



VI-014 – VALIDAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO POR ÁCIDO VANADOMOLIBDOFOSFÓRICO PARA DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO EM EFLUENTE LÁCTEO POR ANÁLISE COMPARATIVA

Rodrigo Fernando dos Santos Salazar⁽¹⁾

Engenheiro Bioquímico pela Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Mestrado em Engenharia Química pela EEL/USP. Doutorando em Química Analítica pelo Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (DQ/UFSCar).

Renata Franciele Marciel

Técnica em Química pelo Instituto Santa Teresa. Estagiária no Departamento de Engenharia Química da EEL/USP.

Tiemi Kawabata Andrade

Graduando em Engenharia Química pela Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Aluna de Iniciação Científica EEL/USP.

Oswaldo Luiz Cobra Guimarães

Engenheiro Químico pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL). Mestre em Engenharia de Produção Universidade Federal de Santa Catarina. Doutor em Ciências Ambientais pela Universidade de Taubaté. Professor Associado – Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena. Departamento Básico.

Hélcio José Izário Filho

Engenheiro Químico pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL). Mestre em Engenharia de Materiais pela FAENQUIL. Doutor em Química Analítica pelo Instituto de Química da Universidade de Campinas (IQ/UNICAMP). Professor Associado – Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena. Departamento de Engenharia Química.

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Química DQ/UFSCar. Rodovia Washington Luiz, Km 235 – Caixa Postal 676. CEP: 13565-905 – Brasil – Tel: +55 (16) 3351-8058 – Fax +55 (16) 3351-8350 – e-mail: r.f.s.salazar@gmail.com

RESUMO

Sabe-se que o fósforo apresenta grande importância em uma série de atividades metabólicas. O fósforo constitui um dos principais elementos encontrados em leite e em seus derivados. Alguns efluentes industriais como de abatedouros e laticínios apresentam quantidades excessivas de fósforo que, se disposto sem tratamento adequado, acarreta em sérios prejuízos ao meio ambiente. Em função da importância que este macro-elemento apresenta, o mesmo torna-se um parâmetro indispensável para a caracterização e monitoramento de efluentes líquidos em estações de tratamento.

Em todos os casos, as indústrias devem atender as normas ambientais que regulam o descarte de efluentes sendo que, no Brasil, a norma que regula a destinação de resíduos líquidos é o CONAMA N° 357 de 2005 que estabelece os níveis de tolerância para uma série de elementos inorgânicos e orgânicos e parâmetros físico-químicos. Concomitantemente surgem métodos que são mais adequados ou não para avaliação de certo parâmetro que se deseja investigar. No presente trabalho fez-se um estudo de otimização e validação da metodologia *Vanadomolibdophosphoric Acid Colorimetric Method* (4500 - P C) do *Standard Methods* para a determinação de fósforo em efluente lácteo, avaliando-se a robustez do método para amostras com alto teor de óleos e graxas (superior a 4000 mg L⁻¹). Através de análises estatísticas do tipo validação cruzada foi possível determinar os percentuais de repetibilidade e reprodutibilidade metodológica como sendo iguais a 0,78 % e 1,87 %, respectivamente. Verificou-se que análise estatística adotada para estimar a robustez do método apresentou confiança superior a 95 % e a metodologia empregada foi satisfatória analiticamente.

PALAVRAS-CHAVE: Laticínios, quimiometria, fósforo.



INTRODUÇÃO

A presença de fósforo em aquíferos, águas subterrâneas e em águas residuárias se dá, em sua totalidade, na forma de fosfatos. Estes são classificados em ortofosfatos, fosfatos condensados (pyro-, meta- e outros polifosfatos) e como ligante em compostos orgânicos podendo ser encontrados solubilizados, em material particulado ou detrito e na composição de microorganismos e organismos superiores (APHA – AWWA, 1998).

Alguns efluentes industriais, como os de indústrias de fertilizantes, pesticidas, químicas em geral, conservas alimentícias, abatedouros, frigoríficos e laticínios, apresentam fósforo em quantidades excessivas. As águas drenadas em áreas agrícolas e urbanas também podem provocar a presença excessiva de fósforo em águas naturais. Assim como o nitrogênio, o fósforo constitui-se em um dos principais nutrientes para os processos biológicos, ou seja, é um dos chamados macro-nutrientes, por ser exigido também em grandes quantidades pelas células. Nesta qualidade, torna-se parâmetro imprescindível em programas de caracterização de efluentes industriais que se pretende tratar por processo biológico. Em processos aeróbios exige-se uma relação $DBO_5:N:P$ mínima de 100:5:1, enquanto que em processos anaeróbios tem-se exigido a relação $DQO:N:P$ mínima de 350:7:1 (BRAILE; CAVALCANTE, 1993; PIVELI; MORITA, 1996; ROUSSEAU et al, 2004).

Com relação à presença de grandes quantidades de fósforo em águas residuárias industriais ou domésticas, a principal objeção diz respeito ao problema de eutrofização dos corpos receptores. No Brasil o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabelece, através da resolução N° 357, que os níveis de fósforo dissolvido não devam ser superiores a $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ em ambiente lântico a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ em ambiente lótico de águas doce (Classe 1) e não há previsão de um valor máximo de fósforo em lançamento de efluente (CONAMA, 2005).

Em função das diversas exigências que um aquífero deve atender para determinadas atividades, bem como as normas que regulamentam as características físico-químicas para o descarte de efluentes, se faz necessário um conjunto de ferramentas metodológicas que possuam alto grau de sensibilidade, estabilidade e que gerem pouco ou quase nenhum resíduo danoso ao meio ambiente; bem como o uso de ferramentas estatísticas para a avaliação da eficiência do método.

A quimiometria é a área especificamente destinada à análise de dados químicos de natureza multivariada. É possível, também, a identificação de problemas eventuais com linha base ou interferentes nas amostras usadas na calibração e nas novas amostras de previsão (FERREIRA et al, 1999; HOPKE, 2003).

Frequentemente o analista químico deseja saber se há diferenças entre resultados obtidos usando procedimentos diferentes ou avaliar a robustez de um método frente a diferentes analistas. No teste t em que a comparação é feita para uma série de replicatas com diferentes analistas e um único procedimento é classificada como teste t pareado (CHRISTIAN, 1994). Para estes estudos empregou-se o teste t de Student pareado.

No presente trabalho buscou-se avaliar a estabilidade e repetibilidade do método colorimétrico por ácido vanadomolibdofosfórico (norma 4500-P C, Standards Methods for the Examination of Water and Wastewater) para a determinação de fósforo em efluente do setor laticinista.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a determinação de fósforo total foram necessárias adequações da metodologia 4500-P C. *Vanadomolybdophosphoric Acid Colorimetric Method* do *Standar Methods* (APHA-AWWA, 1998). A análise de fósforo em efluentes é essencialmente feita através da espectrofotometria, onde os ortofosfatos combinam-se com o chamado reagente combinado (solução de molibdato de amônio e metavanadato de amônio), formando um complexo amarelo, que tem seu máximo de absorbância a 470 nm. Os fosfatos orgânicos necessitam de digestão química, empregando-se como reagentes na digestão, os ácidos sulfúrico e nítrico, perclórico ou persulfato, dependendo das características da amostra. Quando se faz a digestão prévia, obtém-se a concentração de fósforo total.



Para a coleta, preservação e estocagem do efluente lácteo foram necessárias coletas em bombas de 20,0 L do tanque de homogeneização das estações de tratamento de efluente de dois laticínios, um sediado em Guaratinguetá e o segundo em Lorena. Acondicionou-as em câmara fria a 4°C na Escola de Engenharia de Lorena.

Reagentes e soluções utilizados para determinação de fósforo

Indicador de fenantrolina em solução aquosa;

Ácido clorídrico (38 % m/m), ácido nítrico (65 % m/m), ácido sulfúrico (95 – 97 % m/m);

Água: resistividade de 18,2 mΩ cm obtida por um sistema Millipore, modelo Simplicity;

Reagente molibdato-vanadato;

Solução A: dissolveram-se 25 g de molibdato de amônio em 300 mL de água deionizada $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}]$;

Solução B: dissolveram-se 1,25 g de metavanadato de amônio (NH_4VO_3) em água deionizada por aquecimento até fervura por aproximadamente 10 min. Após o resfriamento, adicionaram-se 330 mL de HCL conc. Uma vez que a solução B novamente esfriou a temperatura ambiente adicionou-se a solução A em B, agitando-se com cuidado e, em seguida, diluiu-se a solução para BV (1000,0 mL).

Solução padrão de fosfato: dissolveram-se em água deionizada 219,5 mg de KH_2PO_4 anidro para BV (1000,0 mL). A relação estequiométrica a ser obedecida foi que: cada 1,00 mL de solução equivaleria a 50,0 µg de PO_4^{3-}P .

Para melhor conservação das soluções utilizadas para as determinações e otimizações da metodologia condicionaram-se as soluções em geladeira a 4 °C em frascos de vidro âmbar.

Preparo de curva de calibração e de amostras para análise de fósforo

Para cada 10,0 mL de amostra adicionaram-se 1,5 mL de HNO_3 e 0,5 mL de H_2SO_4 . Levou a solução para aquecimento, aquecendo-se até fervura e permanecendo até que restasse um volume por volta de 1 mL. Por fim avolumou-se até 10,0 mL.

Para o preparo da curva de calibração utilizou-se do procedimento apresentado a seguir: em balões de 10,0 mL colocaram-se até 8,0 mL do padrão. Em seguida, acrescentaram-se 2,0 mL da mistura de reagentes. Aguardaram-se 10 minutos para que ocorresse a reação por completo. Quando necessário avolumou-se para 10,0 mL. Verificou-se a robusteza do método a partir de estudos estatísticos de análise de sistemas de medição por variável cruzada, que consistiu na avaliação do método para diferentes analistas.

Tanto os valores que se referem à curva de calibração quanto aos valores de caracterização foram determinados por espectrofotometria. O comprimento de onda utilizado foi $\lambda = 470 \text{ nm}$.

Procedimento estatístico para a análise dos resultados

Para verificar a eficiência do método fez-se análise estatística por sistema de medição por variável cruzada, que consiste em verificar a repetibilidade e reprodutibilidade do método empregando-se diferentes analistas e observando a interação entre estes, a metodologia e amostragem e, conseqüentemente, se a ferramenta estatística adotada é robusta à influência do ruído (variáveis aleatórias) e tender à normalidade (BARROS NETO et al, 2003). O desvio padrão adotado foi de 0,2 e a largura da especificação adotada foi de 0,5, ou seja, com confiança de 95,0 %.

RESULTADOS

Os conjuntos de dados obtidos encontram-se na tabela 1. Para a determinação de fósforo nas amostras do efluente lácteo, primeiramente, verificou-se a adequação e as influências da matriz da amostra investigada sobre a metodologia utilizada, que, neste caso, foi a *Vanadomomolybdophosphoric Acid Colorimetric Method* (4500 - P C) do *Standard Methods* (APHA-AWWA, 1998).

Tabela 1: Sinais de absorbância obtidos para a elaboração das curvas de calibração e análise estatística do método para a determinação de fósforo em efluente lácteo.

Pontos exp.	Analista 1			Analista 2		
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva	Curva
1º:	0,041	0,039	0,041	0,038	0,040	0,040
2º:	0,070	0,068	0,069	0,067	0,069	0,068
3º:	0,103	0,100	0,104	0,103	0,104	0,101
4º:	0,132	0,129	0,131	0,130	0,134	0,129
5º:	0,160	0,158	0,158	0,157	0,159	0,160
6º:	0,189	0,190	0,190	0,190	0,187	0,189
7º:	0,218	0,219	0,220	0,215	0,218	0,220
8º:	0,250	0,252	0,252	0,250	0,253	0,250
9º:	0,279	0,281	0,279	0,280	0,280	0,280
10º:	0,311	0,315	0,313	0,311	0,315	0,311

Na tabela 1 foram apresentados os sinais de absorbâncias obtidos das análises de por 2 analistas. Cada analista elaborou três curvas analíticas com dez pontos cada curva, num total de 6 curvas de calibração e 60 pontos analisados em 10 concentrações distintas. A análise de variância para verificar a estabilidade dos dados obtidos e a robustez da metodologia, bem como, o tratamento estatístico para verificar os erros sistemáticos e aleatórios em função dos analistas é mostrado nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Análise de Variância dos resultados obtidos para as curvas de calibração para fósforo.

FV ¹	gl ²	SQ ³	MQ ⁴	F ⁵	P ⁶
Amostra	4	0,054	0,013516	19309,238	0,000
Analista	1	0,000	0,000001	0,762	0,432
Interação	4	0,000	0,000001	0,288	0,882
Repetibilidade	20	0,000	0,000002		
Total	29	0,054117867			

¹ fatores variáveis; ² graus de liberdade; ³ soma quadrática; ⁴ média quadrática; ⁵ Fator F; ⁶ grau de confiança

Tabela 3: Resultados fornecidos pela Análise de Medição (Variável Cruzada) dos dados obtidos para a elaboração das curvas de calibração do fósforo.

	Var	%	Desvio
RR total	0,000002	0,11	0,00155991
Repetibilidade	0,000002	0,11	0,00155991
Reprodutibilidade	0,000000	0,00	0
Operador	0,000000	0,00	0
Interação	0,000000	0,00	0
Amostra	0,00225	99,89	0,04746186
Total	0,002255	100,00	0,04748748

Em função dos resultados obtidos pode-se observar que a maior variância dos resultados deve-se à natureza das amostras analisadas ($\pm 99,89\%$), provavelmente sendo a variabilidade das concentrações para um mesmo ponto pré-estabelecido, o fator que viesse a influenciar mais sobre os resultados. Porcentagens de repetibilidade e reprodutibilidade que sejam menores que 10 % são considerados satisfatórios analiticamente; e são aceitáveis valores de repetibilidade e/ou reprodutibilidade que oscilem entre 10 % a 20 % devido ao



intervalo de confiança adotado (99,5 %). Em função dos percentuais de repetibilidade (0,78 %) e reprodutibilidade (1,87 %) pode-se dizer que o método apresenta robustez.

Com relação aos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, pode-se observar que a natureza das amostras analisadas foi o fator de maior variância dos resultados (99,89 %). Os teores de sólidos totais, bem como o teor de óleos e graxas podem interferir em uma série de análise físico-químicos como DBO, DQO, ferro, nitrogênio orgânico e amoniacal e, possivelmente, esteja interferindo de algum modo sobre a sensibilidade da metodologia estudada para a variância metodológica deva, principalmente, à natureza da amostra. Possivelmente, para minimizar o efeito da amostra sobre a variação do resultado e melhorar os valores de repetibilidade e reprodutibilidade do método, deva ser necessário um pré-tratamento, químico e/ou físico para reduzir os efeitos da matriz orgânica (APHA-AWWA, 1998; KRUG, 2008). Em função destas análises obtiveram-se para a metodologia empregada um percentual de repetibilidade global de 0,78 % e reprodutibilidade de 1,87 %. Resultados que atestam a confiabilidade e robustez do método para o efluente estudado.

É importante ressaltar que, o efluente empregado para a este estudo, apresentava elevados teores de óleos e graxas (em torno de 4000 mg L⁻¹). Os teores de sólidos totais, bem como o teor de óleos e graxas podem interferir em uma série de análise físico-químicos como DBO, DQO, fósforo, nitrogênio orgânico e amoniacal e (FARIA et al, 2004; MENDES et al, 2006, RIBEIRO et al, 2005; SALAZAR et al, 2008). Entretanto a metodologia mostrou-se robusta o suficiente para minimizar possíveis interferências desta matriz Láctea.

As concentrações de fósforo total nas amostras de efluente lácteo analisadas oscilaram em 7,70 ± 6,98 mg L⁻¹ e 1,38 ± 0,46 mg L⁻¹ para o efluente dos laticínios de Guaratinguetá e Lorena, respectivamente (n = 6). As concentrações de fósforo nos laticínios investigados oscilaram em valores aquém do que costuma ser reportado (PAN et al, 2006; BROUGHTON et al, 2008; BANU et al, 2008; VOURCH et al, 2008), possivelmente devido ao consumo do fósforo durante o processamento de derivados lácteos e devido a matéria prima empregada, pois o laticínio de Lorena emprega leite previamente desnatado com posterior correção dos sólidos para o processo fermentativo (SALAZAR, 2009).

CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Observou-se a sensibilidade do método vanadomolibdofosfórico em determinar indiretamente a concentrações de fósforo em águas residuárias com alto teor lipídios (por volta de 4000 mg L⁻¹).

A partir dos resultados obtidos verificou-se a eficiência, sensibilidade e estabilidade da metodologia para determinação de fósforo total em efluente lácteo pelo método – norma 4500-P C do método colorimétrico por ácido vanadomolibdofosfórico (APHA – AWWA, 1998), com valores percentuais de repetibilidade e reprodutibilidade metodológica iguais a 0,78 % e 1,87 %, respectivamente e, conseqüentemente, verificou-se que análise estatística adotada para a estimar a robustez do método foi analiticamente satisfatório.

AGRADECIMENTOS

Ao Eng. Antônio Rodriguez de Lima, responsável pela estação de tratamento de efluentes da DANONE, unidade Guaratinguetá, e ao Prof. Ms.C. Gerônimo V. Tagliaferro, pelo fornecimento de amostras de efluente lácteo da Yakult empregadas neste projeto. Ao prof. Dr. Edenir R. Pereira-Filho, pela análise estatística e discussão dos resultados. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA-AWWA. Standart methods for examination of water and wastewater. 20.ed. Washington DC: American Public Health Association – American Water works association, 1998.
2. BANU, J. R.; ANADAN, S.; KALIAPPAN, S.; YEOM, I. T. Treatment of dairy wastewater using anerobic and solar photocatalytic methods. Solar Energy, 2008 (in press)



3. BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como Fazer Experimentos/ Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas: Ed.: Unicamp, 2003.
4. BRAILE, P. M.; CAVALCANTI, J. E. W. A. *Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais*. São Paulo: CETESB, 1993.
5. BROUGHTON, A.; PRATT, S.; SHILTON, A. Enhanced biological phosphorus removal for high-strength wastewater with a low rbCOD:P ratio. *Bioresource Technology*, n.99, p. 1236-1241, 2008.
6. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **CONAMA Nº 357**: disposição sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelecimento das condições e padrões de lançamento de efluentes. Disponível em: < www.mma.gov.br/port/conama >. Acesso em: jul. 2007.
7. CHRISTIAN, G. D. *Analytical Chemistry* fifth edition. New York, Wiley & Sons, INC. 1994
8. FARIA, E. A.; RODRIGUES, I. C.; BORGES, R. V. Estudo do impacto ambiental gerado nos corpos d'água pelo efluente da indústria de laticínio em Minas Gerais. Belo Horizonte, UFMG, 2004. Monografia (Especialização em Engenharia Sanitária e Meio Ambiente)
9. FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, n. 5, v. 22, 1999.
10. HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics (Review). *Analytical Chimica Acta*, n. 500, p. 365-377. Jul. 2003.
11. KRUG, F. J. Métodos de Preparo de Amostras / Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar 1ª ed. Piracicaba: Ed.: CENA/USP, 2008.
12. MENDES, A. A.; PEREIRA, E. B.; CASTRO, H. F. Biodegradação de Águas Residuárias do Laticínios Provenientemente Tratadas por Lipases. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 9, n. 2, p. 143-149, 2006.
13. PAN, S. H.; LO, K. V.; LIAO, P. H.; SCHREIER, H. Microwave pretreatment for enhancement of phosphorus release from dairy manure. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, v. 41, p. 451 – 458, 2006.
14. PIVELI, R. P.; MORITA, D. M. *Caracterização de Águas Residuárias / Medidas de Nitrogênio e Fósforo*. 1996, 29p. (apostila).
15. RIBEIRO, A. C. P.; CONCEIÇÃO Jr., J. C.; ROSA, D. R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Aplicação de Enzimas Hidrolíticas no Tratamento Aeróbio de Efluentes de Laticínios. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6. 2005. Anais, Campinas, SP, 2005.
16. ROUSSEAU, D. P. L.; VANROLLEGHEM, P. A.; PAWN, N. Constructed wetlands in Flanders: a performance analysis. *Ecological Engineering*, v. 23, n. 3, p. 151 – 163, 2004.
17. SALAZAR, R. F. S.; CARROCCI, J. S.; T. K. ANDRADE; MARCIEL, R. F.; BRANDÃO, J. J.; GUIMARÃES, O. L.; IZÁRIO FILHO, H. J. Validação do método fenantrolina para determinação de ion ferroso em efluente lácteo por análise comparativa. Em: VIII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO. 2008. Anais, São José dos Campos, SP, 2008
18. SALAZAR, R. F. S. Aplicação de processo oxidativo avançado (POA) como pré-tratamento de efluente de laticínio para posterior tratamento biológico. 2009. Dissertação de Mestrado. Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.
19. VOURCH, M.; BALANNEC, B.; CHAUFER, B.; DORANGE, G. Treatment of dairy industry wastewater by reverse osmosis for water reuse. *Desalination*, v. 219, p. 190 – 202, 2008.