

Técnicas Analíticas de Laboratório

CURSOS DE FORMAÇÃO

CIIMAR – UNIVERSIDADE DO PORTO

Manual do Curso



Técnicas Analíticas de Laboratório

CURSOS DE FORMAÇÃO
CIIMAR – UNIVERSIDADE DO PORTO

Hugo Ribeiro

Julho de 2015

Técnicas Analíticas de Laboratório

FORMADORES:

Cristina Marisa Almeida

Paula Salgado

João Santos

Hugo Ribeiro

ORGANIZAÇÃO DO CURSO:

Cristina Marisa Almeida

Ana Paula Mucha

Sandra Ramos

Catarina Magalhães

Mafalda Batista



Técnicas Analíticas de Laboratório

► FUNCIONAMENTO E LOGISTICA DO CURSO:

- Cada aluno - 32 horas de formação;
- Obtenção de certificado – participação 24 horas (75%) de formação;
- Alunos divididos por quatro turnos - aulas práticas;
- Cada turnos terá um dia livre.

Técnicas Analíticas de Laboratório

► PROGRAMA DO CURSO:

- Módulo 1 - Introdução à análise laboratorial
- Modulo 2 - Técnicas analíticas para análises de nutrientes em águas
- Modulo 3 - Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes.

► OBJECTIVO:

- Enquadramento de metodologias analíticas necessárias para a avaliação do estado ambiental dos ecossistemas marinhos no âmbito da Diretiva-Quadro Estratégia Marinha (DQEM).

Técnicas Analíticas de Laboratório

Módulo 1

Introdução à análise laboratorial

Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► BOAS PRÁTICAS DE TRABALHO DE LABORATÓRIO:

1. Não comer, beber, mascar pastilhas, tomar medicamentos ou colocar cosméticos.



2. Não correr nem fazer movimentos bruscos.



3. Utilizar bata e óculos de protecção.



4. Não provar, cheirar ou tocar em produtos químicos.



5. Prender o cabelo comprido e não usar anéis.



6. Lavar as mãos no final do trabalho.



Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► BOAS PRÁTICAS DE TRABALHO DE LABORATÓRIO:



Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► BOAS PRÁTICAS DE TRABALHO DE LABORATÓRIO:



Etiquetar frascos com:

Nome do composto:

Concentração:

Data:

Validade:

Responsável:

H_2SO_4

3 M

27/07/2015

6 meses

Hugo

Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► A ANÁLISE QUÍMICA:

- **Qualitativa** - estudo de métodos para determinação de propriedades que indiquem a presença de um analito numa mistura ou solução;
- **Quantitativa** - estudo de métodos para separação e determinação da quantidade de um analito numa mistura ou solução.

Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► SELEÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO:

1. O analito a analisar
2. Quantidade de amostra disponível
3. Concentração do analito
4. Exatidão e precisão do método
5. Seletividade
6. Propriedades físicas e químicas da amostra
7. Número de amostras a analisar
8. Facilidade, rapidez e custo da análise

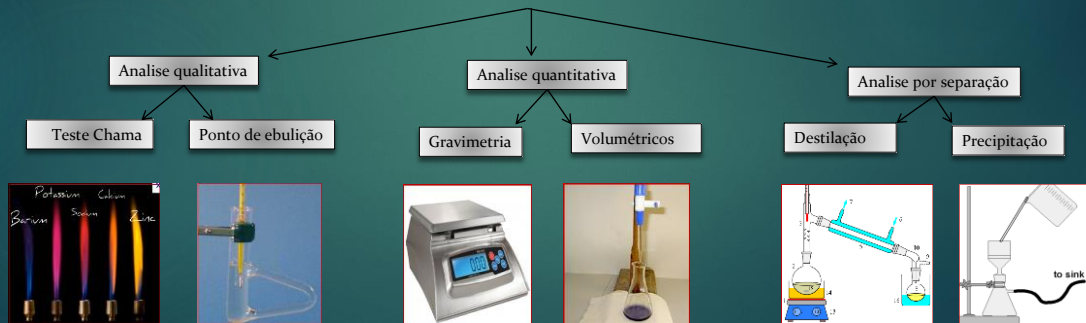
Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► OS MÉTODOS ANALÍTICOS:

► **CLASSICOS OU QUÍMICOS** – análise fundamenta-se em determinados tipos de reações químicas:



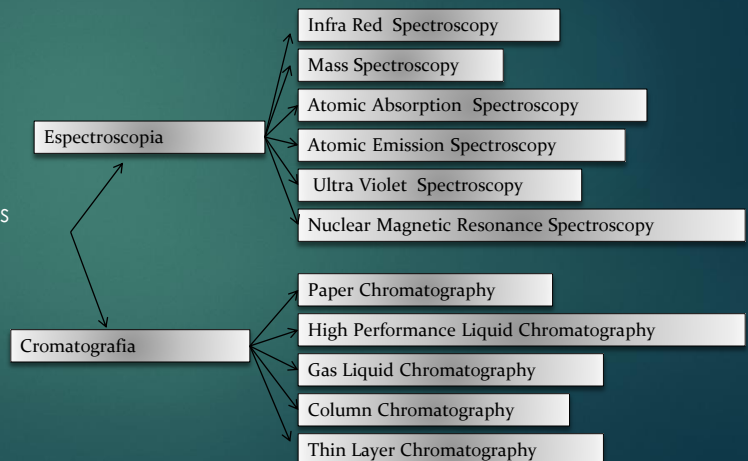
Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

► OS MÉTODOS ANALÍTICOS:

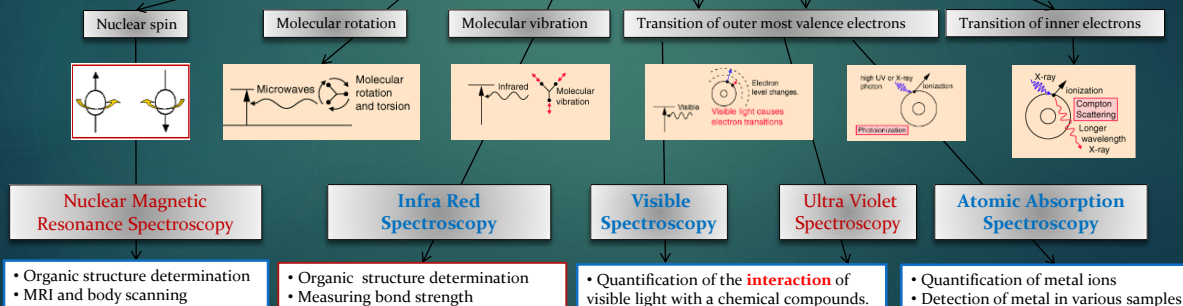
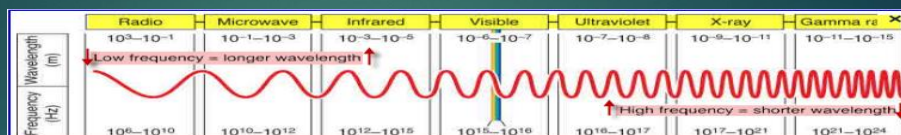
INSTRUMENTAIS - análises efetuadas por métodos instrumentais:



Técnicas Analíticas de Laboratório

Introdução à análise laboratorial

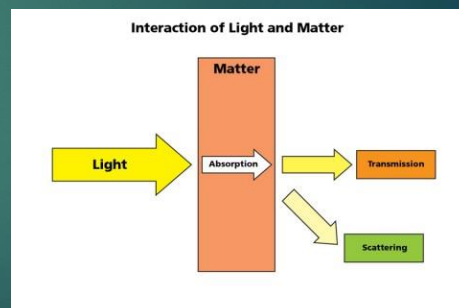
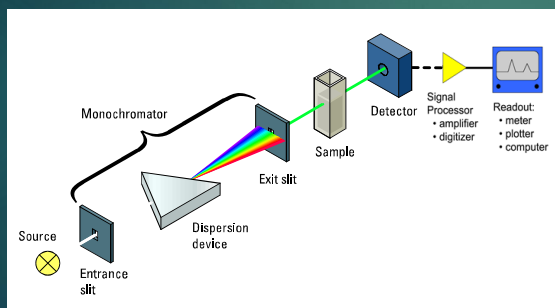
Radiação eletromagnética



Técnicas Analíticas de Laboratório

Introdução à análise laboratorial

Espectroscopia



Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

Espectroscopia



Análise
qualitativa

Análise
quantitativa



Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

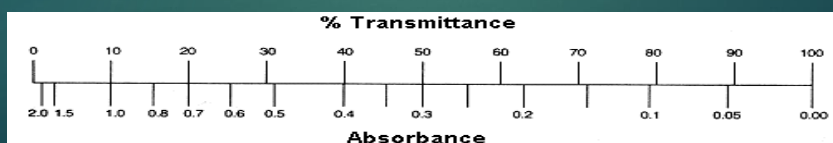
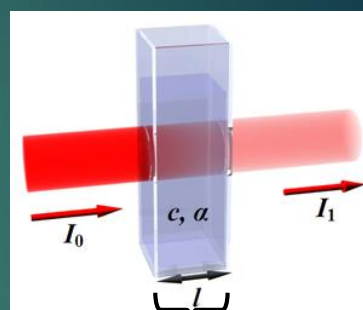
Spectroscopy

- Transmitância :

$$T = I/I_0$$

- Absorvância:

$$A = -\log_{10} T = \log_{10} I_0/I$$



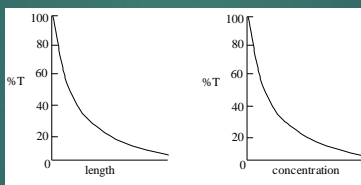
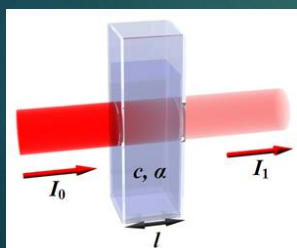
Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

Lei de BEER

Lei Beer-Bouguer -Lambert



$$T = \frac{P_o}{P_l} = e^{-\alpha c l}$$

$$A = -\ln\left(\frac{P_o}{P_l}\right) = \alpha c l$$

$$A = \epsilon b c$$

ϵ é a absorptividade molar com unidades de $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b é o percurso ótico em cm

c é a concentração do composto em solução expresso em mol L^{-1}

Técnicas Analíticas de Laboratório

1

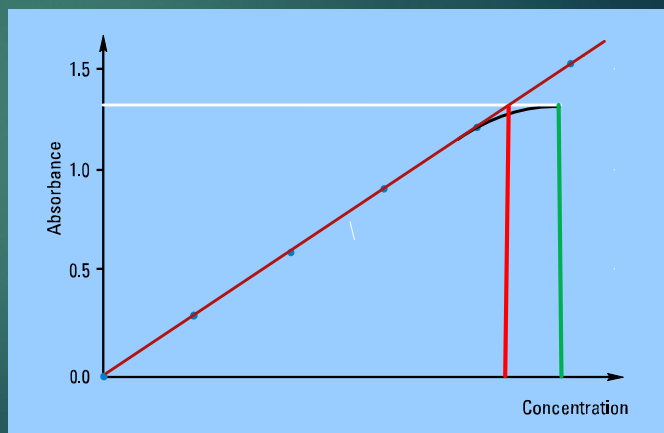
Introdução à análise laboratorial

Lei de BEER

Lei Beer-Bouguer -Lambert

VALIDADE DA LEI

DESVIO NEGATIVO



Técnicas Analíticas de Laboratório

1

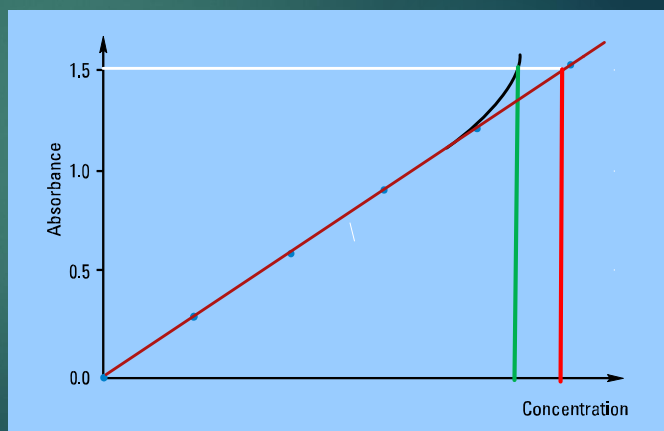
Introdução à análise laboratorial

Lei de BEER

Lei Beer-Bouguer -Lambert

VALIDADE DA LEI

DESVIO POSITIVO



Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

Cromatografia

❖ Vários métodos cromatográficos :

Paper Chromatography

Thin Layer Chromatography (TLC)

Liquid Chromatography (LC)

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC)

Ion Chromatography

Gas Chromatography (GC)

Gás de arraste

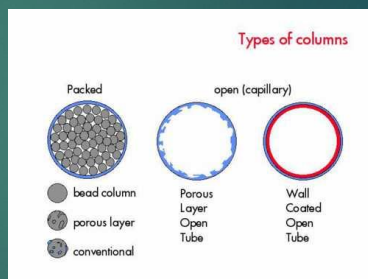
- ▶ H_2 , N_2 , He, Ar
- ▶ Função: transporte da amostra
- ▶ Propriedades: inerte, compatível com o detetor, puro

Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

Cromatografia

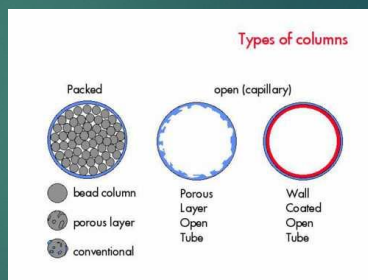


Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

Cromatografia



Técnicas Analíticas de Laboratório

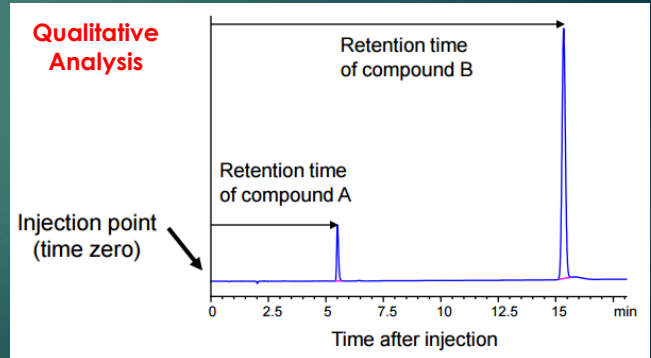
1

Introdução à análise laboratorial

Cromatografia

Tempo de retenção:

- ❖ Depois de injetada a amostra, é o tempo necessário para um soluto individual atingir o detetor;
- ✓ Dependendo do tempo de retenção, podemos utilizar como análise qualitativa



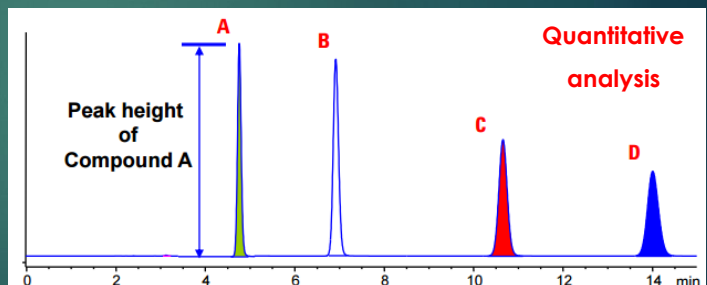
Técnicas Analíticas de Laboratório

1

Introdução à análise laboratorial

Cromatografia

- ❖ Dois modos de quantificar um composto na amostra:
 - ❖ Determinação da altura do pico tendo em conta a linha de base;
 - ❖ Determinação da área do pico.



Técnicas Analíticas de Laboratório

Módulo 2

Técnicas analíticas para análises de água

Técnicas Analíticas de Laboratório

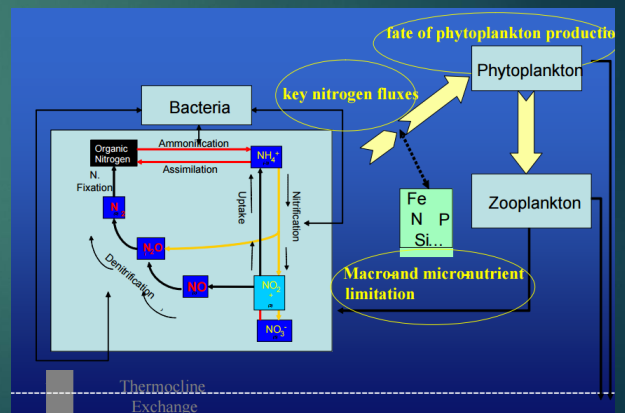
2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► MICRONUTRIENTES:

Ciclos Biogeoquímicos

Elemento	Respiração Aeróbia	Respiração Anaeróbia
C	CO ₂	CH ₄
N	NO ₃ ⁻	NH ₃
S	SO ₄ ²⁻	H ₂ S
P	PO ₄ ³⁻	PH ₃



Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► PREPARAÇÃO DE MATERIAL:

- Passar o material por água desionizada (condutividade $< 0.1 \text{ mS cm}^{-1}$ - colocar num recipiente com HCl a 10%, - período nunca inferior a 10 h.
- Retirar material e lavar muito bem com água desionizada até remover por completo todo o ácido.
- Colocar o material a secar numa estufa ($< 40^\circ\text{C}$). Depois de seco, empacotar o material em sacos de plástico.

Nota: Não colocar no ácido qualquer material de metal.



Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:

- ❖ filtrar amostra com filtro de acetato de celulose $0.45 \mu\text{m}$ ou $0.2 \mu\text{m}$ - seringa acoplada a suporte de filtros – ou - bomba de vácuo, a baixa pressão
- ❖ guardar amostra de água filtrada em frasco de plástico - polietileno de alta densidade (HDPE);
- ❖ Vidro - escorrência de silicatos do vidro para a água; por outro lado, os fosfatos podem adsorver às paredes de frascos de polietileno e outros materiais;
- ❖ o ideal é analisar a amostra nas primeiras 8 horas após a recolha, sem adição de fixadores ou congelação.



Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► EM CASO DE NECESSIDADE DE CONGELAR AS AMOSTRAS:

- não adicionar fixador e congelar imediatamente a amostra (-20°C);
- congelação é bom método para preservação de amostras destinadas a análise de nitratos;
- congelação não serve para preservação de amostras destinadas à análise de fosfatos;
- descongelação das amostras à temperatura ambiente é melhor para a dissolução dos cristais de silicatos, mas deteriora os fosfatos; pelo contrário, descongelação em água quente provoca menor deterioração dos fosfatos;



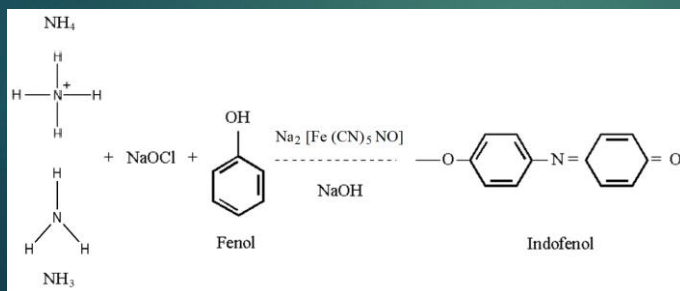
Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► AMÓNIA

Para a quantificação da concentração de amónia (NH_4^+ e NH_3) nas amostras de água é usado o método de Koroleff, descrito em Grasshoff et al., 1983.



A reação demora cerca de 6 horas até se completar e a incubação é feita à temperatura ambiente, no escuro.



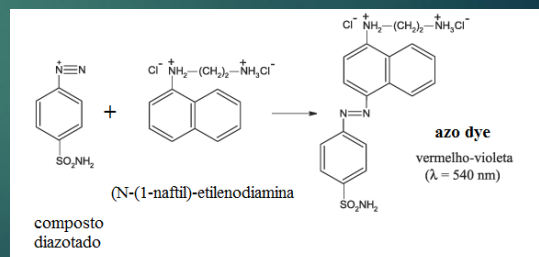
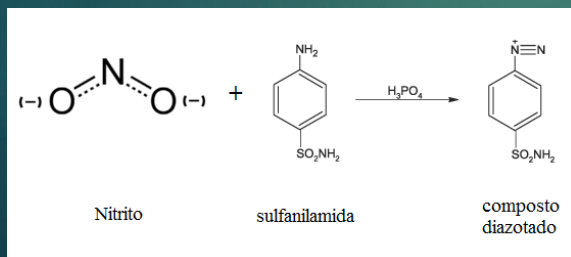
Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de água

► NITRITOS

O método para a determinação dos nitritos encontra-se descrito em Grasshoff et al. (1983).



Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► NITRATOS

- ❖ Este baseia-se na redução de nitratos a nitritos e subsequente determinação dos nitritos formados (Jones 1984).
- ❖ A redução é desencadeada com cádmio "esponjoso", na presença de uma solução tampão de cloreto de amónio.



A redução depende:

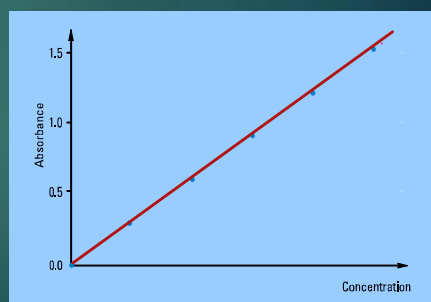
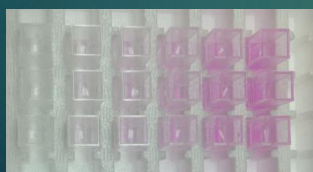
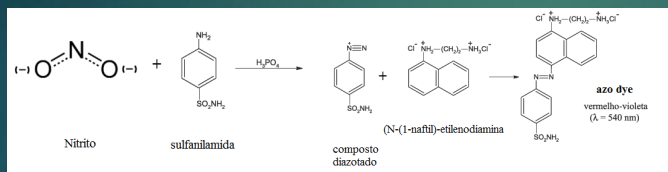
- Metal;
- pH;
- atividade da superfície metálica.

Técnicas Analíticas de Laboratório

2

Técnicas laboratoriais para análise de nutrientes inorgânicos em água

► NITRATOS



Técnicas Analíticas de Laboratório

Módulo 3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► Poluição Ambiental

- **Contaminante:** qualquer substância que ocorra no meio ambiente em níveis mais elevados que os normais (naturais), entretanto sem ainda causar algum efeito danoso aos recursos ambientais.

- **Poluente:** qualquer substância que ocorra no meio ambiente em níveis mais elevados do que os normais (naturais), a ponto de afetar de forma indesejável/danosa a qualidade e a utilidade de um ou mais recursos ambientais.



Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► Exemplos de Poluentes

- Aldrin/Dieldrin
- Benzo(a)pyrene
- Cadmium
- Chlordane
- DDT, DDD, DDE
- Dicofof
- Dioxins (TCDD) & Furans
- Endrin
- Endosulfan
- Hexachlorobenzene
- Heptachlor
- alkyl-lead
- Lindane



- Pendimethalin
- Pentabromo diphenyl ether
- Pentachloronitrobenzene
- Polybrominated Hydrocarbons
- Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)
- Tin (organotins)
- Toxaphene
- Trifluralin
- Mercury
- Methoxychlor
- Mirex
- Octachlorostyrene
- Polychlorinated biophenyl's (PCBs)

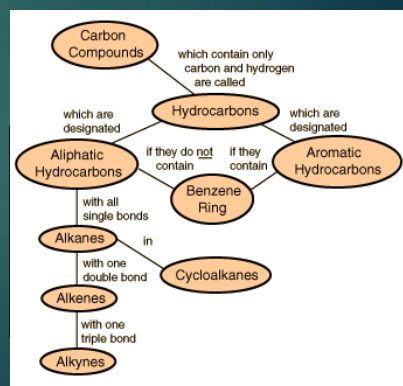
Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

- ❖ A determinação de poluentes orgânicos em água consiste essencialmente de três passos: colheita, preparação e análise da amostra.
- ❖ Além da extracção é frequentemente necessário um processo de limpeza, dado que alguns interferentes são coextractados com os analitos de interesse.

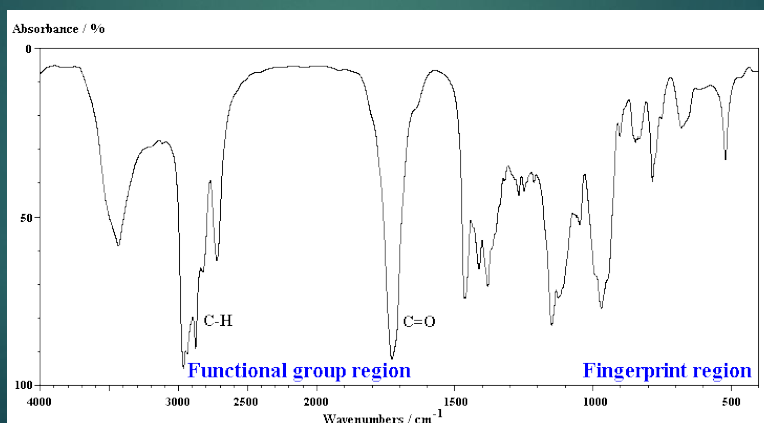


Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

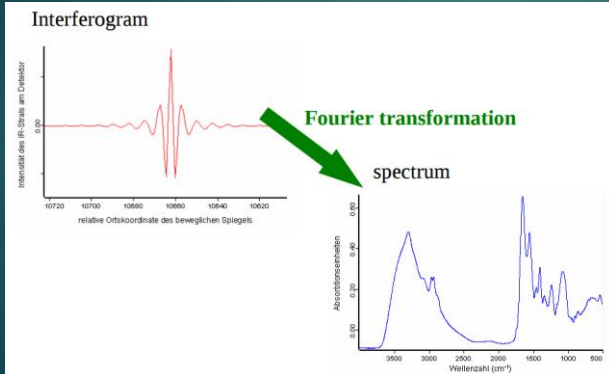


Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► ESPECTRÓMETRO FTIR OBTÉM UM ESPECTRO NO INFRAVERMELHO POR:



Detected intensity

for a monochromatic signal: $I(p) \sim |1 + \cos(2\pi p \tilde{\nu})|$
 path difference

Detected intensity

the modulated part for a polychromatic signal:

$$I(p) = \int B(\tilde{\nu}) \cos(2\pi p \tilde{\nu}) d\tilde{\nu}$$

spectrum

Fourier transformation

$$B(\tilde{\nu}) = \int I(p) \cos(2\pi p \tilde{\nu}) dp$$

Técnicas Analíticas de Laboratório

3

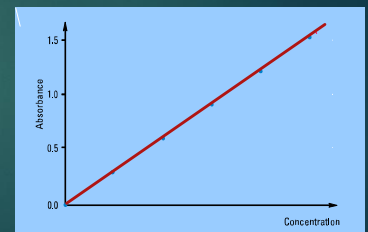
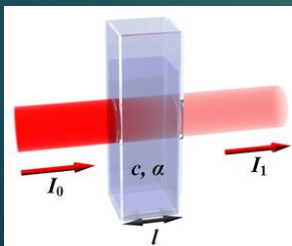
Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Lei de BEER

$$A = \epsilon bc$$

ϵ é a absorvidade molar com unidades de $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$
 b é o percurso ótico em cm
 c é a concentração do composto em solução expresso em mol L^{-1}



Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

- ❖ Espectro representa os níveis de energia quantificada associados com as vibrações dos átomos no interior da molécula.
- ❖ Aumento da amplitude da vibração molecular corresponde à diminuição do feixe, consequentemente, da intensidade.

Symmetrical stretching	Antisymmetrical stretching	Scissoring
Rocking	Wagging	Twisting

Técnicas Analíticas de Laboratório

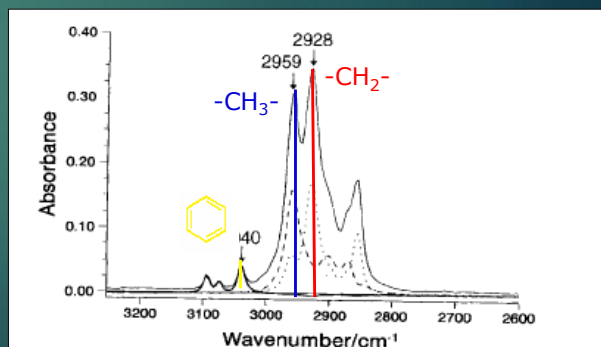
3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► CONCENTRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

Normalmente, espectro IR de soluções contendo hidrocarbonetos apresentam bandas características:

- ✓ Ligações C-H : 2853 cm^{-1}
- ✓ Ligações C-H de CH_2 : 2926 cm^{-1}
- ✓ Ligações C-H de CH_3 : 2962 cm^{-1}
- ✓ Ligações C-H de aromáticos: 3040 cm^{-1}



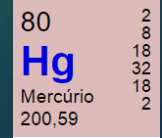
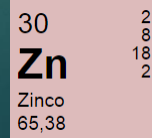
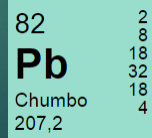
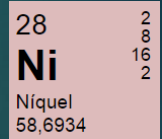
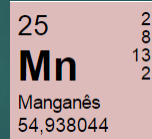
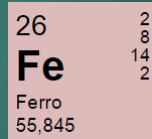
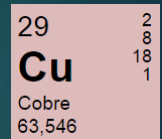
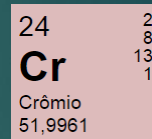
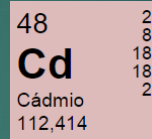
Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► TEOR DE METAIS

- ❖ A determinação de metais em água e sedimentos consiste essencialmente de três passos: colheita, preparação e análise da amostra.



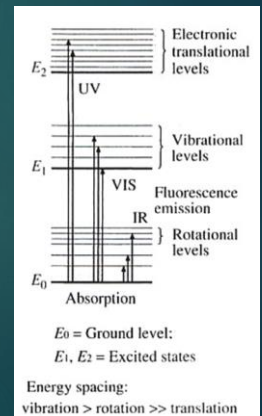
Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► TEOR DE METAIS

- Métodos de espectroscopia na zona do visível, violeta e infravermelho são muito utilizada em espécies moleculares;
- A espectroscopia de absorção atômica é muito utilizada na determinação de cátions metálicos;



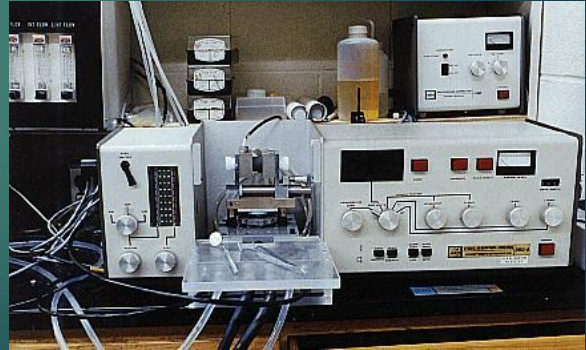
Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► TEOR DE METAIS

Espectroscopia de absorção atômica



Técnicas Analíticas de Laboratório

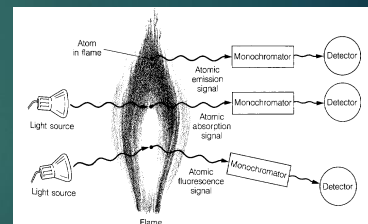
3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

► TEOR DE METAIS

Espectroscopia de absorção atômica - Chama

- ❖ A amostra é atomizada na chama, através da qual passa radiação com comprimento de onda adequado a cada elemento a analisar (fonte - lâmpada de cátodo oco).
- ❖ A quantidade de radiação absorvida é uma medida quantitativa da concentração do elemento a ser analisado..



Técnicas Analíticas de Laboratório

3

Técnicas laboratoriais para análise de contaminantes

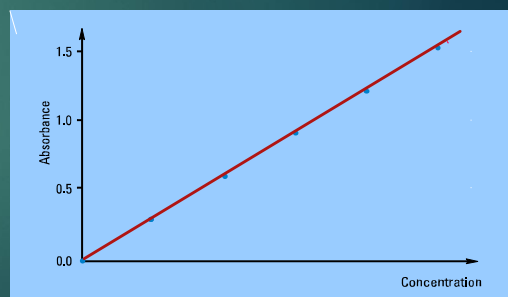
► TEOR DE METAIS

Espectroscopia de absorção atômica - Chama

- Concentração de um elemento presente na amostra é valido pela Lei de Beer:

$$A = kIC$$

Onde A = absorbância, C = concentração, l = espaço ótico da chama, k = coeficiente único to cada elemento



Técnicas Analíticas de Laboratório

CURSOS DE FORMAÇÃO

CIIMAR – UNIVERSIDADE DO PORTO

Obrigado pela vossa atenção

Métodos para Análise de Nutrientes Inorgânicos (volumes pequenos)

Laboratório ECOBIOTEC
CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Julho de 2015
(actualizado)

Lavagem do Material

Todo o material usado para as análises de nutrientes passa pelos seguintes passos de lavagem:

- Limpar com álcool as marcações ou retirar fitas autocolantes que estejam a etiquetar o material.
- Colocar o material de molho em detergente ausente de fosfatos ou amónia.
- Passar o material por água destilada (preferencialmente) e colocar num recipiente com HCL a 10%, durante um período nunca inferior a 10 h.
- Retirar material do ácido e lavar muito bem com água destilada até remover por completo todo o ácido (usar tiras de pH).
- Pôr o material a secar.
- Empacotar o material em sacos de plástico.

Nota:

Não colocar no ácido qualquer material de metal.

Preparação das amostras de água para análise de nutrientes

- ✓ todo o material a usar deve ser descontaminado com ácido;
- ✓ filtrar amostra de água por filtro de acetato de celulose 0.45 μm ou 0.2 μm , com seringa acoplada a suporte de filtros;
 - a filtração pode ser feita através de bomba de vácuo, a baixa pressão
- ✓ guardar amostra de água filtrada em frasco de plástico; melhor é polietileno de alta densidade (HDPE);
- ✓ não se deve guardar a amostra de água em vidro, devido à escorrência de silicatos do vidro para a água; por outro lado, os fosfatos podem adsorver às paredes de frascos de polietileno e outros materiais;
- ✓ adicionar o fixador (cloreto de mercúrio) ou congelar;
- ✓ o ideal é analisar a amostra nas primeiras 8 horas após a recolha, sem adição de fixadores ou congelação.

Congelação

- ✓ não adicionar fixador e congelar imediatamente a amostra (-20°C);
- ✓ congelação é bom método para preservação de amostras destinadas a análise de nitratos;
- ✓ congelação pode ser usada para preservar amostras para análise de silicatos, se a sua concentração for inferior a 30-40 μM ; a amostra tem que descongelar bem (mais de 24 horas) para dissolver a totalidade dos cristais de Si que se formam; concentração de Si diminui com o tempo de congelação;
- ✓ congelação não serve para preservação de amostras destinadas à análise de fosfatos;
- ✓ descongelação das amostras à temperatura ambiente é melhor para a dissolução dos cristais de silicatos, mas deteriora os fosfatos; pelo contrário, descongelação em água quente provoca menor deterioração dos fosfatos;
- ✓ amostras ricas em cálcio não devem ser congeladas para evitar a precipitação do fosfato.

Amónia

Para a quantificação da concentração de amónia (NH_4^+ e NH_3) nas amostras de água é usado o método de Koroleff (*in* Grasshoff *et al.*, 1983). O presente método baseia-se no facto da amónia, em soluções moderadamente alcalinas, reagir com o hipoclorito formando o composto monocloramina. Este, por sua vez, na presença de um catalisador (nitroprussiato), fenol e hipoclorito em excesso, dá origem a um complexo de cor azul intensa (indofenol). A reacção demora cerca de 6 horas até se completar e a incubação é feita à temperatura ambiente, no escuro.

A formação de monocloramina requer um pH entre 8 - 11.5. A um pH superior a 9.6 pode ocorrer precipitação dos iões Mg e do Ca, sendo usado citrato para os manter em solução.

Quando não é adicionado citrato existe a precipitação de hidróxido de magnésio presente na água salgada. Este absorve a matéria particulada e os ácidos húmicos, eliminando possíveis interferências destes últimos, tornando-se este método conveniente na análise de águas salobras (Grasshoff *et al.*, 1983). Quando as amostras apresentavam uma salinidade inferior a 5 adiciona-se uma solução de magnésio, de modo a haver um excesso de iões Mg e um pH constante 10. O precipitado formado deposita-se rapidamente no fundo do tubo, ficando um sobrenadante opticamente límpido, cuja absorvância é lida por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm.

É necessário um total de 15 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 μm ou 0.45 μm) e armazenada no congelador ou imediatamente processada.

Referência

Koroleff, 1983. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (Ed.s). Methods of Seawater Analysis. 2nd ed.. Verlag Chemie, Weinheim.

Amostra

É necessário um total de 1.5 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 ou 0.45 μm) e armazenada no congelador, ou imediatamente processada.

Reagentes

Reagente de Magnésio

- Dissolver 45 g de Cloreto de Sódio (NaCl) e 20 g de Sulfato de Magnésio hepta-hidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) em 200 ml de água destilada (AD).
- Adicionar umas gotas de NaOH a 1M até começar a formar um precipitado.
- Adicionar um bocado de vidro e pôr a solução a ferver (para eliminar a amónia) até termos uma quantidade inferior a 200 ml.
- Deixar a solução arrefecer e perfazer os 200 ml com AD.

É armazenado num frasco de vidro ou plástico à temperatura ambiente no escuro.

Reagente de Fenol e Nitroprussiato

- Dissolver 3.8 g de Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) em 100 ml de AD. Pesar o reagente no recipiente onde se vai fazer a solução e depois adicionar a AD.
- Dissolver 0.04 g de Nitroprussiato ($\text{Na}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) na solução anterior.

Este reagente deve de ser feito com cuidado visto que o fenol é muito tóxico. É armazenado num frasco de vidro escuro no frigorífico. Estável durante meses.

Reagente de Hipoclorito

- Diluir 0.25 g de Trione (correspondente a 750 mg de Cl^-) em 100 ml de NaOH a 0.5 N

É armazenado num frasco de vidro escuro no frigorífico. Estável durante algumas semanas.

Reagentes Comuns

NaOH a 1N - Dissolver 40 g de NaOH num litro de AD.

NaOH a 0.5 N - Dissolver 20 g de NaOH num litro de AD.

H₂SO₄ 1 N- Diluir 28 ml de H₂SO₄ num litro de AD.

Solução Standard Primário (100 mM)

- Secar durante a noite Cloreto de Amónia (NH₄Cl) a 50 °C (até peso constante).
- Dissolver 0.5349 g do reagente anterior em 100 ml de AD.
- Preservar adicionando umas gotas de clorofórmio.

É armazenado num frasco de vidro no frigorífico sendo estável durante alguns meses.

Solução Standard Secundário (250 µM)

- Diluir 250 µl de solução Standard Primário em AD e ajustar até aos 100 ml.
- Este reagente é feito sempre de fresco.

Procedimento

• Soluções padrão

A recta padrão deve de ser feita sempre que são processadas as amostras. As concentrações dever-se-ão ajustar à concentração de nutrientes nas nossas amostras.

Para um volume total de 1 ml:

PADRÕES	P_{250 µM} (µL)	H₂O (µL)
0 µM	0	1000
5 µM	20	980
10 µM	40	960
20 µM	80	920
30 µM	120	880

• Amostras

1. Saber qual a salinidade das amostras.
2. Colocar 1 ml ou fazer diluição (ver tabela abaixo) de amostra em cada tubo, em triplicado.

Diluições (amostras):

DIL	H ₂ O (μL)	Amostra (μL)
2X	500	500
4X	750	250
5X	800	200
10X	900	100

3. Se a salinidade for inferior a 5, adicionar 30 μl do Reagente de Magnésio e agitar no vortex.

- **Determinação da amónia** (para padrões e amostras)

1. Adicional 50 μl do reagente Fenol/Nitroprussiato (REAG 1), agitar no vortex.
2. Adicionar imediatamente 50 μl do reagente Hipoclorito (REAG 2), agitar no vortex e fechar os eppendorfs.
3. Incubar à temperatura ambiente no escuro durante um período de **6 - 30h**.
4. Após a incubação centrifugar as amostras, se necessário (pode haver formação de precipitado; pipetar só o sobrenadante para as cuvettes).
5. As amostras são lidas ao espectrofotómetro a $\lambda = 630 \text{ nm}$. Retiramos a amostra com uma pipeta para evitar a ressuspensão do precipitado.

Cálculos

$$NH_4^+ + NH_3 = D \times (A_a - A_b)$$

em que, $NH_4^+ + NH_3$ - concentração de amónia e ião amónio, na água (μM),
D - declive da recta padrão,
 A_a - valor de absorvância obtido para a amostra,
 A_b - valor de absorvância obtido para a solução sem amónia,

Nitratos

A concentração de nitratos nas amostras é determinada a partir do método descrito por Jones (1984) e adaptado por Joye & Chambers (1993). Este baseia-se na redução de nitratos a nitritos e subsequente determinação dos nitritos formados, sem recurso a uma coluna de cádmio. A redução é desencadeada agitando as amostras com uma quantidade apropriada de cádmio esponjoso, na presença de uma solução tampão de cloreto de amónia. As vantagens deste método, em relação à coluna de cádmio, prendem-se com a diminuição do tempo de execução e do volume da amostra (5 ml). Problemas com a deterioração progressiva das colunas de cádmio na capacidade de redução, são também ultrapassados.

Após a redução de nitratos a nitritos, segue-se a metodologia usada para a determinação dos nitritos.

É necessário um total de 15 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 μm ou 0.45 μm) e armazenada no congelador ou imediatamente processada.

Referências

Jones, M. N. (1984). Nitrate reduction by shaking with cadmium: alternative to cadmium columns. Water Research 18: 643-646.

Joye, S. B. & Chambers, R. M. (1993). Nitrogen exchange between microvegetated intertidal sediments and the overlying water column. Estuarine Research Federation Annual Meeting. Hilton Head, Sc., Published Abstract. 58.

Amostra

É necessário um total de 1.5 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 ou 0.45 μm) e armazenada no congelador ou imediatamente processada.

Reagentes

Reagente Colorido

- Diluir 50 ml de Ácido Fosfórico concentrado (H_3PO_4 , 80%) em 400 ml de AD (primeiro a água depois o ácido).
- Adicionar à solução anterior 5 g de Sulfanilamida ($4\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) e dissolver.
- Adicionar à solução anterior 0.5 g de NNED (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) e dissolver.
- Perfazer 500 ml com AD

Solução Tampão de Cloreto de Amónia a 0.7 M

- Dissolver 37.4 g de NH_4Cl em aproximadamente 800 ml de AD.
- Adicionar aproximadamente 40 ml de NaOH a 1 N até termos um pH de 8.5.
- Perfazer 1 litro com AD.

Armazenado num frasco de plástico à temperatura ambiente.

Solução de Sulfato de Cádmio

- Dissolver 200 g de CdSO_4 ou $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ e perfazer num litro de AD.

Armazenado num frasco de vidro à temperatura ambiente.

Solução Ácido Clorídrico a 6 N

- Diluir 492 ml de HCl concentrado (37%) num litro de AD.

Armazenado num frasco de vidro à temperatura ambiente.

Solução Standard Primário (100 mM)

- Secar KNO_3 por várias horas a 60°C.
- Dissolver 1.011 g do reagente anterior em 100 ml de AD.

Armazenado num frasco de vidro no frigorífico.

Solução Standard Secundário (250 μM)

- Diluir 250 μl de solução Standard Primário em AD e ajustar até aos 100 ml.
- Este reagente é feito sempre de fresco.

Cádmio Esponjoso

- Encher aproximadamente 6 tubos de ensaio largos (2-3 cm de diâmetro) com solução Sulfato de Cádmio.
- Mergulhar uma barra de zinco em cada um dos tubos anteriores e deixar incubar aproximadamente 8 h (pode ficar de um dia para o outro).
- Após a incubação, remove-se o cádmio que se formou à superfície das barras com a ajuda de duas pinças e colocar num frasco de vidro.
- As barras de zinco são depois lavadas com HCl 6N e AD e secas antes de se guardar.
- Adicionar umas gotas de HCl 6N à solução de Sulfato de Cádmio que está no frasco onde colocamos o cádmio esponjoso e remover a solução.
- Cobrir o cádmio com uma solução de HCl a 6 N e agitar aproximadamente 3 minutos.
- Retirar o HCl e lavar várias vezes com AD até termos um pH de aproximadamente 5 (verificar com as tiras de pH).

Nota: O cádmio depois de usado pode ser novamente activado com HCl e posteriormente usado.

Procedimento

1. Colocar em todos os eppendorf (incluindo o dos padrões) 200 μl de solução de Cloreto de Amónia.
2. Adicionar a cada tubo uma quantidade de cádmio esponjoso de 0.10-0.20 g (ideal será ~0.15 g).

- **Soluções padrão**

A recta padrão deve de ser feita sempre que são processadas as amostras. As concentrações dever-se-ão ajustar à concentração de nutrientes nas nossas amostras.

Para um volume total de 1 ml:

PADRÕES	P₂₅₀ μM NO_3^- (μL)	H₂O (μL)
0 μM NO_3^-	0	1000
10 μM NO_3^-	40	960
20 μM NO_3^-	80	920
40 μM NO_3^-	160	840
80 μM NO_3^-	320	680
PADRÕES	P₂₅₀ μM NO_2^- (μL)	H₂O (μL)
40 μM NO_2^-	160	840

- **Amostras**

Colocar 1 ml ou fazer diluição (ver tabela abaixo) de amostra em cada tubo, em triplicado.

Diluições (amostras):

DIL	H₂O (μL)	Amostra (μL)
2X	500	500
4X	750	250
5X	800	200
10X	900	100

- **Determinação dos nitratos (para padrões e amostras)**

1. Incubar durante **1:30 h** à temperatura ambiente em agitação constante (100-200 rpm).
2. Após a redução, retira-se 1 ml da amostra para um tubo de centrífuga.
3. Adiciona-se 50 μl do reagente colorido dos nitritos. Agitar no vortex.

4. Após **10-30 minutos** de incubação as amostras são lidas ao espectrofotómetro a $\lambda = 540 \text{ nm}$.

Cálculos

$$NO_3^- = D \times (A_a - A_b) \times C \times NO_2^-$$

em que,

NO_3^- - concentração de nitratos dissolvidos na água (μM),

D - declive da recta padrão,

A_a - valor de absorvância obtido para a amostra,

A_b - valor de absorvância obtido para a solução sem nitratos,

NO_2^- - concentração de nitritos na solução,

C – 1,2 factor de diluição do reagente cloreto de amónia.

Nitritos

O método para a determinação dos nitritos encontra-se descrito em Grasshoff *et al.* (1983). Este método baseia-se na reacção do nitrito com uma amina aromática (sulfanilamida) dando origem a um composto diazotado que, por sua vez, se liga a uma segunda amina aromática (N-(1-naftil)-etilenodiamina) formando um complexo cor-de-rosa cuja intensidade é proporcional à quantidade de nitrito na solução.

No caso deste nutriente, verificou-se que a presença de ácidos húmicos na água estuarina do rio Douro causava interferência na sua detecção. Deste modo, com o objectivo de eliminar o seu efeito, as amostras são tratadas com uma solução de hidróxido de alumínio (American Public Health Association, 1971).

Após o processamento das amostras, a sua densidade óptica é medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 540 nm.

É necessário um total de 15 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 μm ou 0.45 μm) e armazenada no congelador ou imediatamente processada.

Referência

Grasshoff, 1983. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (Ed.s). Methods of Seawater Analysis. 2nd ed.. Verlag Chemie, Weinheim.

Amostra

É necessário um total de 1.5 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 ou 0.45 μm) e armazenada no congelador ou imediatamente processada.

Reagentes

Reagente Colorido

- Diluir 25 ml de Ácido Fosfórico concentrado (H_3PO_4 , 85%) em 200 ml de AD (primeiro a água depois o ácido).
- Adicionar à solução anterior 2.5 g de Sulfanilamida ($4\text{-NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$) e dissolver.
- Adicionar à solução anterior 0.25 g de NNED (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride) e dissolver.
- Perfazer 250 ml com AD

Armazenado num frasco de vidro escuro no frigorífico.

Solução Standard Primário (50 mM)

- Secar Nitrito de Sódio (NaNO_2) aproximadamente 1 h a 100 °C.
- Dissolver 0.345 g em 100 ml de AD.
- Adicionar algumas gotas de clorofórmio para conservar o reagente (1 ml por cada litro de solução).

Armazenado num frasco de vidro escuro no frigorífico.

Solução Standard Secundário (10 μM)

- Diluir 20 μl de reagente Standard Primário em AD e perfazer até aos 100 ml.
- Este reagente é feito sempre de fresco.

Solução Standard Secundário (250 μM) para os nitratos

- Diluir 125 μl de reagente Standard Primário em AD e perfazer até aos 25 ml.
- Este reagente é feito sempre de fresco.

Procedimento

- **Soluções padrão**

A recta padrão deve de ser feita sempre que são processadas as amostras. As concentrações dever-se-ão ajustar à concentração de nutrientes nas nossas amostras.

Para um volume total de 1 ml:

PADRÕES	P₁₀ μM (μL)	H₂O (μL)
0 μ M	0	1000
0.5 μ M	50	950
1 μ M	100	900
2 μ M	200	800
4 μ M	400	600
6 μ M	600	400

- **Amostras**

Colocar 1 ml ou fazer diluição (ver tabela abaixo) de amostra em cada tubo, em triplicado.

Diluições (amostras):

DIL	H₂O (μL)	Amostra (μL)
2X	500	500
4X	750	250
5X	800	200
10X	900	100

- **Determinação dos nitritos (para padrões e amostras)**

1. Adicionar 50 μ l de reagente colorido, agitar no vortex.

2. Após **10-30 minutos** de incubação as amostras são lidas ao espectrofotômetro a $\lambda = 540$ nm.

Cálculos

$$NO_2^- = D \times (A_a - A_b)$$

em que, NO_2^- - concentração de ortofosfatos dissolvidos na água em (μM),

D - declive da recta padrão,

A_a - valor de absorvância obtido para a amostra,

A_b - valor de absorvância obtido para a solução sem nitritos.

Fosfatos

Referência

Koroleff, 1983. Determination of phosphorus. In: Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (Ed.s). Methods of Seawater Analysis. 2nd ed.. Verlag Chemie, Weinheim.

Amostra

É necessário um total de 1.5 ml para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 ou 0.45 μm) e armazenada no congelador, ou imediatamente processada.

Reagentes

Ácido Sulfúrico a 4.5 M

- Adicionar, **lentamente** e em constante agitação 250 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado a 750 ml de AD (volume total = 1L).
- Deixar arrefecer a solução e perfazer um litro.

Este reagente deve de ser feito numa bacia de água fria para que o balão volumétrico não aqueça muito.

Armazenado num frasco de plástico à temperatura ambiente.

Ácido Ascórbico

- Dissolver 10 g de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) em 50 ml de H_2O .
- Diluir a solução anterior em 50 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 4.5 M.

Armazenado em pequenas quantidades no congelador em frascos de plástico. Descongelar com um dia de antecedência.

Reagente Misto

- Dissolver 12.5 g de Heptamolybdate de Amónia tetra-hidratado ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) em 125 ml de AD.
- Dissolver 0.5 g de Potassium Antimony Tartrate ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$), com ou sem $\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, em 20 ml de AD.

- Adicionar a solução de molibdato (primeira solução) a 350 ml de H_2SO_4 4.5 M, agitando cuidadosamente (nunca fazer o contrário, ou seja, adicionar o H_2SO_4 à solução de molibdato).
- Juntar a segunda solução (Potassium Antimony Tartrate) à solução anterior.

∴ 125 mL solução antimonil + 350 mL H_2SO_4 4,5 M + 20 mL solução antimonil

Armazenado em frasco de vidro no escuro

Solução Standard Primário (5 mM)

- Secar durante toda a noite KH_2PO_4 (potassium phosphate monobasic) a 110 °C.
- Dissolver 0.068 g em 100 ml de AD.
- Adicionar algumas gotas de clorofórmio para conservar o reagente (1 ml por cada litro de solução).

Armazenado num frasco de vidro no frigorífico.

Solução Standard Secundário (25 μM)

- Diluir 0.5 ml de reagente Standard Primário em 99.5 ml de AD.
- Este reagente é feito sempre de fresco.

Procedimento

• Soluções padrão

A recta padrão deve de ser feita sempre que são processadas as amostras. As concentrações dever-se-ão ajustar à concentração de nutrientes nas nossas amostras.

Para um volume total de 1 ml:

PADRÕES	$\text{P}_{25 \mu\text{M}}$ (μL)	H_2O (μL)
0 μM	0	1000
1 μM	40	960
2 μM	80	920
3 μM	120	880
5 μM	200	800

- **Amostras**

Colocar 1 ml ou fazer diluição (ver tabela abaixo) de amostra em cada tubo, em triplicado.

Diluições (amostras):

DIL	H ₂ O (µL)	Amostra (µL)
2X	500	500
4X	750	250
5X	800	200
10X	900	100

- **Determinação dos fosfatos** (para padrões e amostras)

1. Adicionar a cada tubo 25 µl de solução de Ácido Ascórbico.
2. Agitar no vortex.
3. Adicionar imediatamente 25 µl de reagente misto a cada um dos tubos.
4. Agitar no vortex.
5. Pôr as amostras a incubar durante **20' (10 - 30 minutos)** à temperatura ambiente no escuro.
6. Ler as amostras ao espectrofotômetro a $\lambda = 880 \text{ nm}$.

Cálculos

$$PO_4^{3-} = D \times (A_a - A_b)$$

em que, PO_4^{3-} - concentração de ortofosfatos dissolvidos na água em (µM),
D - declive da recta padrão,
 A_a - valor de absorvância obtido para a amostra,
 A_b - valor de absorvância obtido para a solução sem fosfatos.

Sílica

Para a determinação da sílica dissolvida na água (Si(OH)_4) é usado o método desenvolvido por Koroleff (*in* Grasshoff *et al.*, 1983). Este método baseia-se na formação do ácido silicomolíbico, de cor amarela, quando uma amostra de água é tratada com uma solução de molibdato de amónia. Visto a cor amarela desenvolvida ser pouco intensa, este composto deve ser reduzido, adicionando-se ácido ascórbico à solução, dando origem a uma cor azul forte. A adição de ácido oxálico imediatamente antes da solução redutora previne a redução de molibdato que esteja em excesso na solução, assim como elimina a interferência de fosfatos presentes na amostra. Após aproximadamente 30 minutos de incubação, é formado um composto de cor azul, sendo este estável durante seis horas.

A densidade óptica das amostras é determinada por espectrofotometria a 810 nm.

É necessário um total de 15 ml de amostra para fazer a análise em triplicado. Esta deverá de ser filtrada (0.2 μm ou 0.45 μm) e armazenada no congelador ou imediatamente processada.

As amostras usadas na determinação da sílica nunca podem estar em contacto com vidro evitando-se, deste modo, possíveis contaminações (Grasshoff *in* Grasshoff *et al.*, 1983). Quando a amostra é congelada a análise é realizada cerca de uma semana após o início do processo de descongelação das amostras, ocorrido no frigorífico. Durante o processo de congelação a sílica polimeriza não ficando dissolvida na solução (Kobayashi, 1967), impossibilitando deste modo a sua detecção com o método anteriormente descrito. O tempo de aproximadamente uma semana é suficiente para se dar novamente a despolimerização da sílica e, deste modo, voltar a estar dissolvida na solução.

Reagentes

Ácido Sulfúrico a 4.5 M

- Adicionar, lentamente e em constante agitação 250 ml de H_2SO_4 concentrado a 750 ml de AD.
- Deixar arrefecer a solução e prefazer um litro.

Este reagente deve de ser feito numa bacia de água fria para que o balão volumetrico não aqueça muito.

Armazenado num frasco de plástico à temperatura ambiente.

Solução acídica de Molibdato

- Medir 300 ml de H_2SO_4 a 4.5 M e colocar numa garrafa de plástico.
- Dissolver 38 g de Molibdato de Amónia ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) em 300 ml de AD.
- Adicionar a segunda solução à primeira (nunca o contrário).

Armazenar em frasco de plástico no escuro e à temperatura ambiente.

Solução de Ácido Oxálico Saturado

- Dissolver 80 g de $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 800 ml de AD.

O reagente não se vai dissolver completamente, logo fica sempre um precipitado no fundo da garrafa.

Armazenar em frasco de plástico à temperatura ambiente.

Ácido Ascórbico

- Dissolver 2.8g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ em 100 ml de AD.
- Misturar até estar completamente dissolvido.

Armazenado em pequenas quantidades no congelador em frascos de plástico.

Descongelar com um dia de antecedência.

Solução Standard Primário (10 mM)

- Secar durante toda a noite hexaFluroSilicato de Sódio (Na_2SiF_6) a 105 °C.
- Dissolver 0.9403 g em 100 ml de AD. Aquecer um pouco se necessário.
- Transferir para um balão volumétrico de 500 ml e perfazer o volume com água destilada.

Armazenado num frasco de plástico à temperatura ambiente ou frigorífico.

Solução Standard Secundário (1mM = 1000 μM)

- Diluir 10 ml de reagente Standard Primário em 90 ml de AD.
- Este reagente é feito sempre de fresco.

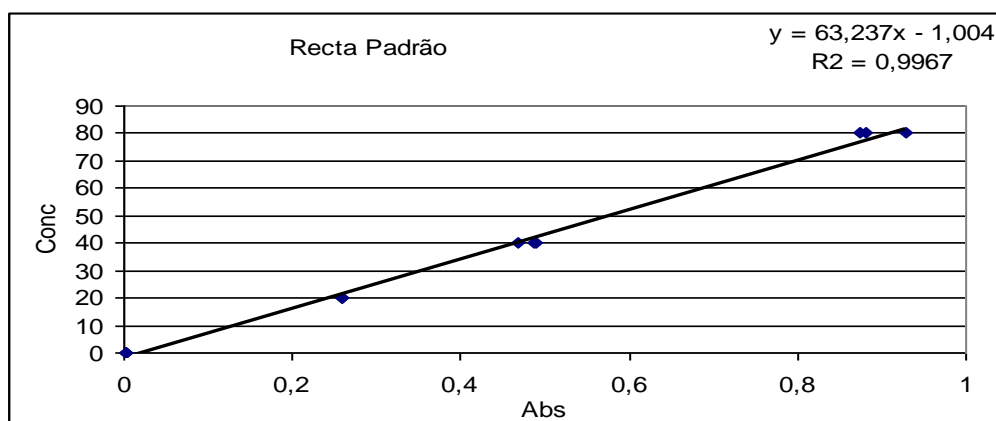
Procedimento

• Soluções padrão

A recta padrão deve de ser feita sempre que são processadas as amostras. As concentrações dever-se-ão ajustar à concentração de nutrientes nas nossas amostras.

Para um volume total de 1 ml:

PADRÕES	P _{1mM} (μL)	H ₂ O (μL)
0 μM	0	1000
5 μM	5	995
10 μM	10	990
20 μM	20	980
40 μM	40	960
60 μM	60	940
80 μM	80	920
100 μM	100	900



- **Amostras**

Colocar 1 ml ou fazer diluição (ver tabela abaixo) de amostra em cada tubo, em triplicado.

Diluições (amostras):

DIL	H ₂ O (μL)	Amostra (μL)
2X	500	500
4X	750	250
5X	800	200
10X	900	100

- **Determinação dos silicatos** (para padrões e amostras)

1. Adicionar 50 μl de Ácido Molibdato, agitar no vortex.
2. Incubar durante **20' no escuro** e à temperatura ambiente.
3. Adicionar 50 μl de Ácido Oxálico, agitar no vortex.
4. Adicionar imediatamente 40 μl de Ácido Ascórbico, agitar no vortex.
5. Incubar durante **3 horas** (nunca mais do que 6 horas) no escuro e à temperatura ambiente.
6. Ler ao espectrofotômetro a $\lambda = 810 \text{ nm}$.

Nota : É necessário ser-se preciso nos tempos de incubação. O Ácido Molibdato é adicionado mais lentamente para após 20' se adicionar os dois reagentes no mesmo período de tempo.

A concentração de sílica presente na amostra de água foi calculada usando a seguinte equação:

$$Si = D \times (A_a - A_b) \times Dil \times Fs$$

em que,

- Si - concentração de sílica dissolvidos na água em (μM),
- D - declive da recta padrão,
- A_a - valor de absorvância obtido para a amostra,
- A_b - valor de absorvância obtido para a solução sem sílica,

Dil - factor de diluição,

FS - factor de salinidade segundo Koroleff (*in* Grasshoff *et al.*, 1983).

Referências Bibliográficas

- American Public Health Association. (1971). *Standard methods for the examination of water and wast water*. 1th Ed. American Public Health Association, New York.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. (1983). *Methods of Seawater Analysis*. Second, revised and extended edition. Verlag Chemie, Weinheim.
- Jones, M. N. (1984). Nitrate reduction by shanking with cadmim: alternative to cadmium columns. *Water Res.* **18**:643-646.
- Joye, S. B. & Chambers, R. M. (1993). Nitrogen exchange between microvegetated intertidal sediments and the overlying water column. *Estuarine Research Federation Annual Meeting*. Hilton Head, Sc., Published Abstract. 58.

Quantificação de Hidrocarbonetos Totais (TPH)

Laboratório ECOBIOTEC

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental



Pré-tratamento da Amostra

- a) Secar à temperatura ambiente até peso constante
- b) Desagregar no almofariz
- c) Peneirar amostra com peneiro de 2mm

Pré-tratamento da Sílica

- a) secar durante 5 horas a 180°C, e deixar arrefecer durante a noite (excicador).
- b) Depois hidratar a 2% da sua massa.

Preparar duplicado de amostras em frasquinhos rolhados (VIAL) de 18 e 22 ml

- a) Adicionar 1 g de Na_2SO_4 (Sulfato de Sódio Anidro)
- b) Adicionar 1g de amostra (sedimento)
- c) Adicionar 10 ml de Tetracloroetileno (PERC)
- d) Preparar “Branco”, só adicionar 1 g de Na_2SO_4 e 10 ml de Tetracloroetileno

Utilização de Ultra-sons, 0° C durante 30 minutos

- a) Adicionar água da torneira até ao limite de submergir os vials
- b) Colocar uma “garra ou plataforma” para os fraquinhos não se dispersarem no ultra-sons
- c) Durante os 30 minutos verificar se as tampas estão bem fechadas...
- d) Depois do ultra-sons, esperar 10 minutos à temperatura ambiente antes da centrifuga...

Preparação da Sílica

- a) Em novos frasquinhos, duplicado de cada amostra, adicionar 0,3 g de Sílica tratada.

Preparação de filtro de 1 ml (filtro mecânico)

- a) Preparar filtro
- b) Pesar > 0,15 g de Lã de vidro



Centrifugar as Amostras (depois dos Ultra-sons)

- a) Colocar os frasquinhos a centrifugar a 1500 rpm durante 2 minutos.
- b) Decantar o elutriado para os frasquinhos (etiquetar as tampas) com a Sílica.
- c) Colocar no agitador à temperatura ambiente durante 10 m.

Filtrar

- a) Preparar o filtro, e decantar o elutriado, passando pelo “filtro mecânico”, para outro vial, utilizando as mesmas tampas etiquetadas.

QUANTIFICAÇÃO POR ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Stock 1 e Stock 2

- a) Preparar o Stock 1 num balão de 5 ml
 - a. Adicionar 100µl de hexadecano (exsicador) e 100µl de Isooctano ou Trimetilpentano (Hotte) e perfazer com PERC.
- b) Preparar o Stock 2 num balão de 5 ml
 - a. Adicionar 100µl do Stock 1 e perfazer com PERC.

Padrões de calibração a partir do stock 2

- a) Preparar padrões em balão de 15ml
 - a. P1 → volume padrão: 50µl
 - b. P3 → volume padrão: 150µl
 - c. P4 → volume padrão: 300µl
 - d. P5 → volume padrão: 450µl
 - e. P6 → volume padrão: 600µl

Computador e FTIR

- a) Ligar o FTIR
 - b) No computador: User → Destop → Spectra Manager → Measurement
-

- a. $B_M \rightarrow \text{Abs.}; \rightarrow 2700-3200; \rightarrow \text{ScanTime:32}$
- b. $S_M \rightarrow \text{Abs.}; \rightarrow 2700-3200; \rightarrow \text{ScanTime:32}$
- c. View \rightarrow Parameters \rightarrow Abs. ; $\rightarrow 2700-3200; \rightarrow \text{ScanTime:32}$

Preparar a cuba 4cm de espaço óptico

- a) Lavar com PERC
- b) Passar por branco (este branco vai servir apenas para lavar a cuba)

Analises dos padrões e amostras

- a) Fazer Background B \rightarrow com Branco (guardar este branco pois será utilizado posteriormente)
- b) Fazer Amostra S \rightarrow com Branco que fizemos o background
 - a. Aceita-se o resultado se a \neq entre o pico mais alto do sinal (2926 a 2938 cm^{-1}) e a linha de base (3130 cm^{-1}) for inferior a 0,015 de Abs.
- c) Fazer PERC como amostra
- d) Fazer padrões em PERC????

Bibliografia:

Couto, M. N., et al. "An improved method for the determination of petroleum hydrocarbons from soil using a simple ultrasonic extraction and Fourier transform infrared spectrophotometry." *Petroleum Science and Technology* 32.4 (2014): 426-432.

