finland
University of Applied Sciences



**Universitatea
TRANSILVANIA
din Braşov**



**UNIVERZITA
KARLOVA**



ИКИТ

<https://toxoeer.com>

Project coordinator: Ana I. Morales
Headquarters office in Salamanca.
Dept. Building, Campus Miguel de Unamuno, 37007.
Contact Phone: +34 663 056 665