Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Tecnologia e Ciências
Faculdade de Engenharia

Olegario Fernandes Vieira Neto

Avaliação da incerteza na medição do ensaio Demanda Bioquímica de Oxigênio

Rio de Janeiro
2020

Olegario Fernandes Vieira Neto

Avaliação da incerteza na medição do ensaio Demanda Bioquímica de Oxigênio

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Gandhi Giordano

Coorientador: Prof.ª Dra. Daniele Maia Bila

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE

UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/B

V658 Vieira Neto, Olegario Fernandes.
Avaliação da incerteza na medição do ensaio demanda bioquímica de oxigênio / Olegario Fernandes Vieira Neto. – 2020.
107f.

Orientador: Gandhi Giordano.
Coorientadora: Daniele Maia Bila.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia.

1. Engenharia ambiental - Teses. 2. Água - Poluição - Teses. 3. Água - Qualidade - Medição - Teses. 4. Luminescência - Teses. I. Giordano, Gandhi. II. Bila, Daniela Maia. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Engenharia. IV. Título.

CDU 628.196

Bibliotecária: Júlia Vieira – CRB7/6022

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Olegario Fernandes Vieira Neto

Avaliação da incerteza na medição do ensaio Demanda Bioquímica de Oxigênio

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Controle da Poluição Urbana e Industrial.

Aprovado em: 18 de Agosto de 2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gandhi Giordano (Orientador)
Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof.ª Dra. Daniele Maia Bila (Coorientador)
Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof.ª Dra. Nathalia Salles Vernin Barbosa
Faculdade de Engenharia – UERJ

Prof. Dr. Harley Moraes Martins
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, Ildefonso Vieira e Maria do Carmo, pelo incentivo prazeroso ao estudo, à minha querida esposa Susan Poague e filha, Lindsay Sury, pelo constante carinho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Prof. Doutor Gandhi Giordano, pela confiança depositada em mim, para desenvolver este estudo no âmbito do programa de mestrado, e Prof.ª Doutora Daniela Maia Bila, pelos estímulos ao reingresso na academia, a continuar o desenvolvimento de pesquisas, e pela amizade.

Aos professores, pelos ensinamentos, dentro e fora da sala de aula, durante o mestrado.

Ao Prof. Doutor Harley Moraes Martins e a Prof.ª Doutora Nathalia Salles Vernin Barbosa por fazerem parte da banca avaliadora desse trabalho.

Aos meus colegas de mestrado, pelo companheirismo.

A UERJ, porque sem ela não poderia ter realizado este sonho de conquista.

À TECMA Tecnologia em Meio Ambiente Ltda, principalmente aos diretores Sr. Gandhi Giordano e Sr. Luiz Carlos O. Cunha, que permitiram a realização desse estudo por meio da disponibilização dos dados brutos utilizados na dissertação, e de toda equipe técnica envolvida.

Aos meus irmãos Ildefonso, Ilbwnni, Marcia Rocha, sobrinhos, cunhado e cunhadas pelo constante apoio, e de ter uma família linda para todos os momentos.

Aos estímulos pelos colegas de trabalho Rogerio Carrara, Luana Branco, Julia Cristine, Flavia Assed, João Paulo e Mônica Medeiros para a retomada aos estudos.

A todos aqueles, que embora não citados nominalmente, contribuíram direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.

Isaac Newton

RESUMO

VIEIRA NETO, O. F. *Avaliação da incerteza na medição do ensaio Demanda Bioquímica de Oxigênio*. 2020. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

As concentrações limites de muitos poluentes exigidos pelas legislações ambientais estão cada vez menores, demandando desenvolvimento de métodos que forneçam resultados mais exatos e precisos. Quanto menor o limite de quantificação, maior é o desvio nesse nível de concentração, e é nesse momento que o conceito de incerteza tem maior relevância, por mais treinado que seja o analista e por melhor que seja o sistema de medição.O presente trabalho relata a validação do método para determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) pela medição do oxigênio dissolvido por luminescência (APHA, 2017), para a comprovação do limite de quantificação (LQ) e a estimativa de incerteza de medições associada aos resultados. O limite de quantificação, precisão e o tempo de resposta foram comparados por três métodos distintos: químico, luminescente e eletrodo com membrana no ensaio DBO. Foram utilizados os resultados dos ensaios de branco, padrões e materiais de referência, água coletada no rio dos Macacos na Floresta da Tijuca – RJ, e efluentes de indústrias localizadas no Rio de Janeiro. Os testes foram realizados conforme diretrizes do DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016) e do Guia Eurachem/Citac (2012). Foi possível estabelecer o LQ igual a 1 $mg.L^{-1}$ de O_2, precisão de 4,3% e recuperação de 103% para medição do oxigênio dissolvido por luminescência. O LQ pelo método de Winkler foi igual a 0,4 $mg.L^{-1}$, porém mais trabalhoso. Menos preciso, o LQ igual a 3 $mg.L^{-1}$, precisão de 4,6% e recuperação de 106%foi alcançado quando utilizado um sensor com membrana para quantificar O_2. Ficou demonstrado que o método por luminescência foi satisfatório para avaliar o enquadramento na Resolução Conama n° 357 (BRASIL, 2005), conforme limite de 3 $mg.L^{-1}$ para águas classe II. A precisão do analista, componente Tipo A, demonstrou ser a contribuição mais relevante para a estimativa da incerteza. O coeficiente de variação foi de 12% a 21% para DBO entre 10 e 50 $mg.L^{-1}$; 2,4% a 5,5% para DBO entre 100 e 4000 $mg.L^{-1}$, em função das matrizes estudadas. Os demais componentes Tipo B contribuíram pouco na estimativa de incerteza combinada dos resultados de DBO. A planilha eletrônica foi validada contemplando as entradas de dados e fórmulas para simplificação dos cálculos envolvidos na estimativa da incerteza.

Palavras-chave: Demanda Bioquímica de Oxigênio; Validação; Incerteza.

ABSTRACT

VIEIRA NETO, O. F. *Evaluation of uncertainty in the application of the Biochemical Oxygen Demand Test.* 2020. 107f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The limits of many pollutants required by environmental legislation are becoming ever smaller, requiring the development of methods that provide more accurate and precise results. The lower the limit of quantification, the greater the deviation at this concentration level, and, at this point, the concept of uncertainty is more relevant, even considering trained analyst and the best measurement system. The present study reports the validation of the method for determination of Biochemical Oxygen Demand (BOD) by measuring the dissolved oxygen by luminescence (APHA, 2017), to evaluate the quantification limit (LQ) and estimate the measurement uncertainty associated with data. The quantification limit, precision and response time for three different methods were compared: chemical, luminescent and membrane electrode in the BOD assay. The results of the assays for dilution-water blank, standards and reference materials, water collected from the Rio dos Macacos in the Tijuca Forest - RJ, and industrial effluents from Rio de Janeiro were used. The limit of quantification was also investigated using the chemical method of Winkler and using a membrane sensor. The results were treated according to DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016) and guide of Eurachem/Citac (2012). It was possible to define the LQ equal to 1 $mg.L^{-1}$ O_2, precision of 4.3%, recovery of 103% for the dissolved oxygen by luminescence. The LQ by the method of Winkler was equal to 0.4$mg.L^{-1}$; however, the method is more complex. Less accurate, LQ equal to 3 $mg.L^{-1}$, precision of 4.6%, and recovery of 106% were obtained for the method using a sensor with membrane to quantify dissolved oxygen. It was demonstrated that the luminescence method was satisfactory for assessing compliance with Conama Resolution nº 357 (BRASIL, 2005), according to the limit of 3 $mg.L^{-1}$. The analyst's precision, Type A component, demonstrated a more relevant contribution to an uncertainty estimate. The variation coefficient was 12% to 21% for BOD between 10 and 50 $mg.L^{-1}$; and 2.4 % to 5.5% for BOD between 100 and 4000 $mg.L^{-1}$, depending on the matrices studied. The others Type B components contributed little in the estimation of the combined uncertainty of the BOD results. The spreadsheet was validated with input data and formulas to simplify the calculations involved in estimating uncertainty.

Keywords: Biochemical Oxygen Demand; Validation; Uncertainty.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fixação do oxigênio dissolvido pelo método de Winkler 26
Figura 2 – Liberação de iodo após adição de ácido sulfúrico..... 28
Figura 3 – Curva típica do O_2 corrente-voltagem 30
Figura 4 - Medidor de oxigênio dissolvido com eletrodo de membrana 31
Figura 5 - Esquema de fotoluminescência 32
Figura 6 - Princípio do funcionamento do sensor por luminescência. 33
Figura 7 - Medidor de oxigênio dissolvido por luminescência 33
Figura 8 - Representação dos intervalos de confiança para as distribuições..... 38
Figura 9 – Fontes de incerteza ilustradas no Diagrama de Ishikawa 44
Figura 10 – Algumas fontes de incerteza Tipo B da DBO 45
Figura 11 – Itens críticos do método 5210 (B) 5 - Day BOD Test 48
Figura 12 – Acondicionamento dos frascos DBO..... 49
Figura 13 – Temperatura da incubadora DBO 49
Figura 14 – Etapas envolvidas neste estudo para a estimativa da incerteza..... 50
Figura 15 - Depleção do branco pelo método de Winkler 60
Figura 16 – Limite de quantificação da DBO por três metodologias 63
Figura 17 - Precisão dos métodos para determinação do OD no ensaio DBO 66
Figura 18 – Recuperação do LQ da DBO por medição do O_2 por luminescência e eletrodo com membrana 66
Figura 19 - Contribuição das fontes de incerteza Tipo Bpara o ensaio DBO 67
Figura 20 – Contribuição das fontes Tipo A para DBO inferiores a 50 $mg.L^{-1}$ em comparação às fontes de incerteza tipo B (volumetria)..... 68
Figura 21 – Precisão da DBO em função da concentração e amostras, pela medição do oxigênio dissolvido por luminescência..... 72
Figura 22 - Incerteza expandida da DBO, medição do OD por luminescência. 73
Figura 23 – Carta controle do ensaio DBO com padrão de 198 ± 30 $mg.L^{-1}$ de O_2. 74
Figura 24 - Interpretação do resultado associado à incerteza..... 75
Figura 25 - Componentes tipo A e tipo B (incerteza padrão) da DBO..... 96
Figura 26 - Planilha eletrônica para calcular o resultado e estimar a incerteza da DBO 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valor do fator de abrangência k para uma distribuição normal. 39
Tabela 2 - Divisores para distribuições de probabilidades distintas 39
Tabela 3 - Estimativas para o limite de detecção em função das matrizes 51
Tabela 4 – Composição química da água mineral utilizada como água de diluição no ensaio DBO 52
Tabela 5 - Resultados de oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$ de O_2) para os brancos utilizando água mineral pelo método de Winkler – analista A 57
Tabela 6 - Resultados de oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$ de O_2) para os brancos utilizando água desionizada pelo método de Winkler - analista A.....57
Tabela 7 - Resultados de oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$ de O_2) para os brancos utilizando água mineral pelo método de Winkler – analista B 58
Tabela 8 - Resultados de oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$ de O_2) para os brancos utilizando água desionizada pelo método de Winkler– analista B.....59
Tabela 9 - Resultados das sete replicatas do branco ($mg.L^{-1}$ de O_2) da DBO para os três métodos de determinação do O_2 62
Tabela 10 - Resultados das repetições dos padrões 1, 2, 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2. A medição do OD foi por luminescência.....64
Tabela 11 - Resultados das repetições dos padrões 1; 2; 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2. A medição do OD foi por eletrodo com membrana.....65
Tabela 12 - Resultados das repetições da DBO em 3 amostras do rio dos Macacos, Floresta da Tijuca-RJ. A medição do OD por luminescência 70
Tabela 13 - Repetibilidade do ensaio DBO ($mg.L^{-1}$ de O_2) em amostras coletadas em estações de tratamento de efluentes industriais localizadas no Rio de Janeiro 71
Tabela 14 - Resultados das proficiências da Rede Metrológica do Rio Grande do Sul.....73
Tabela 15 - Fontes Tipo B da pesagem do dicromato de potássio 87
Tabela 16 - Fontes Tipo B do balão volumétrico da solução de dicromato de potássio.....88
Tabela 17 - Fontes Tipo B pipeta utilizada na solução de $Na_2S_2O_3$.....89
Tabela 18 - Fontes Tipo B da bureta utilizada na etapa da padronização 90

Tabela 19 - Fontes Tipo B da proveta para transferência do branco 91
Tabela 20 - Fontes Tipo B da bureta utilizada na titulação do branco 92
Tabela 21 - Fontes Tipo B da proveta para transferência da amostra 93
Tabela 22 - Volume de amostra utilizada no ensaio DBO (pipeta ou proveta).....93
Tabela 23 - Fontes Tipo B da proveta para transferência da amostra 94
Tabela 24 - Tabela indicativa dos volumes dos frascos DBO 95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APHA	*American Public Health Association*
CGCRE	Coordenação Geral de Acreditação
CITAC	*Cooperation on International Traceability in Analytical Chemistry*
CMD	Concentração Média Determinada
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CUPRAC	*Cupricion Reducing Total Antioxidant Capacity*
CV	Coeficiente de Variação
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DICLA	Divisão de Acreditação de Laboratórios
DPD	N,N-dietil-p-fenilendiamina
DRP	Desvio Padrão Relativo
DOQ	Documento Orientativo da Qualidade
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EURACHEM	*Cooperation for Analytical Chemistry in Europe*
FIP	Fipronil
GUM	*Guide to the expression of uncertainty in measurement*
ICH	*International Conference on Harmonization*
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	*Internacional Organization for Standardization*
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*
JCGM	*Joint Committee for Guides in Metrology*
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MRC	Material de Referência Certificado
NBR	Norma Brasileira
NEO	Neonicotinóide
NIT	Norma Inmetro Técnica
OD	Oxigênio Dissolvido

RBC	Rede Brasileira de Calibração
RBLE	Rede Brasileira de Laboratórios de Ensaio
RP-HPLC	*Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography*
S	Desvio Padrão
TAC	Total Antioxidant Capacity
U	Incerteza expandida
u_c	Incerteza combinada
UPLC	*Ultra Performance Liquid Chromatography*
VIM	Vocabulário Internacional de Metrologia
X_v	Resultado verdadeiro do programa de ensaio de proficiência

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	19
2	**PARÂMETRO INDICADOR DE MATÉRIA ORGÂNICA – DBO**	24
2.1	**Medição do oxigênio dissolvido**	25
2.1.1	**Método de Winkler**	25
2.1.2.	**Sensor eletroquímico – eletrodo de membrana**	29
2.1.3.	**Sensor óptico – luminescente**	31
2.2.	**Incerteza de medição:**	34
2.2.1.	**Avaliação tipo A da incerteza padrão**	36
2.2.2.	**Avaliação tipo B da incerteza padrão**	36
2.2.3.	**Distribuição de probabilidades**	37
2.2.4.	**Definindo um fator de abrangência**	38
2.2.5.	**Expressando a incerteza**	40
2.3	**Validação**	41
2.3.1.	**Limite de Detecção**	41
2.3.2.	**Limite de Quantificação**	42
2.3.3.	**Precisão**	42
2.3.4.	**Exatidão (recuperação)**	42
2.3.5.	**Tendência (z score)**	43
2.4	**Abordagem para estimar a incerteza de medição**	44
3	**METODOLOGIA**	45
3.1	**Cuidados na realização do ensaio DBO**	45
3.2	**Etapa 1 - Determinação do LD e LQ**	51
3.3	**Etapa 2 - Investigação do LQ experimental**	53
3.4	**Etapa 3 - Análise das fontes de incerteza – Tipo B**	54
3.5	**Etapa 4 - Repetibilidade para matrizes distintas**.	55
3.6	**Etapa 5 - Elaboração de planilha eletrônica**	55
4	**RESULTADOS**	56
4.1.	**Etapa 1 – Determinação do LD e LQ para o ensaio DBO**	56
4.1.1	**Água utilizada no ensaio DBO**	56

4.1.2 **Limite de Detecção (LD) da DBO**.....61
4.1.3 **Limite de Quantificação (LQ) da DBO**.....61
4.2 **Etapa 2 - Confirmação experimental do LQ da DBO** 64
4.3 **Etapa 3 - Fontes de incerteza - Tipo B**.....67
4.4 **Etapa 4 - Repetibilidade das amostras ambientais** 70
4.5 **Etapa 5 – Elaboração da planilha eletrônica**.....74
4.6 **Interpretando a incerteza**.....75
CONCLUSÃO 76
REFERÊNCIAS.....79
GLOSSÁRIO.....85
APÊNDICE A - Fontes de incerteza padrão tipo B - DBO 87
APÊNDICE B - Volumes dos frascos aferidos para o ensaio DBO.....95
APÊNDICE C - Planilha para a estimativa da incerteza da DBO 96
ANEXO A - Método do ensaio DBO.....98

INTRODUÇÃO

A estimativa de incerteza de medição do ensaio torna-se uma tarefa complexa, pois várias características físico-químicas e biológicas de várias matrizes ambientais se alteram constantemente, além da possibilidade de interferências que provocam desvios nas metodologias analíticas. Os erros de indicação em sistemas de medição são inevitáveis e são causados por dois fatores: o primeiro, condições ambientais (temperatura, pressão, umidade, ruídos, poeira, flutuação de tensão de alimentação, etc.), e o segundo, pelos instrumentos de medição (erro de zero, erro de ganho, erro de paralaxe, entre outros). Por melhor que seja o sistema de medição, por mais treinado que seja o operador e por mais controladas que sejam as condições ambientais, ainda assim, o erro de medição existirá em maior ou menor grau.

Na área ambiental muitas decisões são pautadas em resultados analíticos que precisam ter uma qualidade assegurada. Os limites dos parâmetros exigidos pelas legislações ambientais estão cada vez menores. Um resultado duvidoso, com uma declaração de incerteza mal estimada poderá provocar grandes prejuízos econômicos e ambientais, para as empresas de consultoria prestadoras de serviço, bem como para as fontes geradoras da poluição. A sociedade é beneficiada com resultados confiáveis metrologicamente por garantir que especificações técnicas, regulamentos e normas existentes, sejam devidamente atendidos e que os peritos e autoridades legais façam uso desses nas suas tomadas de decisões com segurança.

Para se atender a classificação de corpos de diretrizes ambientais em relação ao enquadramento de rios despoluídos, expostos aos lançamentos de esgotos e efluentes das atividades antrópicas, bem como aos recentes acidentes com rompimentos de barragens contendo rejeitos de mineração, afetando a qualidade da água de bacias hidrográficas utilizadas na captação para abastecimento público, é indispensável que os laboratórios desenvolvam novas metodologias e forneçam resultados analíticos mais exatos e precisos, associados à incerteza de medição. Conhecer as fontes de incerteza e estimá-la ainda é desafiador no Brasil e necessário para confiabilidade dos resultados.

O Marco Legal do Saneamento Básico, sancionado em 15 de julho de 2020, Lei nº 14.026 (BRASIL, 2020), deve atrair mais de R$ 700 bilhões em investimentos e gerar, em média, 700 mil empregos no país nos próximos 14 anos, segundo o Ministério da Economia (G1.COM, 2020). O novo Marco Legal facilita privatizações no serviço de saneamento e estabelece cobertura de 99% para o fornecimento de água potável e coleta de esgoto para 90% da população até o fim de 2033, ficando a cargo da Agência Nacional de Águas a regulação do saneamento básico. (BRASIL, 2020). Neste momento, para o abastecimento público, a água deve ser captada de corpos hídricos, água doce, classe 1, 2 ou 3, contendo pouca poluição por matéria orgânica, expressa pela DBO, após tratamento convencional ou avançado conforme classificação da Resolução Conama nº 357, 17/03/2005 (Brasil, 2005). A Demanda Bioquímica de Oxigênio também é importante para se avaliar a eficiência das Estações de Tratamento de Esgotos (ETE), a partir da redução de carga orgânica biodegradável entre as amostras de esgotos sanitários.

A partir da década passada, o Conselho Nacional de Meio Ambiente, através de suas Resoluções CONAMA n° 344, 25/03/2004 (BRASIL, 2004), nº 357 de 17/03/2005 (BRASIL, 2005) e n° 430, de 13/05/2011 (BRASIL, 2011) vêm exigindo que as análises físicas, químicas e biológicas em matrizes ambientais sejam realizadas em laboratórios ambientais que possuam sua competência técnica reconhecida formalmente através da acreditação concedida pela CGCRE-INMETRO. Tal exigência alcançou os procedimentos de amostragem, conforme preconiza a norma INMETRO–NIT-DICLA-057.Rev.04 (INMETRO, 2018). Unidades Federativas vêm adotando o mesmo critério para cadastramento de laboratórios em seus bancos de dados, e como consequência, houve um grande crescimento no número de acreditação. No Brasil, em 1999 pouco mais de uma centena de organismos (laboratórios de ensaios e análises clínicas) estavam acreditados pela CGCRE–INMETRO. Em meados de 2005 este número aumentou para 200 laboratórios, e dobrou nos cinco anos à frente. Na última década, o aumento foi superior a 270% de organismos acreditados em relação à década anterior (INMETRO, 2020).

Neste trabalho, por se praticar métodos normalizados e reconhecidos pela comunidade científica internacional, os parâmetros de interesse da validação foram: limite de detecção, limite de quantificação e estimativa da incerteza de medição do resultado de DBO, que precisam ser comprovados nas rotinas dos laboratórios, conforme o sistema de qualidade implantado. Foram utilizados os procedimentos

descritos no Manual INMETRO-DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016), apoiados no Guia para Expressão da Incerteza de Medição (JCGM 200, 2008) e no Guia Eurachem/Citac (2012), adotados internacionalmente como referência para o estabelecimento da incerteza de um resultado de medição.

O ensaio de DBO tem sua importância ambiental por representar o parâmetro mundial utilizado para avaliação da qualidade da água em relação à presença de matéria orgânica biodegradável, indicador da conformidade da descarga de águas residuais e da eficiência das estações de tratamento dos efluentes e resíduos de acordo com as normas ambientais vigentes. Existem várias metodologias aplicadas a determinação da DBO, tais como o manométrico, métodos químicos, eletroquímicos e ópticos. Sabe-se que quanto menor o limite de quantificação do método, maior é o desvio nesse nível de concentração, e é nesse momento que o conceito de incerteza tem grande relevância, e ainda é pouco estudada, sendo estimadas pelos laboratórios acreditados conforme a norma NBR ISO 17025:2017 (ABNT, 2017).

O presente trabalho tem por objetivo validar e comparar o limite de quantificação do ensaio DBO, utilizando três métodos distintos para medição do oxigênio dissolvido: método químico de Winkler, medidor por luminescência, e eletrodo com membrana, aplicados em águas residuárias e de superfície. Além disso, os objetivos específicos incluem:

- Investigar a influência das componentes da incerteza no ensaio DBO;
- Avaliar a melhor metodologia a ser utilizada na aplicação do ensaio em atendimento à legislação ambiental;
- Contribuir no esclarecimento e disseminação de critérios relevantes para a estimativa da incerteza de medição do ensaio DBO;
- Propor uma planilha para a estimativa da incerteza de medição da DBO.

Para alcançar os objetivos propostos, a presente dissertação é estruturada da seguinte maneira:

No capítulo um faz-se uma revisão bibliográfica de metodologias utilizadas, em nível mundial, para estimar a incerteza de medição em ensaios químicos em diversos laboratórios, visando atender os variados segmentos da ciência.

No capítulo dois faz-se uma descrição sumária das três metodologias do ensaio DBO, conceitua-se a incerteza de medição e os parâmetros relevantes de desempenho de validação, objeto de interesse desta dissertação.

No capítulo três são descritos os ensaios experimentais realizados no laboratório da TECMA, acreditado pela CGCRE-INMETRO, sob CRL nº 0200, localizado no Rio de Janeiro. O método do ensaio completo da DBO está apresentado no Anexo A.

O capítulo quatro apresenta os resultados obtidos dos estudos em laboratório com amostras de águas de superfícies, esgotos sanitários e efluentes industriais para validar o limite de quantificação entre os três métodos, bem como uma avaliação das principais fontes de incerteza, cujas equações utilizadas no cálculo estão expostas no Apêndice A.

Finalmente é apresentada a conclusão, incluindo recomendações futuras de estudos de validação.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, o GUM, e o Guia Eurachem/Citac (2012) de cálculo de incerteza em medições analíticas, apresentam metodologias reconhecidas em nível mundial, para estimar a incerteza de medição em ensaios químicos em diversos laboratórios, visando atender os variados segmentos da ciência.

Mendez (2013) comparou as metodologias de determinação da Demanda Química de Oxigênio (DQO) por refluxo aberto e colorimetria com refluxo fechado descritas no *Standard Methods for the Water and Wasterwater* (APHA, 2012). As incertezas foram calculadas utilizando o protocolo estabelecido no Guia Eurachem/Citac (2012) e concluiu que o método colorimétrico foi mais preciso que o titulométrico na determinação da DQO em amostras de efluentes e chorume, requerendo maior treinamento do analista no método titulométrico, por refluxo aberto, a fim de reduzir a contribuição Tipo A da incerteza padrão.

Para estimar a incerteza dos resultados de alguns desreguladores endócrinos na água superficial por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, em Portugal, Martins et al. (2014) utilizaram o protocolo do Guia Eurachem/Citac (2012) e da norma NIT-DICLA-021.Rev04 – “Expressão da incerteza de medição por laboratórios de calibração”. O processamento de amostras e a determinação cromatográfica podem significativamente ter influência na incerteza dos dados analíticos. Os resultados mostraram que a recuperação do método e a calibração com matriz são os dois principais contribuintes para incerteza. O método possui uma incerteza expandida relativa (fator k igual a 2,447 e nível de confiança de 95%) de cerca de 8 a 19% e na faixa de 4 $ng.mL^{-1}$ a 2 $\mu g.mL^{-1}$.

Na França, Lequy et al. (2016) adotaram as diretrizes do Guia Eurachem/Citac (2012) para determinar as incertezas associadas às concentrações de elementos medidos em musgos, que se caracteriza como uma ferramenta conveniente para estabelecer exposição específica ou em larga escala a metais vestigiais atmosféricos e poluição por nitrogênio. Incertezas foram expressas como funções lineares das concentrações dos elementos, com declives mínimos e máximos de 14 e 61%, correspondendo a nitrogênio e cromo e mediana de 32%. As análises químicas contribuíram para uma pequena proporção da incerteza associada

ao protocolo, exceto para a análise de cromo. O período de amostragem e a variabilidade intra-local contribuíram amplamente para essa incerteza.

Pinto et al. (2016) estimaram as incertezas da concentração de sedimento em suspensão, determinada por um procedimento analítico gravimétrico por filtração, e da descarga sólida de rio, usando tanto a lei de propagação das variâncias (de incertezas), com base no Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, o GUM, e no Guia Eurachem/Citac (2012). As maiores contribuições para a incerteza da concentração de sedimento em suspensão foram às incertezas da precisão intermediária e pesagens das amostras.

Um procedimento para estimar a incerteza de medição de um método espectrofotométrico de UV foi validado para quantificação de desloratadina na formulação de comprimidos. O método espectrofotométrico por UV foi linear (r^2 igual a 0,9972) e preciso (recuperação média de 100,8%). Utilizando o Guia Eurachem/Citac (2012), as incertezas associadas à preparação de desloratadina e soluções de amostra foram as mais significativas, contribuindo com cerca de 54,7 % e 40,9%, respectivamente. Incertezas gerais obtidas usando o Guia Eurachem/Citac (2012) foi 98,2 ± 1,1% (Takano et al., 2017)

Na Espanha, Soto-Ferreiro et al. (2018) desenvolveram um método para determinação da fração bioacessível de cromo em sedimentos marinhos, utilizando pela primeira vez a diluição de isótopos espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado. Os parâmetros como tempo morto do detector, interferências espectrais, fator de discriminação de massa e seleção da relação amostra/pico ideal foram corrigidos para minimizar o erro. A fração de Cr medida se correlacionou bem com a soma do conteúdo certificado da extração sequencial em três etapas do Programa de Padrões, Medidas e Testes, ao analisar o sedimento BCR-701. A estimativa da incerteza foi estudada com base no Guia Eurachem/Citac (2012), propagando juntos os componentes individuais da incerteza da diluição isotópica, obtendo uma incerteza expandida relativa satisfatória de 1,9%. O método proporcionou boa reprodutibilidade (1,4%) e baixo limite de detecção, 16,7 $ng.g^{-1}$.

Na China, Pang et al. (2018) utilizaram os procedimentos descritos no Guia Eurachem/Citac (2012) e avaliaram a incerteza da determinação de resíduos multipesticidas no chá por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa acoplada a três métodos diferentes de pré-tratamento: (1) hidratação do chá + extração por oscilação com acetonitrila + extração líquido-líquido com hexano, (2)

hidratação por chá + extração por oscilação com acetronitrila + extração em fase sólida e (3) extração homogênea por acetonitrila + extração em fase sólida. A comparação conclui que, referente ao componente de incerteza para a recuperação de diferentes métodos e a formação de incertezas, o terceiro método é superior ao primeiro e ao segundo métodos. A principal componente da incerteza foi a repetibilidade, o processo de preparação da quantificação de curvas padrão, a quantificação de curvas padrão e as recuperações.

Vieira Neto, Giordano e Bila (2019) utilizando o Guia para a Expressão da Incerteza de Medição, o GUM, e as diretrizes do Guia Eurachem/Citac (2012), demonstraram que o limite de quantificação para o ensaio de cloro livre pelo método DPD (APHA, 2017) é 0,10 $mg.L^{-1}$, com precisão de 11%, superior ao limite legal de 0,01 $mg.L^{-1}$, estabelecido na resolução Conama nº 357 - Classe II – águas doces (BRASIL, 2005).

Na Grécia, Tzakos et al. (2019) desenvolveram o primeiro método rápido e de baixo custo para quantificar o sunitinibe, inibidor de tirosina-quinase multidirecionado aprovado para o tratamento de carcinoma de células renais e tumor gastrointestinal, no plasma humano e em estudos de captação celular. O método foi validado conforme as diretrizes do Eurochem/Citac (2012). Possui alta sensibilidade com limite de quantificação em 0,1 $ng.mL^{-1}$ e estabelece um protocolo para a avaliação do acúmulo de sunitinibe nas células de glioblastoma M095K. Esse método pode contribuir significativamente para as fases do desenvolvimento no reaproveitamento desse medicamento em diferentes tipos de câncer.

Vassileva et al. (2019), na Polônia, Mônaco e Bélgica, validaram um procedimento analítico para medições simultâneas das frações de massa de Cd, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, Pb e Zn em águas do oceano. A validação inclui estimativas sistemáticas de incerteza combinada nos resultados das medições, conforme os requisitos da norma ISO IEC 17025 e do Guia Eurachem/Citac (2012). Seletividade, faixa de trabalho, linearidade, recuperação (de 93% a 100%, obtida usando o material de referência certificado para vários elementos, produzido pela *National Research Council*, Canada, repetibilidade de 1,5% a 3%, precisão intermediária igual a 2%, limites de detecção (0,06 a 4,0 $ng.kg^{-1}$) foram avaliados sistematicamente. As incertezas expandidas relativas obtidas variaram de 7,0% a 14,0% (k = 2).

Na Índia, Srivastava et al. (2019) validaram o método UPLC que quantifica simultaneamente cinco compostos marcadores bioativos - acteosídeo, isoacteósido,

durantoside-I, quercetina e metilapigenina-7-O-β-D-glucopiranuronato em *D. erecta*, erva valiosa usada no sistema tradicional de medicina na Índia e na China para o tratamento da malária e abscessos. As condições otimizadas de UPLC na coluna de fase reversa Phenomenex Luna® (C18, 2,5µm, 2,0×100mm) e a eluição com gradiente binário resultou em melhor separação para todos os cinco fitoconstituintes. Características de validação: linearidade (r^2 > 0,999), precisão < 2,0%, precisão de 1,62 a 2,59%, recuperação de 99 a 101% e sensibilidade (limite de detecção: 0,27 a 0,40 µg.mL^{-1}; limite de quantificação: 0,90 a 1,35µg.mL^{-1}), atenderam os critérios de *International Conference on Harmonization* (ICH). A incerteza na medição também foi estimada usando o guia Eurochem/Citac (2012) para atender aos requisitos da ISO 17025:2017 (ABNT, 2017).

No México, Méndez et al. (2019) aplicaram a abordagem sugerida pelo guia Eurochem/Citac (2012) para calcular a incerteza de medição da hemoglobina glicada no sangue. Essa abordagem permite a inclusão da imprecisão e incerteza da calibração do método. O valor foi obtido usando dados gerados a partir da avaliação externa da qualidade do *Randox International Quality Assessment Scheme* e do sistema de *software* de gerenciamento de dados *Unity*. A imprecisão foi calculada após a análise diária de dois níveis de soros de controle. Devido aos diferentes resultados de viés obtidos usando dois programas externos diferentes de qualidade, os resultados de U (incerteza expandida) foram significativamente diferentes (± 0,19% versus ± 0,43%) um do outro; no entanto, em ambos os casos, os resultados da incerteza expandida foram inferiores à incerteza máxima sugerida de ± 0,5%.

Na China, Zhang et al. (2020) desenvolveram uma abordagem quantitativa para analisar inseticidas neonicotinóides (NEOs) e fipronils (FIPs) no chá, usando um método modificado, baseado no procedimento de extração em fase sólida dispersiva, com cromatografia líquida de alta resolução e espectrometria de massa. O método foi validado pelas diretrizes da Agência Européia de Medicamentos e do Guia Eurachem/Citac (2012), aplicado com sucesso às amostras de chá para análise de NEOs e FIPs. Para remover interferências da matriz, foram aplicados polivinilpolipirrolidona e adsorvente de troca catiônica forte como adsorventes dispersivos para eliminar polifenóis e cafeína do extrato de chá, respectivamente. Sob ótimas condições, um leve efeito de matriz foi observado para NEOs e PIFs devido às maiores reduções de polifenóis e cafeína (94% e 88%, respectivamente).

Heath et al. (2020) desenvolveram na Eslovênia e Bélgica um método para avaliar a migração de bisfenóis de latas de bebidas e garrafas esportivas reutilizadas, aplicando cromatografia gasosa com espectrômetro de massa com limite de quantificação em $ng.L^{-1}$, recuperação aceitável (78 - 107%) e incerteza estimada (U > 20%, exceto no LQ) seguindo as diretrizes do Guia Eurachem/Citac (2012). Estabeleceram a migração e a estabilidade de doze bisfenóis em dois simuladores de alimentos (C: 20% de etanol e B: 3% de ácido acético), a partir de latas de bebidas (n = 16) e garrafas esportivas reutilizáveis de metal e plástico (n = 51). Latas lixiviaram bisfenol A (< 5865 $ng.L^{-1}$), três isômeros de bisfenol F (8,2 - 1286 $ng.L^{-1}$) e bisfenol AP (1,6 $ng.L^{-1}$), enquanto as garrafas esportivas lixiviaram bisfenol A (< 222 $ng.L^{-1}$) e bisfenol F, bisfenol E , bisfenol B e bisfenol Z (1,1 - 4,6 $ng.L^{-1}$). O simulador C foi mais agressivo que o simulador B, e as concentrações de bisfenóis diminuíram com a exposição consecutiva aos simuladores.

Cindro et al. (2020), na Eslovênia, avaliaram a contribuição do procedimento de amostragem para a estimativa total de incerteza da espectrometria de raios gama de alta resolução de amostras de solo ambiental, água da torneira e filtro de aerossol. A determinação da incerteza da amostragem foi baseada na avaliação do desvio padrão do conjunto de resultados da medição e no orçamento combinado da incerteza da preparação e análise da amostra, com base nas orientações do Guia Eurachem/Citac (2012). Quando as heterogeneidades espaciais e temporais são baixas, a incerteza de amostragem é estimada em cerca de 5% (k = 1) para amostras de solo e 30 a 40% (k = 1) para amostras de ar.

Prenesti et al. (2020), desenvolveram na França e Itália, um estudo que avalia a incerteza de medição da *Capacidade Antioxidante Total* (TAC) do plasma humano estimada pelo método CUPRAC, um método fotométrico que utiliza o par redox Cu (II) / Cu (I) para estimar a capacidade redutora de um fluido. O urato é geralmente usado como molécula de referência no campo da química clínica. A incerteza de medição foi avaliada nos valores de TAC obtidos usando urato e Cu (I), como espécie de referência, e dois aparelhos de medição: um espectrofotômetro visível por UV e um auto-analisador de rotina. As incertezas estimadas estão relacionadas aos efeitos de: curva de calibração, repetibilidade, temperatura, pH, concentração das soluções de estoque de referência, troca eletrônica da reação redox entre Cu (II) e urato. As medições realizadas com o aparelho automático associado ao uso do íon Cu (I) para a calibração fornecem a menor incerteza, u(TAC)/TAC = 0,0094.

2 PARÂMETRO INDICADOR DE MATÉRIA ORGÂNICA – DBO

Em 1908 a "Demanda Bioquímica de Oxigênio" (DBO) foi selecionada como um indicador da poluição dos rios pela *U.K. Royal Commission on River Pollution*. O período para incubação de 5 dias na estimativa da DBO_5 foi definido no teste porque esse era supostamente o tempo que a água do rio levava para viajar de sua fonte ao seu estuário no Reino Unido (GREAT BRITAIN, 1908).

É uma determinação indireta da concentração de matéria orgânica pela demanda de oxigênio exercida por microrganismos por meio da respiração, à temperatura de 20 ± 1ºC, durante incubação de 5 dias, expressa em $mg.L^{-1}$ de O_2. É uma medida que procura retratar em laboratório o fenômeno que acontece no corpo d´água, e os resultados podem variar de acordo com o laboratório, principalmente devido a flutuações na semente, diversidade de microrganismos responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica. (APHA, 2017)

Podem ser citadas algumas aplicações do ensaio DBO, por exemplo: indicador da conformidade da descarga de águas residuais e da eficiência das estações de tratamento dos efluentes e resíduos de acordo com as normas vigentes. Nas estações de tratamento de águas residuais, geralmente a relação entre DBO e DQO (demanda química de oxigênio) indica a fração de biodegradabilidade do efluente. A diferença dos valores de DBO e DQO pode indicar a presença de sólidos suspensos coloidais e sedimentáveis, de substâncias intoxicantes às bactérias, ou matéria orgânica recalcitrante. A razão DBO/DQO pode ser utilizada como parâmetro para o dimensionamento de uma estação de tratamento de águas residuais necessária para uma localização específica (GIORDANO; SURERUS, 2015).

Em águas do mar, os valores de DBO são muito baixos, cerca de 2 $mg.L^{-1}$, e os métodos utilizados para sua análise são pouco desenvolvidos (Simon et al., 2011). A crescente atenção dada à dessalinização da água do mar no ambiente mediterrâneo e fenômenos relacionados, como a bioincrustação de membranas de osmose reversa, estimularam o interesse pela DBO da água do mar perto da costa espanhola. De acordo com Simon et al. (2011) o ensaio de DBO foi refinado com a introdução de uma nova etapa na qual é adicionada uma quantidade crítica de microrganismos autóctones, medidos como trifosfato de adenosina, e permitiu obter

medições confiáveis e replicáveis de DBO, 2,0 ± 0,3 mg.L^{-1} de O_2, padronizadas com soluções de glicose e ácido glutâmico e acetato. Após 7 dias de duração da análise, mais de 80% da DBO final foi alcançada, o que, no caso de compostos facilmente biodegradáveis, representa quase 60% da demanda teórica de oxigênio.

2.1 Medição do oxigênio dissolvido

Alguns métodos são conhecidos para a determinação do oxigênio em meio aquoso, a saber: manométrico, métodos químicos, eletroquímicos e ópticos.

O método manométrico é baseado na variação de pressão ou volume em um recipiente apropriado. É uma metodologia mais complexa com aparelhagem cara, com implicações que requer maior cuidado na aplicação com algumas matrizes ambientais.

A seguir é realizada a descrição dos três métodos utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

2.1.1 Método de Winkler

O método químico clássico adotado amplamente em soluções aquosas é o desenvolvido por Winkler. É um método trabalhoso, e exigem algumas etapas críticas, que devem ser rigorosamente respeitadas (APHA, 2017): fixação do oxigênio dissolvido da amostra, imediatamente após a coleta; utilizar frasco de vidro específico de 300 mL com gargalo esmerilhado para evitar borbulhamento da amostra; amostras em profundidade são coletadas com auxílio de garrafas específicas e imediatamente após a coleta são adicionadas às amostras as soluções de sulfato manganoso e a solução alcalina iodeto-azida.

As reações químicas envolvidas neste método de Winkler são representadas pelas equações de 1 a 10 (SAWYER, 2003):

Quando não há oxigênio dissolvido, um precipitado branco $Mn(OH)_2$ é formado quando sulfato manganoso e solução alcalina iodeto-azida são adicionados à amostra:

$$Mn^{2+}(aq) + 2HO^{-}(aq) \rightarrow Mn(OH)_2\,(s) \quad (1)$$

Se há oxigênio dissolvido presente na amostra, o íon Mn (II) é oxidado a Mn (IV) e precipitado na forma de óxido. A reação é geralmente representada pela Equação 2 e Figura 1.

$$Mn(OH)_2\,(s) + \frac{1}{2}O_2\,(g) \rightarrow MnO_2(s) + H_2O(aq) \quad (2)$$

Figura 1 – Fixação do oxigênio dissolvido pelo método de Winkler

(a) (b)

Legenda: (a) e (b) Precipitação marrom do óxido mangânico após adição de sulfato manganoso e azida sódica.

Fonte: O autor, 2020.

O íon nitrito é um dos interferentes mais frequentes na determinação do oxigênio dissolvido. Sua principal ocorrência é nos efluentes industriais por tratamento envolvendo processos biológicos. Sob estas condições, não há oxidação do íon Mn (II), mas o íon iodeto é oxidado a iodo (I_2). A forma reduzida N_2O_2 é convertida novamente a NO_2^- pela oxidação do oxigênio dissolvido presente na amostra durante a titulação. As reações podem ser representadas pelas Equações 3 e 4:

$$2NO_2^-(aq) + 2I^-(aq) + 4H^+(aq) \rightarrow I_2(aq) + N_2O_2(s) + 2H_2O(aq) \quad (3)$$

$$N_2O_2(s) + \frac{1}{2}O_2(g) + H_2O(aq) \rightarrow 2NO_2^-(aq) + 2H^+(aq) \quad (4)$$

Para eliminar a interferência de nitritos é utilizada azida sódica (NaN_3). Quando o ácido sulfúrico é adicionado ao meio reacional, a concentração de nitrito é destruída conforme Equações 5 e 6:

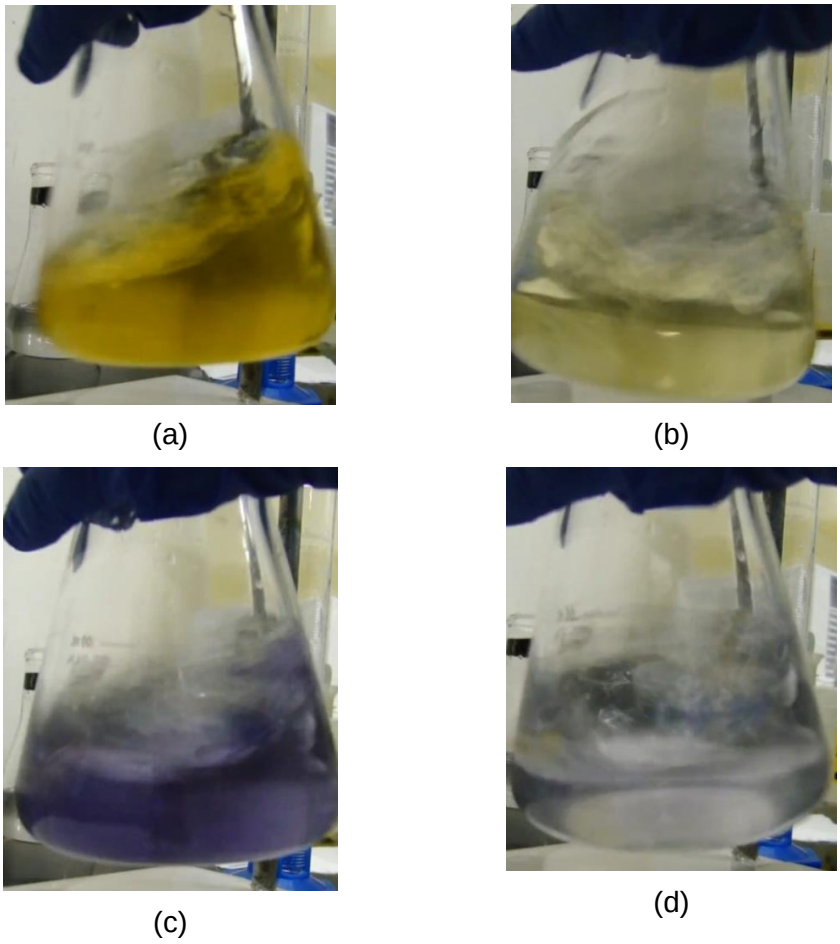
$$NaN_3(aq) + H^+(aq) \rightarrow HN_3(aq) + Na^+(aq) \quad (5)$$

$$HN_3(aq) + NO_2^-(aq) + H^+(aq) \rightarrow N_2(g) + N_2O(s) + H_2O(aq) \quad (6)$$

A outra etapa é a liberação de iodo, que ocorre imediatamente após adição de ácido sulfúrico concentrado, resolubilizando o manganês e o surgimento da coloração amarelada da solução. A intensidade da cor (iodo molecular formado) é proporcional à concentração de oxigênio dissolvido inicialmente na amostra (Figura 2a, 2b). O íon iodeto é oxidado ao iodo molecular, que por sua vez, é proporcional à concentração de oxigênio dissolvido, conforme mostrado na Equação 7:

$$MnO_2(s) + 2I^-(aq) + 4H^+(aq) \rightarrow Mn^{2+}(aq) + I_2(aq) + 2H_2O(aq) \quad (7)$$

Figura 2 – Liberação de iodo após adição de ácido sulfúrico



(a) (b)

(c) (d)

Legenda: (a) e (b) - coloração do iodo liberado após adição do ácido proporcional à concentração de OD na amostra; (c) e (d) - viragem da titulação do iodo liberado pelo método de Winkler.

Fonte: O autor, 2020.

A última etapa é a titulação do iodo liberado contra tiossulfato de sódio (iodometria), expressa pela Equação 8 ou 9:

$$2\mathrm{Na}_2S_2\mathrm{O}_3.5H_2\mathrm{O}\,(\mathrm{aq}) + \mathrm{I}_2\,(aq) \rightarrow \mathrm{Na}_2\mathrm{S}_4\mathrm{O}_6(\mathrm{aq}) + 2\mathrm{NaI}(\mathrm{aq}) + 5\mathrm{H}_2\mathrm{O}(\mathrm{aq}) \quad (8)$$

$$2S_2O_3^{2-}(aq) + I_2(aq) \rightarrow S_4O_6^{2-}(aq) + 2I^-(aq) \quad (9)$$

É utilizada uma solução de amido como indicador para auxiliar a percepção do ponto de viragem de azul para incolor (Figura 2c, 2d).

Os resultados são expressos em mg.L^{-1} de O_2, aplicando a Equação 10 e utilizando o equivalente grama do oxigênio:

$$mg.L^{-1}de\ O_2 = \frac{N_{Na_2S_2O_3} \times V_{Na_2S_2O_3} \times 8000}{mL\ da\ amostra} \quad (10)$$

Sendo:

N – Concentração da solução de tiossulfato de sódio, Eq.L^{-1}.

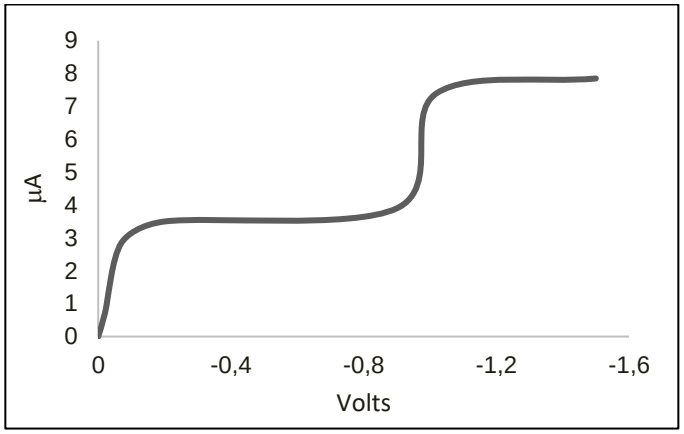
V – Volume da solução de tiossulfato de sódio gasto na titulação, mL.

Além de trabalhoso, o método de Winkler não é muito vantajoso quando aplicado em amostras de águas e de efluentes industriais que apresentem cor, turbidez ou substâncias oxidantes ou redutoras que provoquem interferências ao método químico. Condições específicas de coleta e armazenamento devem respeitadas para garantir ausência de bolhas no interior das garrafas (APHA, 2017).

2.1.2. Sensor eletroquímico – eletrodo de membrana

O oxigênio é uma das substâncias interferentes mais significativas na análise polarográfica, que é reduzida com a utilização de um eletrodo inerte. A interferência é normalmente removida lavando a amostra com um gás não redutível, como nitrogênio. Contudo, aproveita-se a redutibilidade do oxigênio na determinação polarográfica do oxigênio dissolvido. Um polarograma do oxigênio é apresentado na Figura 3. Uma inflexão é observada em torno de – 0,05 V, pela redução do O_2 a H_2O_2, uma segunda inflexão, -0,9 V, corresponde à redução do O_2 a H_2O. Normalmente, o centro do platô entre as duas inflexões é usado para realizar medições quantitativas (SAWYER, 2003):

Figura 3 – Curva típica do O_2 corrente-voltagem



Fonte: Adaptado do SAWYER, 2003.

O princípio do método consiste na célula de Clark (CLARK, 1959) onde uma membrana permeável ao oxigênio separa o eletrólito interno e os eletrodos (catodo e anodo) do meio externo. Com a polarização dos eletrodos, a concentração do oxigênio do meio será proporcional à corrente elétrica.

Para o catodo é utilizado um metal nobre (ouro, prata ou platina) e como anodo utiliza-se um eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl), ambos imersos em solução de eletrolítica de cloreto de potássio 0,1M. As reações envolvidas no sensor eletroquímico são:

A Equação 11 representa a redução do oxigênio no catodo formando íons hidróxido:

$$4\bar{e} + O_2(g) + 2H_2O\,(aq) \rightarrow 4OH^-(aq) \quad (11)$$

Os elétrons para a reação química são fornecidos pela oxidação do eletrodo de Ag, conforme apresentado na Equação 12:

$$4Ag\,(s) + 4Cl^-(aq) \rightarrow 4AgCl\,(aq) + 4\bar{e} \quad (12)$$

O consumo de oxigênio gera um diferencial de pressão parcial de O_2 entre o interior do eletrodo e o meio externo, favorecendo a difusão de O_2 através da membrana do meio externo para a solução eletrolítica. Assim, para cada molécula de O_2 reduzida no catodo são liberados 4 elétrons pelo anodo gerando uma corrente proporcional ao O_2 consumido.

Este método apresenta algumas características operacionais que devem ser respeitadas para melhorar a exatidão dos resultados: remoção de AgCl depositado na superfície do ânodo de prata; reposição da solução eletrolítica; limpeza da membrana da célula eletrolítica para garantir permeabilidade das moléculas de O_2; agitação lenta da amostra durante a medição, sem formação de bolhas, para garantir a difusão de O_2; polarização da sonda; calibração do sensor em ar saturado e comparação com amostras pelo método Winkler (HACH, 2012).

A Figura 4 representa o método que adota um sensor de oxigênio dissolvido polarográfico ou galvânico, geralmente conhecido como eletrodo de membrana ainda utilizado para determinação deste ensaio, em muitos laboratórios e em campo.

Figura 4 - Medidor de oxigênio dissolvido com eletrodo de membrana

(a) (b)

Legenda: (a) Medidor utilizado nos testes; (b) Detalhe do sensor.

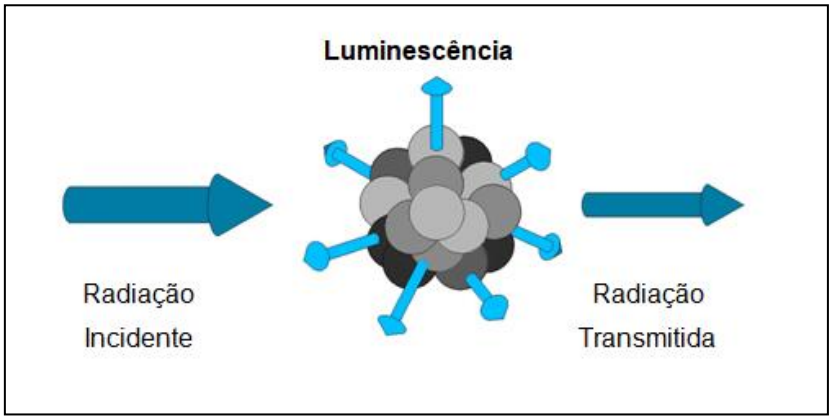
Fonte: O autor, 2020.

2.1.3. Sensor óptico – luminescente

Métodos mais rápidos e automatizados têm sido desenvolvidos nas últimas décadas. Os métodos ópticos, incluindo os espectrofotométricos, são aplicados na quantificação do oxigênio por meio de substâncias que reagem com a amostra desenvolvendo alguma alteração na cor, na absorvância ou fluorescência.

A fluorescência é um processo de fotoluminescência no qual os átomos ou moléculas são excitados por absorção de radiação eletromagnética (Figura 5) e da dissipação de energia por emissão de radiação. A absorção pode causar a excitação do analito para um maior estado de energia. As espécies excitadas então relaxam ao estado fundamental, liberando seu excesso de energia como fótons (luminescência). A emissão ocorre em todos os ângulos, e os comprimentos de onda emitidos correspondem às diferenças de energia entre os níveis (SKOOG, 2016).

Figura 5 - Esquema de fotoluminescência



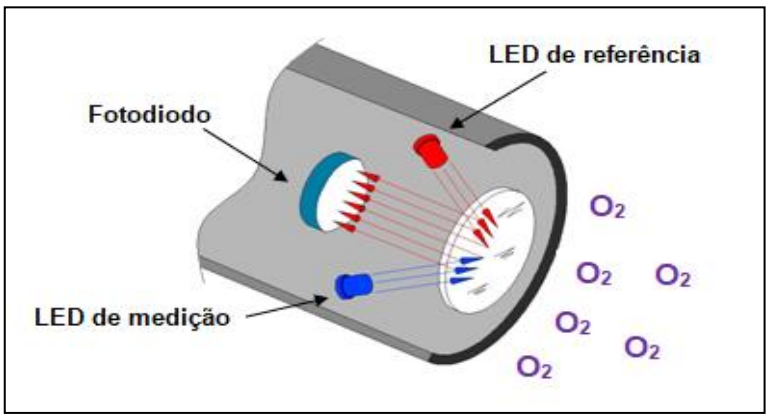
Fonte: Adaptado de SKOOG, 9ª edição, 2016.

Uma das características mais relevantes da fluorescência molecular está na sua sensibilidade. Para determinadas espécies sob condições controladas, a presença de uma única molécula pode ser determinada pela espectroscopia de fluorescência. Contudo, os métodos de fluorescência são pouco aplicados em razão do número limitado de sistemas químicos que fluorescem com intensidade apreciável (SKOOG, 2016).

Quando selecionada uma combinação adequada de um polímero fotoluminescente e um comprimento de onda de excitação, a intensidade da luminescência e o tempo que esta leva a desaparecer dependerão da concentração de O_2 da amostra em contacto com o polímero fotoluminescente. A luz azul pulsada de alta energia é transmitida por um LED até o polímero fotoluminescente, para o qual transfere parte da sua energia radiante. Alguns dos elétrons do polímero fotoluminescente saltam do nível de energia fundamental para um nível mais elevado. Em micro segundos, os elétrons voltam ao nível fundamental, passando por

uma série de níveis intermédios e emitindo a energia que perdem sob a forma de luz vermelha, ilustrada na Figura 6 (HACH, 2012, 2014).

Figura 6 - Princípio do funcionamento do sensor por luminescência.



Fonte: Adaptado da HACH, 2012.

Quando as moléculas de oxigênio se encontram em contato com o polímero fotoluminescente, ocorrem dois efeitos: (1) As moléculas de oxigênio são capazes de absorver a energia dos elétrons do nível mais elevado, permitindo-lhes voltar ao nível energético fundamental sem emissão de luz vermelha; (2) Quanto maior a concentração de oxigênio, maior a redução na intensidade da luz vermelha emitida e mais rápido os elétrons abandonam o nível de energia excitado. Logo, o tempo de vida da luz vermelha emitida é diminuído (HACH, 2012).

Neste trabalho foi utilizado um medidor por luminescência (Figura 7):

Figura 7 - Medidor de oxigênio dissolvido por luminescência

(a)

(b)

Legenda: (a) Medidor de O_2; (b) Detalhe da sonda.

Fonte: O autor, 2020.

2.2. Incerteza de medição:

A declaração de qualquer resultado de uma medição físico-química ou biológica é completa quando o valor atribuído ao mensurando estiver associado à sua incerteza de medição.

O documento mais adotado internacionalmente como referência para o estabelecimento da incerteza de um resultado de medição é o "*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement"* (GUM, 2008). De acordo com o guia, a incerteza de medição compreende muitos componentes. Alguns podem ser estimados com base na distribuição estatística dos resultados de séries de medições e podem ser caracterizados por desvios padrão experimentais. Outros são avaliados por meio de distribuições de probabilidade supostas, baseadas na experiência ou em outras informações. A incerteza de medição pode ser entendida como a indicação quantitativa da dúvida inerente ao processo de medição do resultado analítico. Assim, é mais bem embasada a tomada de decisão para verificar a conformidade do resultado em relação a uma especificação de interesse.

No Brasil, a estimativa de incerteza ainda é uma tarefa complexa e pouco difundida. Ainda que o valor exato de uma medição, seja acompanhado de dúvida, é possível mensurá-la, com um determinado nível de confiança.

O manual INMETRO-DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016) estabelece que as características de desempenho do método devam estar claramente declaradas e incluir, quando aplicável: sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez e incerteza de medição. Por definição, o limite de detecção (LD) é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança se a concentração do analito é maior que zero. O limite de quantificação refere-se à menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão. Pode ser considerado como a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais cinco, seis ou 10 desvios padrão. Algumas vezes é também denominado "Limite de Determinação".

Na avaliação da estimativa de incerteza devem-se investigar todas as possíveis fontes de incerteza, e analisadas suas influências no resultado. As principais fontes de incerteza em ensaios químicos podem ser consideradas a partir

do guia Eurachem/Citac (2012): qualificação do analista no ensaio, amostragem, condições de armazenamento, efeitos aleatórios, validação do método analítico, propriedades e condição do item ensaiado, condições ambientais, calibração de equipamentos, incerteza de massas e materiais volumétricos, desvios na leitura de instrumentos, pureza dos reagentes, uso dos materiais de referência apropriados e registro dos procedimentos operacionais.

A seguir são comentadas algumas fontes de incerteza (EURACHEM, 2012):

Amostragem: Variações aleatórias entre diferentes amostras e tendências na coleta das amostras geram componentes de incerteza que afetam o resultado.

Condição Ambiental: Efeitos de temperatura, pressão e umidade devem ser corrigidos. Por exemplo, podem existir incertezas associadas à temperatura dos líquidos e dos materiais, com dilação térmica de vidraria, que devem ser consideradas.

Pureza de reagentes: Os fabricantes de reagentes declaram a pureza destas substâncias, que por não serem totalmente puros, devem ser corrigidos e analisados criteriosamente pelo laboratório.

Estequiometria: Fundamental considerar a estequiometria do processo analítico, assim como se as reações envolvidas são incompletas ou secundárias.

Ensaio Branco: Existem incertezas associadas na determinação do branco quanto na correção dos resultados.

Efeitos instrumentais: A calibração dos equipamentos, instabilidade ocasionada por falta de manutenção, ruídos, contaminação cruzada por outras amostras, são exemplos desta influência.

Modelos matemáticos: Definir a melhor equação para realizar os cálculos analíticos é uma tarefa crucial para não introduzir fontes de erros e influenciar diretamente no resultado. Por exemplo, uma calibração linear numa resposta não linear conduz a ajuste deficiente e maior incerteza.

A contribuição de cada componente de incerteza de um resultado de medição é expressa como incerteza padrão (desvio padrão). Basicamente, as componentes de incerteza podem ser agrupadas em duas, de acordo com o tipo de avaliação: Tipo A ou Tipo B, conforme documento NIT DICLA 21.Rev10 (INMETRO, 2020) e Eurachem/Citac (2012).

2.2.1. Avaliação tipo A da incerteza padrão

De acordo com a norma NIT DICLA 21.Rev10 (INMETRO, 2020), avaliação Tipo A é proveniente da avaliação da precisão e exatidão de um método, e são realizadas observações independentes da grandeza de entrada. Na prática, é aquela em que o analista que realiza os ensaios é o responsável por gerar os resultados. Sendo assim, para a grandeza de entrada (x_i) determinada a partir de n medições independentes, a média aritmética dos resultados das medições (x), é usada como estimativa da grandeza de entrada (x_i).

Quando os n valores obtidos forem resultados médios de medições de x_i, a melhor estimativa da incerteza padrão do Tipo A é dada pelo desvio padrão da média $s(x)$, obtida conforme Equação 13:

$$u_A = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} \tag{13}$$

Para que a média e o desvio padrão sejam boas estimativas da posição central e da dispersão de uma distribuição, respectivamente, os resultados das medições devem ser normalmente distribuídos e sem valores discrepantes.

2.2.2. Avaliação tipo B da incerteza padrão

De acordo com a norma NIT DICLA 21.Rev10 (INMETRO, 2020), para uma estimativa (x_i) de uma grandeza de entrada (X_i) que não tenha sido obtida através

de observações repetidas, a incerteza-padrão u(x_i) é avaliada por julgamento científico baseando em todas as informações disponíveis sobre a possível variabilidade de X_i. Os dados são fornecidos em dados de medições prévias, certificados de calibração, manuais de fabricante ou literatura científica, e não podem ser alterados pelo responsável pelo ensaio. Por conveniência, são referidos como incerteza-padrão do Tipo B.

Se a estimativa x_i for obtida de uma especificação do fabricante, certificado de calibração, manual técnico ou outra fonte e sua incerteza citada for declarada ser um determinado múltiplo de um desvio padrão, a incerteza padrão u(x_i) é simplesmente o valor mencionado dividido pelo multiplicador, e a variância estimada $u^2(x_i)$ é o quadrado desse quociente. A avaliação do Tipo B da incerteza padrão pode ser tão confiável quanto uma avaliação do Tipo A, especialmente numa situação de medição onde uma avaliação do Tipo A é baseada em um número comparativamente pequeno de observações estatisticamente independentes.

2.2.3. Distribuição de probabilidades

O guia para Expressão da Incerteza de Medição (JCGM 200, 2008) apresenta alguns tipos de distribuição de probabilidade para os valores estarem dentro dos seus limites em relação ao ponto médio. Geralmente as distribuições utilizadas são: retangular, triangular e normal, a saber:

(a) Distribuição Retangular:

Aplica-se nas situações: quando não se tem informação sobre a natureza do componente, leitura das medições em equipamentos digitais, medição das variações de volume devido à diferença de temperatura, exatidão declarada dos equipamentos e nas vidrarias não classe A.

(b) Distribuição Triangular:

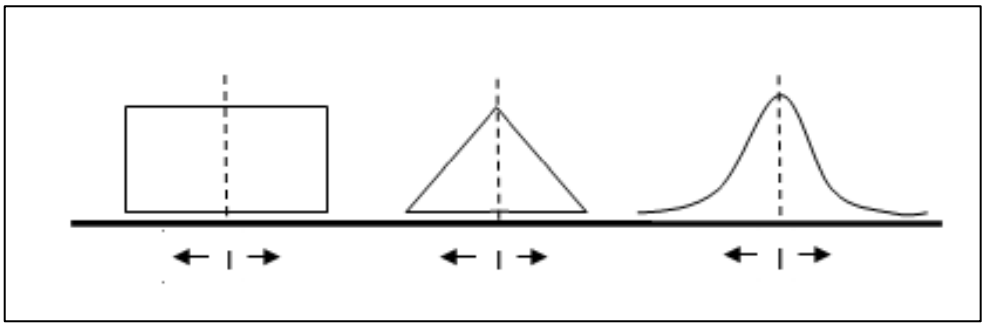
Aplica-se nas situações: vidrarias, equipamentos e instrumentos calibrados, leitura em equipamentos analógicos e valores próximos do centro são mais prováveis do que próximos dos limites.

(c) Distribuição Normal:

É aquela em que a média se situa no centro de um intervalo e os pontos extremos são eventos menos prováveis de acontecerem. Expressa por um gráfico simétrico que possui a forma de sino, também chamado de curva gaussiana. Aplica-se nas situações: (i) quando está declarada no certificado de calibração; (ii) adota-se a distribuição normal para dados obtidos em certificados de calibração, em manuais de equipamentos, em especificações de fabricantes, e outros, em que o valor médio e seu intervalo são declarados juntamente com o fator de abrangência (k) e o nível de confiança 95% ou outro percentual adotado.

A Figura 8 representa a estimativa do valor de uma grandeza de entrada e a avaliação da incerteza dessa estimativa decorrente das distribuições de probabilidade da forma como um componente de medição está distribuído e depende da natureza do componente.

Figura 8 - Representação dos intervalos de confiança para as distribuições de probabilidade



Fonte: Adaptado do GUM, 2008.

Para obtenção da incerteza padronizada, u(y), divide-se o valor de cada contribuição de incerteza pelo desvio padrão, σ, obtido pela metade do intervalo de confiança, L, da distribuição de probabilidade, para um nível de confiança declarado.

2.2.4. Definindo um fator de abrangência

O valor do fator de abrangência k é escolhido com base no nível da confiança requerido para o intervalo y - U a y + U. Em geral, k estará entre 2 e 3. Para este

trabalho foi adotado o fator k igual a 2 para um intervalo de confiança de 95,45%, conforme norma NIT DICLA 21.Rev 10 (INMETRO, 2020).

Para estudos específicos, o valor do fator de abrangência k que produz um intervalo correspondente a um nível especificado da confiança p, requer-se um conhecimento detalhado da distribuição de probabilidade caracterizada pelo resultado da medição e sua incerteza-padrão combinada. Alguns exemplos são dados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Valor do fator de abrangência k para uma distribuição normal.

Nível de confiança %	Fator de abrangência (K)
68,27	1
90	1,645
95	1,960
95,45	2
99	2,576
99,73	3

Fonte: Adaptado do GUM, 2008.

Tabela 2 - Divisores para distribuições de probabilidades distintas

Distribuição	Nível de confiança	Fator
Normal	95,45%	2
Retangular	100%	$\sqrt{3}$
Triangular	100%	$\sqrt{6}$

Fonte: Adaptado do GUM, 2008.

A dispersão dos valores das estimativas das grandezas de entrada independentes $x_1, x_2, x_3, \dots, x_N$fornece a dispersão da estimativa da grandeza de saída y. Através da combinação apropriada das variâncias, calcula-se a partir da Equação14a incerteza padronizada combinada, $u_c\,(y)$ conforme norma NIT DICLA 21.Rev 10 (INMETRO, 2020).

$$u_c\,(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^{m} u_i^2\,(y)} \tag{14}$$

A grandeza $u_i(y)$ $(i = 1, 2, 3, \dots, N)$ é a contribuição à incerteza padrão associada à estimativa de saída y, resultante da incerteza padrão associada à estimativa de entrada x_i.

Estabelecido o critério de confiança, calcula-se pela Equação 15 a incerteza expandida, U, multiplicando-se a incerteza padrão combinada pelo fator de abrangência k, ou seja:

$$\mathrm{U} = \mathrm{k} \,.\, \mathrm{u_c}\,(\mathrm{y}) \tag{15}$$

Essa multiplicação pelo fator de abrangência k não fornece nenhuma informação adicional; sendo apenas uma nova forma de representar a incerteza final associada a um nível da confiança, conforme a Norma NIT DICLA 21.rev10 (INMETRO, 2020).

2.2.5. Expressando a incerteza

O Guia para Expressão da Incerteza de Medição (JCGM 200, 2008) orienta que o resultado da medição pode ser expresso de diversas maneiras, quando a medida da incerteza é a incerteza padrão combinada $u_c(y)$ ou incerteza expandida $\mathrm{U} = \mathrm{k} \,.\, u_c(y)$. Neste último caso, o resultado é expresso pela Equação16:

$$Y = y \pm U \tag{16}$$

Isto significa que a melhor estimativa do valor atribuível ao mensurando Y é y, com o intervalo $[y - U$ a $y + U]$ no qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores atribuídos a Y. Ainda ao relatar o resultado de uma medição, deve-se fornecer uma descrição completa de como o mensurando Y é definido, fornecer as unidades de y e U, fornecer o valor de k usado para obter U e o nível de confiança.

2.3 Validação

Os ensaios para determinar os parâmetros de validação devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações e devidamente calibrados, para confirmar se os métodos são apropriados para atender às necessidades de uma determinada aplicação ou área de aplicação.

O Manual DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016) e as diretrizes do guia Eurachem/Citac (2012) estabelecem que as características de desempenho do método devam estar claramente declaradas e incluir, quando aplicável: seletividade, linearidade, faixa de trabalho, faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), tendência/recuperação, precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez

Normalmente a robustez é um procedimento opcional, realizado previamente à validação do método, na etapa de otimização do método.

Neste trabalho, por se praticar métodos normalizados, os parâmetros de interesse foram os limites de detecção e quantificação e a estimativa da incerteza de medição.

2.3.1. Limite de Detecção

O limite de detecção pode ser calculado de acordo com a Equação 17, conforme definida no manual DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016):

$$LD = \bar{X} + t_{(n-1;1-\propto)}.s \quad (17)$$

Sabendo que:

$\bar{X}$ = Média dos valores dos brancos;

s = desvio padrão do branco em replicata;

t = valor da abscissa t de Student (7 replicatas, 95,45% de confiança);

n-1 = grau de liberdade;

1-α = nível de confiança

2.3.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação foi determinado a partir de ensaios de sete (7) replicatas de branco. O limite de Quantificação (LQ) adotado corresponde ao resultado da Equação 18, conforme definida no Manual DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016):

$$LD = \bar{X} + 10.s \quad (18)$$

2.3.3. Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Pode ser expressa como o desvio padrão ou coeficiente variação (cv %) ou desvio padrão relativo (DRP), utilizou-se a Equação 19 para sua determinação, conforme definida no Manual DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016):

$$\text{cv} = \left(\frac{S}{\text{CMD}}\right) \text{ x } 100 \quad (19)$$

Sabendo que:

s = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

2.3.4. Exatidão (recuperação)

A exatidão pode ser definida como a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor aceito como referência e convencionalmente verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência).

A exatidão é avaliada numericamente através da tendência, definida como a diferença entre a média de repetições e um valor de referência. Utilizou-se a Equação 20 para o cálculo da recuperação, (APHA, 2017):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Valor encontrado}}{\text{Valor verdadeiro}} \times 100 \qquad (20)$$

2.3.5. Tendência (z score)

O índice Z score é um modo de avaliar o desempenho do laboratório em comparações interlaboratoriais e pode ser definido pela Equação 21, conforme definida no Manual DOQ-CGCRE-008.Rev05 (INMETRO, 2016):

$$z = \frac{X_{lab} - X_v}{\sigma} \qquad (21)$$

Sendo:

X_{lab} = Média dos valores obtidos experimentalmente

X_v = Valor aceito como verdadeiro

σ = desvio padrão do ensaio de proficiência

Sabendo que o critério de avaliação é:

$\lvert z \rvert \leq 2$	Satisfatório
$2 < \lvert z \rvert < 3$	Questionável
$\lvert z \rvert \geq 3$	Insatisfatório

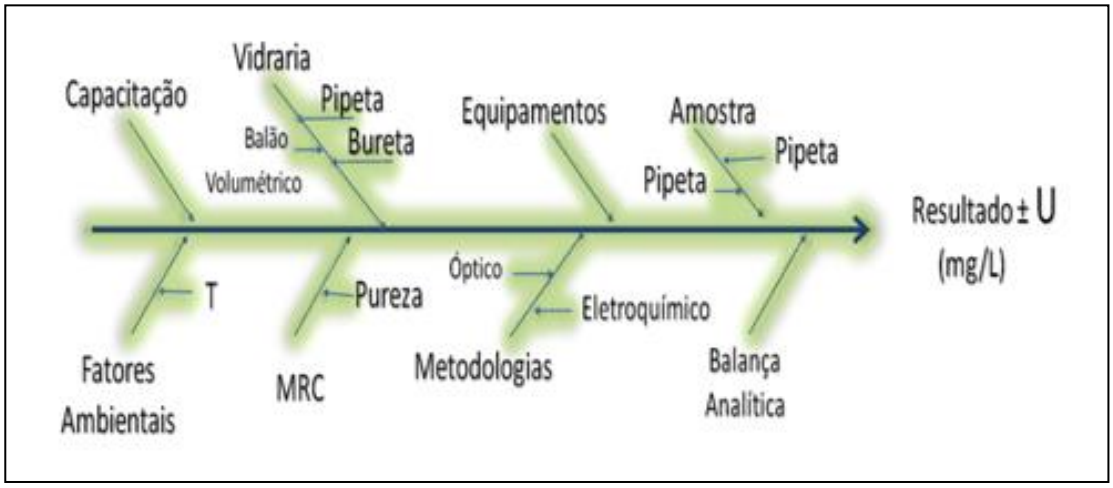
Além dos controles intralaboratoriais, os laboratórios acreditados demonstram sua competência técnica na realização de ensaios, calibrações, exames e/ou amostragens por meio da participação com desempenho satisfatório em atividades de ensaios de proficiências, conforme define a norma INMETRO-NIT DICLA 026.Rev13 (INMETRO, 2020).

2.4 Abordagem para estimar a incerteza de medição

O diagrama de Ishikawa é uma ferramenta da qualidade, também chamada de diagrama de espinha de peixe ou diagrama causa-efeito, muito usada por não especialistas para determinação das diversas causas que podem levar a dada consequência, analisando todos os fatores que envolvem a execução do processo. (ASQ, 2020) É uma ferramenta muito utilizada para a avaliação das fontes de incerteza envolvidas em um método, que possibilita identificar, simplificar e agrupar as incertezas do procedimento (Eurachem, 2012).

De acordo com o guia Eurachem/Citac (2012), os principais componentes para se estimar a incerteza de medição associada ao resultado de um ensaio (Figura 9) são: especificar o mensurando, identificar as fontes de incerteza, quantificar as componentes de incerteza, avaliar as incertezas padrão do tipo A, avaliar as incertezas padrão do tipo B, determinar a incerteza padrão combinada, determinar a incerteza expandida, analisar as contribuições das incertezas e expressar o resultado.

Figura 9 - Fontes de incerteza ilustradas no Diagrama de Ishikawa



Fonte: Adaptado do Guia Eurachem/Citac, 2012.

3 METODOLOGIA

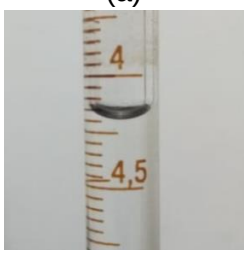
O ensaio de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foi realizado conforme método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017).

3.1 Cuidados na realização do ensaio DBO

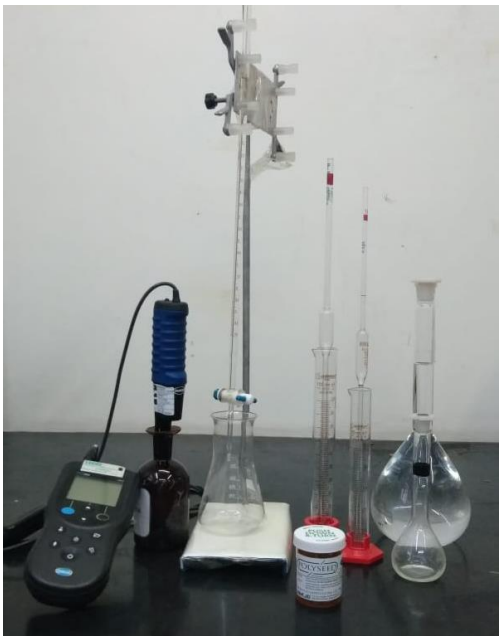
Para a realização dos ensaios foram utilizados equipamentos e reagentes disponíveis em um laboratório de engenharia sanitária, com sistema de qualidade implantado e acreditado pela CGCRE-INMETRO, localizado no Rio de Janeiro, conforme os requisitos da norma NBR ISO 17025:2017 (ABNT, 2017). A Figura 10 ilustra as principais fontes de contribuição do laboratório para a estimativa de incerteza no resultado da DBO.

Figura 10 – Algumas fontes de incerteza Tipo B da DBO

(a)



(b)



(c)

Legenda: (a) Balança analítica; (b) Leitura de menisco
(c) Vidrarias, reagentes, medidor de oxigênio dissolvido.

Fonte: O autor, 2020.

Os materiais de referências certificados (MRC) são dos fornecedores Inorganic Ventures, ERA e NSI LAB, que atendem aos requisitos definidos na norma NBR ISO 17034:2016 (ABNT, 2017). Outros reagentes comerciais das marcas Merck e Qhemis, com grau de pureza definido também foram utilizados no preparo das soluções utilizadas nos ensaios de DBO.

Todos os procedimentos adotados nos testes de DBO assim como a lista de equipamentos e reagentes estão descritos na metodologia que consta no Anexo A.

A medição do oxigênio dissolvido é realizada antes e depois da incubação e o valor da DBO é calculado pela diferença entre as medições do OD, proporcional ao fator de diluição da amostra, conforme Equação 22:

$$DBO_5,\ mg.L^{-1}\ de\ O_2 = \frac{[(D_1 - D_2) - (S) \times V_s] \times V_m}{V_a} \quad (22)$$

Sabendo que:

D_1: OD inicial da amostra, em $mg.L^{-1}$ de O_2;

D_2: OD final da amostra após 5 dias de incubação a 20 $\pm$ 1 ºC, em $mg.L^{-1}$ de O_2;

S: Depleção de oxigênio da semente (diversidade de microrganismos responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica). É calculada pela variação do OD por mL de suspensão de semente adicionada por garrafa (S=0 se as amostras não forem semeadas);

V_s: Volume da semente no respectivo frasco de DBO, em mL;

V_m: Volume médio da garrafa de DBO, em mL;

V_a: Volume de amostra, em mL.

Geralmente são comercializados frascos DBO com volume nominal declarado de 300 mL. De modo a eliminar esta fonte de erro, o volume de cada frasco foi aferido e o valor correto utilizado no cálculo da DBO. O Apêndice B apresenta os volumes aferidos de alguns frascos DBO utilizados neste trabalho.

Amostras de certas atividades industriais, com presença de metais tóxicos, cloro livre, peróxidos, agentes redutores, orgânicos recalcitrantes ao tratamento biológico ou outro material tóxico demandam tratamento preliminar para eliminar interferência na semente. Geralmente a própria diluição da amostra reduz a interferência de materiais tóxicos. Estas substâncias inibidoras devem ser

verificadas, e removidas, bem como manter registrado no relatório de ensaio para analisar criticamente os resultados obtidos.

Para os efluentes industriais brutos, com alta temperatura ou com valores extremos de pH ou que não contenham população microbiana suficiente, para tais despejos, semeou-se a água de diluição contendo nutriente e adicionou-se uma população de microrganismos. Amostras com alcalinidade (pH > 8) ou acidez (pH < 6) podem produzir a desnaturação de proteínas e, consequentemente, a inativação da maioria das enzimas. O método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017) preconiza que o pH de cada amostra seja verificado, se necessário, neutraliza-se as amostras para a faixa de pH entre 6,5 a 7,5. Utiliza-se solução de ácido sulfúrico 1 N ou solução hidróxido de sódio 1 N (ou concentrações diferentes), de tal modo que a quantidade de reagente adicionada não dilua a amostra por mais de 0,5%.

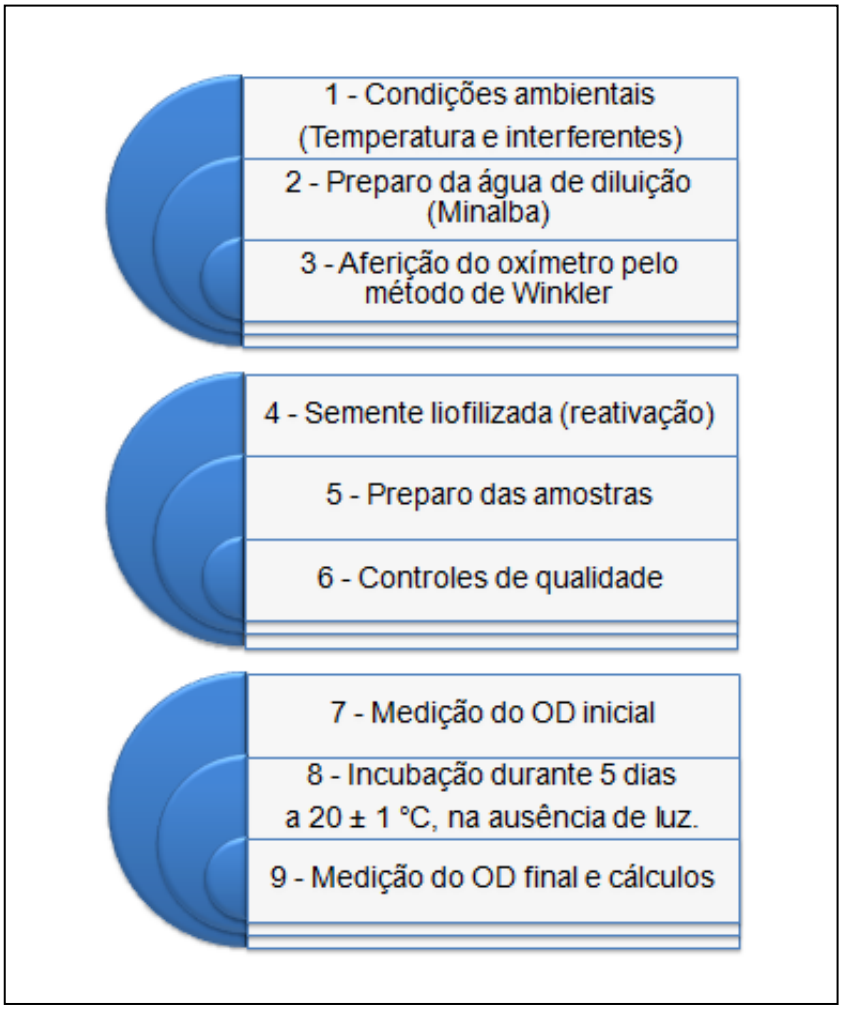
Amostras supersaturadas com oxigênio, que contenham mais de 9 $mg.L^{-1}$, podem causar perda de oxigênio durante a incubação e superestimando a DBO. Neste caso registra-se esta condição junto com o resultado fornecido.

A temperatura é outro fator importante que costuma ser fonte de erro para o ensaio DBO. O método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017) estabelece condições críticas de controle do laboratório para o ensaio de DBO, e informa que devem ser garantidas as temperaturas das etapas: aclimatizar a água de diluição a 20 ± 1°C; pré-tratamento da amostra a 20 ± 3°C; preparo da água de diluição a 20 ± 3°C; manuseio das amostras a 20 ± 3°C; incubação das amostras a 20 ± 1°C; diariamente deve-se verificar a temperatura da incubadora e a amostra deve ser analisada logo após a coleta, caso contrário, armazená-la em temperatura de 4 ± 2°C;

Nestes testes foram utilizadas sementes liofilizadas Polissed da MERK, e mantendo os procedimentos preconizados no método, não houve inibição da demanda de compostos nitrogenados. O valor corresponde a demanda de oxigênio após o 5° dia de incubação 20 ± 1°C, isento de luz.

A Figura 11 apresenta os itens críticos que requer cuidadosa execução conforme definido no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017) para a determinação da DBO.

Figura 11 – Itens críticos do método 5210 (B) 5 - Day BOD Test



Fonte: O autor, 2020.

A temperatura das amostras, geralmente mantidas frias entre a etapa da coleta, transporte e entrada no laboratório, deve ser ajustada para a temperatura do laboratório 20 ± 3°C e o pH entre 7,0 a 7,2, conforme preconiza a metodologia.

A Figura 12 ilustra o recipiente utilizado dentro do laboratório para manter os frascos de DBO imersos em água aclimatizada, visto que, durante o período de incubação, a abertura de porta da incubadora favorece a troca térmica.

Figura 12 – Acondicionamento dos frascos DBO

Fonte: O autor, 2020.

A verificação da temperatura é realizada utilizando termômetro calibrado com multicanais imersos durante a incubação (Figura 13).

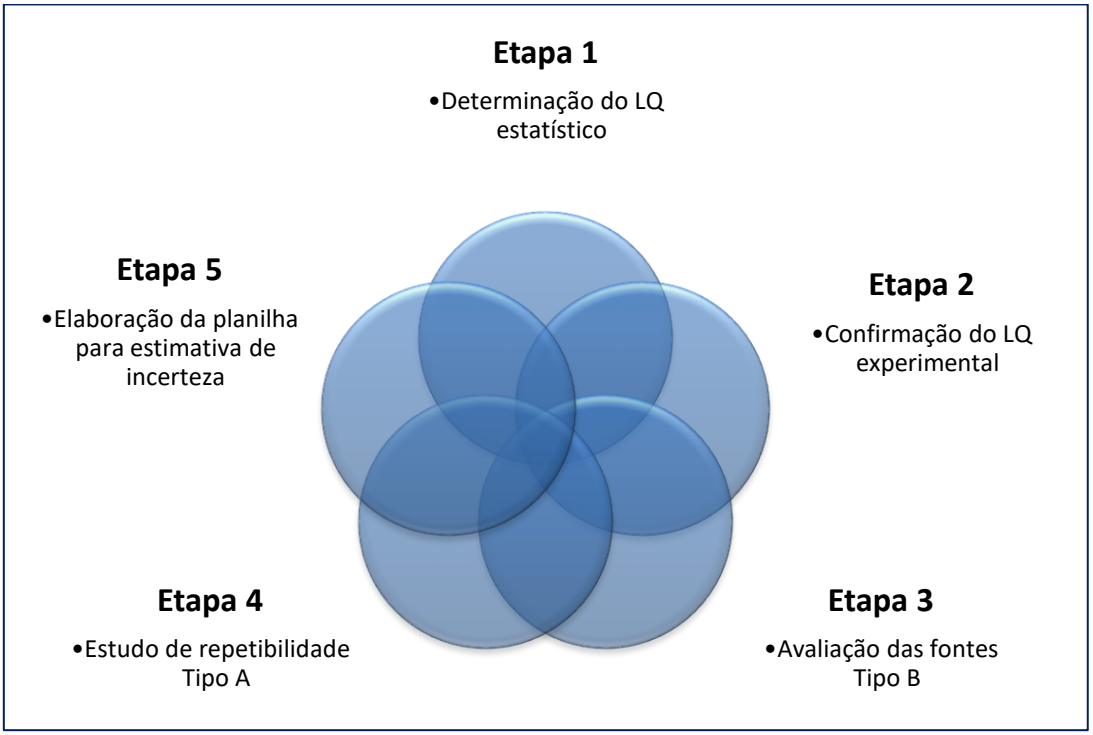
Figura 13 – Temperatura da incubadora DBO

Fonte: O autor, 2020.

A sala do ensaio DBO deve ter a temperatura controlada para minimizar o risco do desenquadramento. A temperatura é verificada diariamente, quando necessário, o controlador é ajustado de modo a garantir a faixa de 20 ± 1°C.

O desenvolvimento deste estudo foi fundamentado em 5 etapas, incluindo as avaliações das fontes Tipo A e Tipo B, e testes com matrizes distintas utilizadas na rotina do laboratório de engenharia sanitária (Figura 14):

Figura 14 – Etapas envolvidas neste estudo para a estimativa da incerteza



Fonte: O autor, 2020.

3.2 Etapa 1 - Determinação do LD e LQ

De acordo com APHA, WEF e AWWA (2017), o limite de detecção para o ensaio DBO também pode ser estimado em função das matrizes, conforme apresentado na Tabela 3:

Tabela 3 - Estimativas para o limite de detecção em função das matrizes

Condição	Origem	Cálculo do LD
Amostras diluídas e sem adição de sementes	Esgoto sanitário	2 $mg.L^{-1}$ x F
Amostras diluídas e com adição de semente	Efluente bruto e tratado; afluente; chorume; esgoto sanitário; águas de canal, lagoas e rios	1 $mg.L^{-1}$ – correção da semente
Amostras não diluídas e sem adição de sementes	Branco da água de diluição do ensaio de DBO, sem sementes	$\sim$ 0,1 $mg.L^{-1}$
Amostras não diluídas e com adição de sementes	Águas de rio pouco poluído ou nascente	ΔOD – Correção da semente

Fonte: O autor, 2020.

Sabendo que:

F = fator de diluição

ΔOD = variação de oxigênio dissolvido (depleção da amostra)

Outro fator limitante para obtenção de baixos valores do limite de detecção está associado à qualidade da água utilizada no ensaio do branco.

Inicialmente foram realizados testes de repetibilidade e reprodutibilidade na determinação do branco da água reagente utilizada no ensaio DBO, adotando o método Winkler para a quantificação do oxigênio dissolvido. Dez replicatas independentes foram preparadas por dois analistas distintos, A e B. Cada analista utilizou a água mineral e água desionizada produzida pelo laboratório, adotando todo o cuidado no armazenamento da água reagente e no processo de aeração para evitar contaminação cruzada no laboratório. A composição da água mineral encontra-se descrita na Tabela 4, conforme processo DNPM n° 805.163/1971, portaria de Lavra n° 679 de 12/05/1987, Boletim n° 453/LAMIN/CPRM-SP.

Tabela 4 - Composição química da água mineral utilizada como água de diluição no ensaio DBO

Parâmetros	Valor
Bário, $mg.L^{-1}$	0,018
Bicarbonato, $mg.L^{-1}$	110,78
Cálcio, $mg.L^{-1}$	16,8
Cloreto, $mg.L^{-1}$	0,11
Estrôncio, $mg.L^{-1}$	0,02
Fluoreto, $mg.L^{-1}$	0,05
Magnésio, $mg.L^{-1}$	11,1
Nitrato, $mg.L^{-1}$	0,77
Sódio, $mg.L^{-1}$	1,21
Sulfato, $mg.L^{-1}$	0,13
Características Físico-Químicas	
pH a 25°C	7,76
Temperatura da água na fonte, °C	17,9
Condutividade a 25ºC, $\mu S.cm^{-1}$	143,5
Resíduo de evaporação a 180ºC, $mg.L^{-1}$	109,95
Radioatividade na fonte a 20°C e 760 mm de Hg	9,79

Fonte: Autor, 2020.

O analista A possui experiência de sete anos nos ensaios físico-químicos, e o analista B tem pouco mais de um ano de treinamento no ensaio DBO.

O recipiente para armazenamento da água de diluição foi devidamente descontaminada com solução de hipoclorito de sódio 5%, enxague com água em abundância, em seguida com água quente, e rinsada novamente com a água a ser testada. Durante o processo de aeração o ar atmosférico é lavado por uma solução de dicromato de potássio 2% e por elementos filtrantes e dessecantes, durante 10 minutos. A água de diluição foi mantida em repouso por 1 hora na incubadora de DBO até o início do teste.

Testes de repetibilidade foram conduzidos com o analista A, reproduzindo a melhor condição de rotina do laboratório. Foram preparadas três séries de sete replicatas independentes do branco utilizando água mineral. O oxigênio dissolvido foi quantificado por três metodologias: Winkler, por luminescência e eletrodo com membrana.

O limite de detecção foi estimado estatisticamente a partir da Equação 17, e o limite de quantificação, pelo uso da Equação 18, utilizando os resultados das replicatas dos brancos.

3.3 Etapa 2 - Investigação do LQ experimental

Para determinar experimentalmente o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método preparou-se soluções de 1; 2; 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2, a partir de glicose e ácido glutâmico, grau PA e material de referência certificado (MRC), para calcular os dados estatísticos.

Solução de Glicose e Ácido Glutâmico (GGA): Secou-se os reagentes glicose e ácido glutâmico grau reagente, a 103ºC por 1h. Em balão volumétrico, adicionou-se 150 mg de glicose e 150 mg de ácido glutâmico a água e com água completou-se o volume até 1L (solução mãe). A solução foi preparada imediatamente antes do uso a menos que a solução seja mantida em condição estéril. Em seguida, a partir da solução mãe, preparou-se de modo independente as sete replicatas das concentrações de 1; 2; 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2, utilizando pipetas e balões volumétricos calibrados. Paralelamente, a partir do material de referência certificado da marca Inorganic Venture, 1000 $mg.L^{-1}$ de O_2 preparou-se sete replicatas para cada concentração 1; 2; 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2. Todas as soluções são mantidas armazenadas em geladeira com temperatura inferior a 6ºC.

O limite de quantificação experimental foi avaliado a partir dos testes de repetitividade. Preparou-se duas séries de sete replicatas para cada solução padrão de 1; 2; 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2. Cada série de padrão teve o oxigênio dissolvido medido com o oxímetro por eletrodo com membranas e por luminescência, respectivamente.

3.4 Etapa 3 - Análise das fontes de incerteza – Tipo B

A estimativa Tipo B da incerteza padrão foi obtida pela análise dos certificados de calibração e manuais de fabricante dos equipamentos e reagentes disponíveis no laboratório de engenharia sanitária. Nestes documentos a incerteza declarada é múltiplo de determinado desvio padrão, logo, a incerteza padrão $u(x_i)$ é simplesmente o valor mencionado dividido pelo multiplicador, e a variância estimada $u^2(x_i)$ é o quadrado desse quociente conforme norma NIT DICLA 021. Rev10 (INMETRO, 2020).

Importante destacar que a periodicidade da calibração RBC é definida pelo laboratório acreditado levando em considerações as normativas disponíveis no INMETRO (2019), as condições do instrumento e o nível de serviço oferecido a seus clientes, entre outros parâmetros. Por exemplo, a validade da verificação em balança é de 1 (um) ano, conforme estabelece o item 11 (validade da verificação) do Regulamento Técnico Metrológico aprovado pela Portaria n° 236 (INMETRO, 1994).

Visando assegurar a rastreabilidade metrológica das medições, o laboratório utiliza materiais de referência certificados na rotina dos ensaios, conforme estabelece a norma NIT DICLA 30-Rev12 (INMETRO, 2020). Cabe ao laboratório determinar com base no histórico das calibrações e estado de conservação dos equipamentos uma análise crítica da conformidade do item para a aplicação pretendida, garantindo a rastreabilidade metrológica, e não comprometer a qualidade do resultado oferecido dentro dos limites definidos na especificação. Por exemplo, a ASTM E287-02 estabelece padrões para buretas de vidro. (ASTM, 2019).

3.5 Etapa 4 - Repetibilidade para matrizes distintas.

Para avaliar a incerteza padrão Tipo A nas concentrações superiores ao limite de quantificação, utilizou-se diferentes matrizes disponíveis no laboratório, como água de rio, esgotos sanitários e efluentes industriais para os testes de repetibilidade da DBO. A cada dia de trabalho, conforme rotina do laboratório, ao menos 7 replicatas independentes para cada amostra foram determinadas conforme os procedimentos preconizados no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017). A concentração do oxigênio dissolvido foi medida apenas por luminescência, conforme rotina do laboratório. Manteve-se o cuidado quanto ao pré-tratamento das amostras para eliminação dos interferentes, verificou-se a necessidade da adição de sementes, e preparou-se os controles das condições ambientais de modo a reduzir as fontes de erro do método para determinação da DBO.

Os cálculos estatísticos para estimativa da incerteza padrão Tipo A foram praticados conforme Equação 13 para cada matriz.

3.6 Etapa 5 - Elaboração de planilha eletrônica

Elaborou-se uma planilha eletrônica no Excel @Microsoft para auxiliar na estimativa da incerteza expandida dos resultados. Utilizou-se os recursos básicos do Excel com inúmeras fórmulas, ferramentas e funções que simplificam os cálculos, facilitam a entrada de dados dos certificados de calibração (Tipo B) e das repetitividades das matrizes (Tipo A), permitindo maior confiabilidade dos resultados. Os cálculos realizados em outra plataforma, por calculadora ou a mão serviram para validar as fórmulas inseridas na planilha, que depois de testadas foi protegida, a partir de recurso disponível no Excel, para evitar alterações ou que seja corrompida durante o uso pelos analistas do laboratório. É também possível visualizar graficamente as principais componentes que contribuem para a estimativa da incerteza expandida do resultado DBO. A cada uso, salva-se a planilha com a data do ensaio, mantendo-se o arquivo original na formatação modelo.

4 RESULTADOS

Neste trabalho, no início de cada teste, foram investigadas e tratadas as possíveis interferências presentes nas amostras, adicionadas as sementes às amostras e mantidas as faixas de temperatura do laboratório, em cada etapa crítica, que afeta diretamente os resultados da DBO. O uso de reagentes de boa qualidade, material de referência certificado e correções dos valores a partir dos certificados RBC dos fornecedores contribuiram para redução do erro de medição.

Foi utilizada a Equação 23, apresentada no glossário, para o cálculo do desvio padrão das medições do oxigênio dissolvido inicial e final de cada teste. Já o desvio padrão da depleção do branco foi obtido pela aplicação da Equação 14.

4.1. Etapa 1 – Determinação do LD e LQ para o ensaio DBO

4.1.1 Água utilizada no ensaio DBO

Os resultados da repetibilidade de cada analista utilizando o método de Winkler para determinação do oxigênio dissolvido estão representados nas Tabelas 5 e 6 para a analista A, e nas Tabelas 7 e 8 para o analista B.

A Tabela 5 indica o valor médio para a depleção do ensaio branco igual a 0,11 $mg.L^{-1}$ de O_2 para o teste utilizando água mineral. Resultado satisfatório porque é inferior ao limite de 0,20 $mg.L^{-1}$ de O_2 preconizado no método 5210 B. 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017). Observa-se também que as concentrações de oxigênio dissolvido no início dos testes e após a etapa de incubação mantiveram-se estáveis, com coeficiente de variação de 0,3% e 0,9%, respectivamente.

Tabela 5 - Resultados de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1} de O_2) para os brancos utilizando água mineral pelo método de Winkler – analista A

Ensaio Branco (n)	OD $_{inicial}$	OD $_{final}$	Depleção
1	8,03	7,81	0,22
2	8,07	7,96	0,11
3	8,04	8,01	0,03
4	8,09	7,91	0,18
5	8,10	7,97	0,13
6	8,07	7,91	0,16
7	8,07	7,95	0,12
8	8,08	8,06	0,02
9	8,09	8,04	0,05
10	8,07	7,97	0,10
Média	8,07	7,96	0,11
Desvio padrão	0,022	0,072	0,075
Coeficiente de variação	0,3%	0,9%	-

Fonte: O autor, 2020.

Tabela 6 - Resultados de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1} de O_2) para os brancos utilizando água desionizada pelo método de Winkler - analista A

Ensaio Branco (n)	OD $_{inicial}$	OD $_{final}$	Depleção
1	8,47	8,09	0,38
2	8,47	8,06	0,41
3	8,47	8,05	0,42
4	8,53	8,04	0,49
5	8,58	8,14	0,44
6	8,57	8,06	0,51
7	7,98	7,85	0,13
8	7,98	7,79	0,19
9	8,01	7,80	0,21
10	8,24	7,94	0,30
Média	8,33	7,98	0,35
Desvio padrão	0,25	0,13	0,28
Coeficiente de variação	3,0%	1,6 %	-

Fonte: O autor, 2020.

Quando utilizado a água desionizada produzida pelo laboratório, o valor médio da depleção do ensaio branco foi igual a 0,35 mg.L^{-1} de O_2, conforme apresentado na Tabela 6. O resultado é reprovado porque ultrapassa o limite de 0,20 mg.L^{-1} de O_2 definido no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA

(APHA, 2017). Este valor correspondeu a 3 vezes a depleção obtida a partir dos testes com água mineral. Observa-se também que as concentrações de oxigênio dissolvido no início dos testes e após a etapa de incubação tiveram maior variação entre si, com coeficiente de variação de 3,0 % e 1,6 %, respectivamente.

Na Tabela 7, o analista B reproduziu os ensaios do branco utilizando água mineral pelo método de Winkler com depleção média igual a 0,18 $mg.L^{-1}$ de O_2. O resultado também foi satisfatório porque é inferior ao limite de 0,20 $mg.L^{-1}$ de O_2 definido no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017).

Tabela 7 - Resultados de oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$ de O_2) para os brancos utilizando água mineral pelo método de Winkler – analista B

n	$OD_{inicial}$	OD_{final}	Depleção
1	8,10	7,98	0,12
2	8,09	7,94	0,15
3	8,04	7,97	0,07
4	7,89	7,65	0,24
5	7,97	7,71	0,26
6	7,91	7,73	0,18
7	7,89	7,65	0,24
8	7,95	7,79	0,16
9	7,91	7,73	0,18
10	7,99	7,77	0,22
Média	7,97	7,79	0,18
Desvio padrão	0,079	0,127	0,15
Coeficiente de variação	1,0%	1,6%	-

Fonte: O autor, 2020.

O mesmo analista B, quando utilizou a água desionizada, produzida pelo laboratório, obteve o valor médio para a depleção do ensaio branco foi igual a 0,55 $mg.L^{-1}$ de O_2, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1} de O_2) para os brancos utilizando água desionizada pelo método de Winkler– analista B

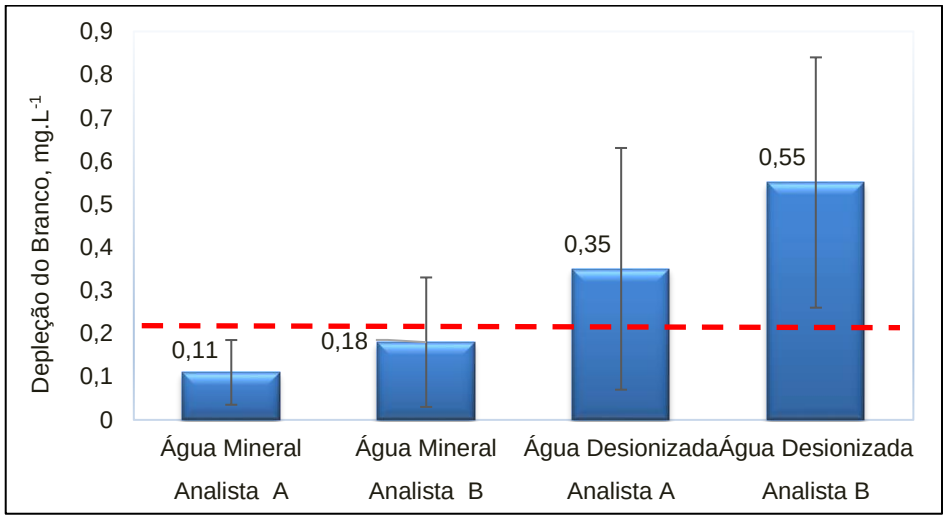
n	$OD_{inicial}$	OD_{final}	Depleção
1	7,89	7,65	0,24
2	7,97	7,62	0,35
3	7,91	7,59	0,32
4	8,40	7,70	0,70
5	8,35	7,48	0,87
6	8,39	7,75	0,64
7	8,40	7,70	0,70
8	8,35	7,69	0,66
9	8,39	7,69	0,70
10	7,75	7,40	0,35
Média	8,18	7,63	0,55
Desvio padrão	0,264	0,110	0,286
Coeficiente de variação	3,2%	1,4%	-

Fonte: O autor, 2020.

Os testes realizados com o analista B forneceram resultados de branco com coeficiente de variação entre 1,0% e 1,6% (Tabela 7) das concentrações de oxigênio dissolvido na água mineral no início dos testes, e após a etapa de incubação se mantiveram mais estáveis que os testes com água desionizada, com coeficiente de variação de 3,2% e 1,4% (Tabela 8).

Na Figura 15, os analistas A e B tiveram o resultado do branco reprovado quando utilizada a água desionizada porque os valores médios da depleção ultrapassaram o limite de 0,20 mg.L^{-1} de O_2 preconizado no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017).

Figura 15 - Depleção do branco pelo método de Winkler



Fonte: O autor, 2020.

Foi observado que, tanto os resultados do analista A quanto do analista B, apresentaram valores da depleção do branco, a partir da água desionizada, três vezes superiores aos valores da depleção obtida a partir com água mineral. Estes valores demonstram que a água mineral é mais estável, independente da habilidade do analista, em relação à água desionizada preparada a cada dia no laboratório, fornecendo assim baixa depleção do oxigênio dissolvido e menores limites de quantificação. A água desionizada é fornecida pela concessionária responsável pelo abastecimento público da cidade, que após um tratamento por troca iônica, e oxidação conforme descrito no item 3.2 deste trabalho ainda apresentava contaminação por matéria orgânica ocasionando a depleção do branco após 5 dias incubada na presença de microrganismos responsáveis pela biodegradação.

Os testes de reprodutibilidade foram realizados com os dois analistas nas condições laboratoriais idênticas, utilizadas a mesma água mineral e água desionizada, assim como o uso de vidrarias calibradas e reagentes para fixação do oxigênio dissolvido e titulação pelo método Winkler. A única variável foi a destreza dos analistas. Constata-se que o Analista A foi mais preciso que o analista B.

4.1.2 Limite de Detecção (LD) da DBO

Utilizando as três metodologias distintas para a quantificação do oxigênio dissolvido, o limite de detecção foi estimado estatisticamente pela aplicação da Equação 17, a partir das replicatas dos brancos reproduzidos pelo analista A, melhor condição. A Tabela 9 apresenta os resultados das depleções dos brancos, cujos valores calculados para o limite de detecção (LD) são:

- Método Winkler: 0,17~ 0,2 $mg.L^{-1}$ de O_2;
- Medição do OD por luminescência: 0,30 ~ 0,3 $mg.L^{-1}$ de O_2;
- Medição do OD por eletrodo com membrana: 1,06 ~ 1,1 $mg.L^{-1}$ de O_2

Os resultados estão expressos com duas casas decimais meramente para uma avaliação estatística entre os valores, mas o método DBO não tem esta precisão e relevância sanitária, pois os valores são expressos em números inteiros.

4.1.3 Limite de Quantificação (LQ) da DBO

A Tabela 9 apresenta o limite de quantificação (LQ) determinado estatisticamente, a partir da Equação 18, com base no desvio padrão das sete (7) replicatas do ensaio branco da DBO utilizando água mineral, e pela melhor condição do analista A. A contribuição da incerteza padrão Tipo A foi calculada a partir da Equação 13.

Os valores obtidos são LQ igual a 0,79 $mg.L^{-1}$ de O_2 para o método por luminescência; LQ igual a 2,75 $mg.L^{-1}$ de O_2 pelo método do eletrodo com membrana e LQ igual a 0,37 $mg.L^{-1}$ de O_2 pelo método químico de Winkler.

Tabela 9 - Resultados das sete replicatas do branco (mg.L^{-1} de O_2) da DBO para os três métodos de determinação do O_2

Ensaios (n)	Replicatas do Branco da DBO		
	Winkler (mg.L^{-1} de O_2)	Membrana (mg.L^{-1} de O_2)	Luminescência (mg.L^{-1} de O_2)
1	0,09	0,25	0,17
2	0,15	0,48	0,07
3	0,08	0,56	0,08
4	0,13	0,21	0,18
5	0,11	0,46	0,06
6	0,10	0,65	0,20
7	0,08	0,86	0,21
Média	0,106	0,496	0,139
Desvio Padrão	0,026	0,225	0,066
Limite de Detecção	0,17	1,06	0,30
Limite de Quantificação	0,37	2,75	0,79
Incerteza padrão - Tipo A	0,0099	0,085	0,025

Fonte: O autor, 2020.

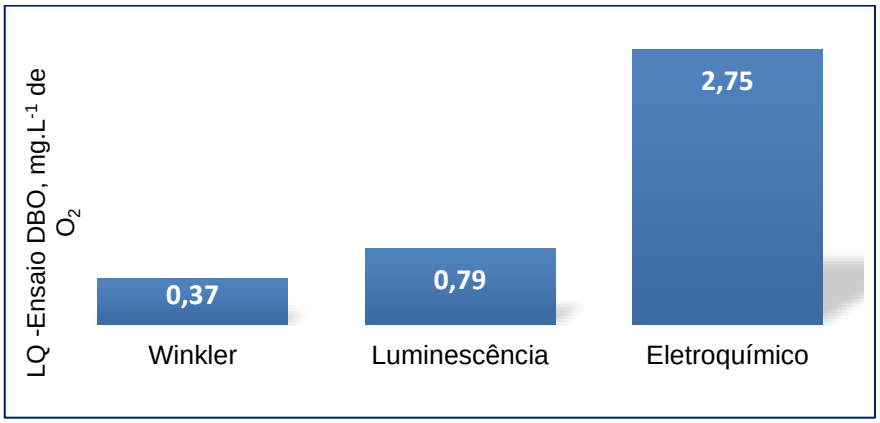
Os resultados dos ensaios de branco, utilizando os métodos de Winkler e por luminescência na determinação do OD, apresentaram valores de médias de 0,106 e 0,139 mg.L^{-1} deO_2, respectivamente, atendendo ao requisito (Branco < 0,20 mg.L^{-1} de O_2) estabelecido no método 5210 B. 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017). Os resultados obtidos com uso do eletrodo por membrana não atenderam este critério.

É possível observar que o método químico foi o mais preciso dentre os três métodos investigados, apresentado o menor desvio padrão. Seguido pelo método de determinação do OD por luminescência, e o método por eletrodo com membrana foi o menos preciso, correspondendo a 7 vezes o valor do LQ obtido pelo método Winkler.

Assim, com base nos resultados deste laboratório, envolvendo a capacitação da equipe técnica e as condições dos equipamentos disponíveis, chega-se à correlação (1:2:7) entre os limites de quantificação (Figura 16), para os métodos estudados:

Winkler	<	Luminescência	<	Eletrodo com membrana
0,37 mg.L^{-1}		0,79 mg.L^{-1}		2,75 mg.L^{-1}

Figura 16 – Limite de quantificação[1] da DBO por três metodologias



Fonte: O autor, 2020.

O método químico é trabalhoso por incluir muitos procedimentos manuais, etapas de adição de produtos químicos, a cinética da reação, titulação e cálculos. O método Winkler apresentou o maior tempo para obtenção do resultado do oxigênio dissolvido, aproximadamente 10 minutos, em comparação aos 20 segundos pelo método por luminescência. Por ter a melhor precisão entre as metodologias estudadas, o método Winkler foi adotado na calibração com ajuste dos medidores de oxigênio dissolvido, a cada dia antes do uso.

A metodologia para quantificação do oxigênio dissolvido pelo método da luminescência apresentou exatidão satisfatória, LQ igual a 0,79 $mg.L^{-1}$ de O_2, permitindo a determinação da DBO em águas de superfícies visando atender o enquadramento da legislação ambiental Resolução Conama n° 357 para águas doces - Classe I e II, cujos limites são 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2, respectivamente.(BRASIL, 2005)

É importante destacar que o LQ (2,75 $mg.L^{-1}$ de O_2) para a determinação da DBO pelo método de eletrodo com membrana embora seja inferior ao limite legal (3,0 $mg.L^{-1}$ de O_2), não foi o mais seguro para aplicação nos ensaios com águas contendo pouca contaminação por matéria orgânica biodegradável. Isto porque ao resultado deve-se ainda associar a contribuição da incerteza.

---

[1] O limite de quantificação foi considerado como a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais dez desvios padrão.

Quando a medição do oxigênio dissolvido é realizada por eletrodo com membrana, o menor LQ obtido é igual ao próprio limite legal da norma supracitada, quando expresso sem casa decimal, conforme definido no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017).

Devido a pouca disponibilidade de artigos sobre validação da DBO na literatura, para efeito comparativo, os resultados validados neste trabalho utilizando o sensor por luminescência aplicados às matrizes de águas doces, permitiram obter medições (0,79 ± 0,06 $mg.L^{-1}$ ou 0,8 ± 0,1 $mg.L^{-1}$) mais precisas que os obtidos por Simon et al. (2011), 2,0 ± 0,3 $mg.L^{-1}$, que investigaram DBO em águas do mar com introdução de microrganismos autóctones.

4.2 Etapa 2 - Confirmação experimental do LQ da DBO

Com base nos resultados estatísticos a partir do branco da DBO, o limite de quantificação foi verificado experimentalmente. Sete replicatas independentes das soluções padrões de 1; 2; 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2 tiveram o oxigênio dissolvido medido por luminescência e por eletrodo com membrana. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10 - Resultados das repetições dos padrões 1, 2, 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2. A medição do OD foi por luminescência

Replicatas	Solução Padrão			
	1 $mg.L^{-1}$	2 $mg.L^{-1}$	3 $mg.L^{-1}$	5 $mg.L^{-1}$
1	0,95	1,93	3,11	5,04
2	1,08	1,98	3,01	4,85
3	1,05	1,88	2,88	4,81
4	1,04	1,84	3,13	5,30
5	0,99	1,89	3,15	5,05
6	1,04	1,99	3,24	5,19
7	1,05	1,95	3,09	4,95
Média	1,029	1,923	3,087	5,027
Desvio padrão	0,044	0,055	0,114	0,176
Coeficiente de variação	4,3%	2,9%	3,7%	3,5%
Recuperação	103 %	96%	103%	101%
uTA	0,0145	0,0184	0,038	0,058

Fonte: O autor, 2020

Tabela 11 - Resultados das repetições dos padrões 1; 2; 3 e 5 mg.L^{-1} de O_2. A medição do OD foi por eletrodo com membrana

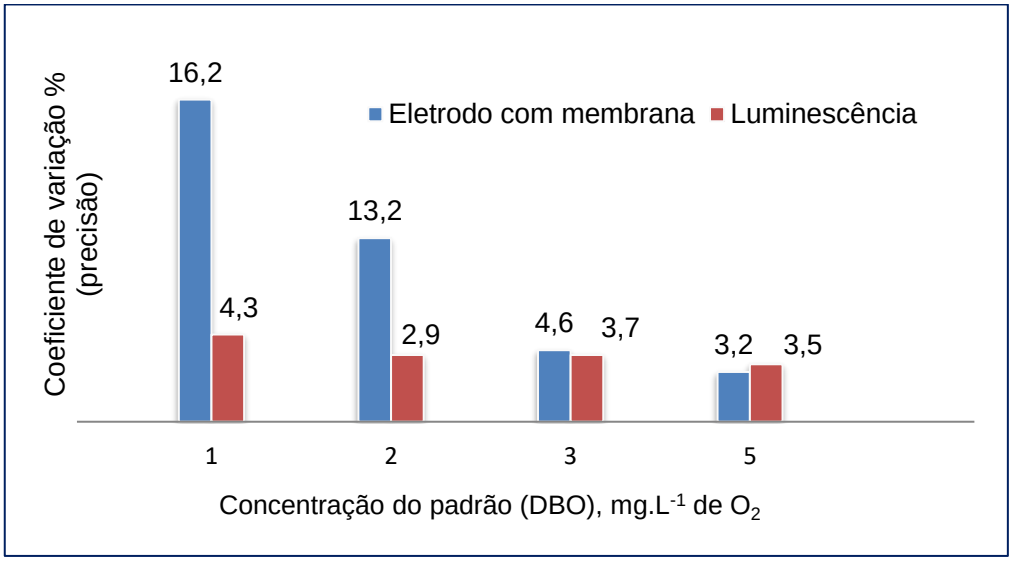
Replicatas	Solução Padrão			
	1 mg.L^{-1}	2 mg.L^{-1}	3 mg.L^{-1}	5 mg.L^{-1}
1	1,58	2,61	3,34	5,35
2	1,28	2,55	3,28	4,92
3	1,13	2,42	2,94	5,19
4	1,15	2,16	3,05	5,25
5	1,40	1,82	3,15	5,43
6	1,51	2,25	3,20	5,10
7	1,74	1,95	3,32	5,20
Média	1,399	2,251	3,183	5,206
Desvio padrão	0,227	0,298	0,148	0,166
Coeficiente de variação	16,2%	13,2%	4,6%	3,2%
Recuperação	140%	113%	106%	104%
uTA	0,0758	0,0992	0,0492	0,0555

Fonte: O autor, 2020.

Experimentalmente foi possível demonstrar na Tabela 10 que as replicatas independentes do padrão 1 mg.L^{-1} de O_2 tiveram recuperação de 103% com coeficiente de precisão igual a 4,3% pelo método de luminescência. Melhor resultado quando comparado ao método de determinação do OD por eletrodo com membrana, cujos valores constam na Tabela 11. Para o método utilizando o eletrodo com membrana, os menores padrões (1 e 2 mg.L^{-1} de O_2) apresentaram resultados de recuperação de 140% e 113%, precisão de 16,2 % e 13,2%, respectivamente.

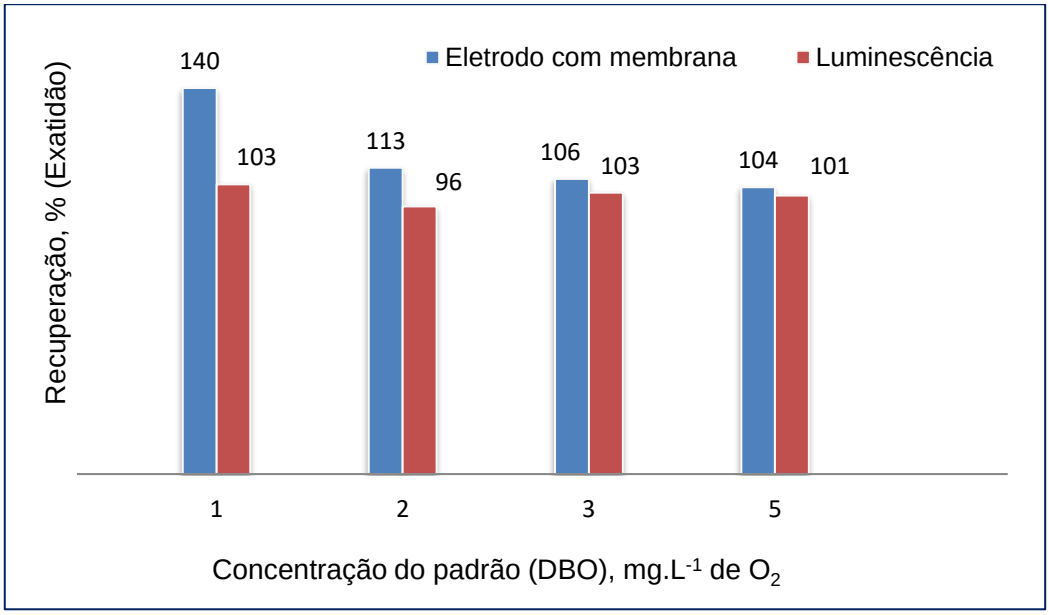
As Figuras 17 e 18 ilustram os resultados da precisão e exatidão comparativos entre os métodos, por luminescência e o uso do eletrodo com membrana, utilizados na determinação do oxigênio dissolvido para o cálculo do ensaio da DBO.

Figura 17 - Precisão dos métodos para determinação do OD no ensaio DBO



Fonte: O autor, 2020.

Figura 18 – Recuperação do LQ da DBO por medição do O_2 por luminescência e eletrodo com membrana



Fonte: O autor, 2020.

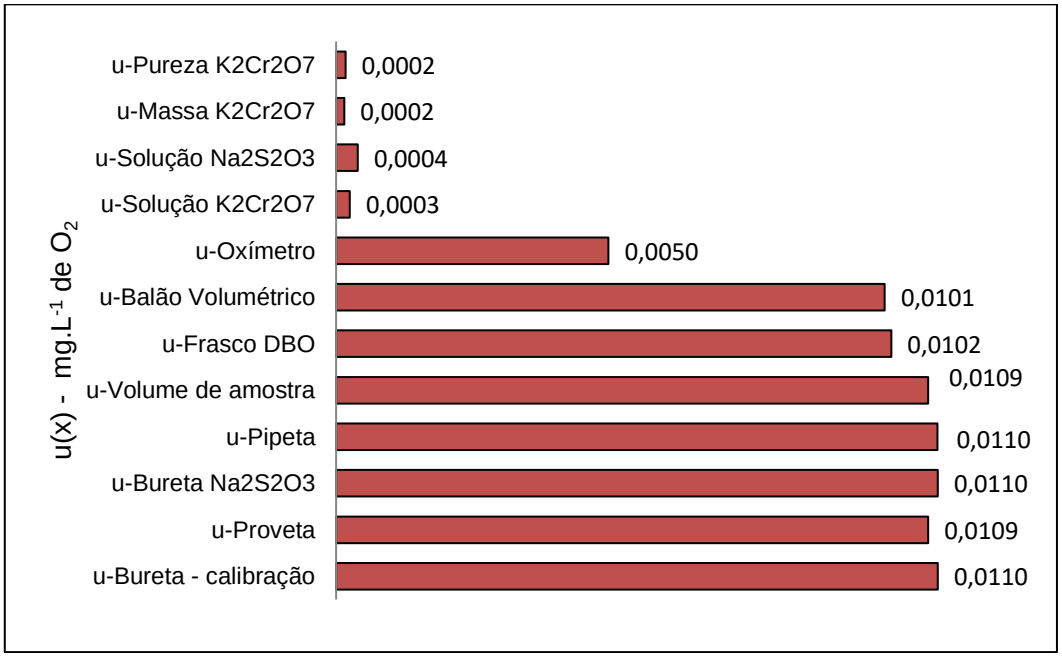
O método da medição de oxigênio dissolvido por eletrodo com membrana garante ao laboratório LQ experimental igual a 3 $mg.L^{-1}$ de O_2, precisão de 4,6% e recuperação de 106%, conforme Figuras 17 e 18. Portanto, as medições obtidas por luminescência, além de mais rápidas, foram mais exatas e precisas que o método utilizando eletrodo com membrana.

4.3 Etapa 3 - Fontes de incerteza - Tipo B

A partir dos certificados de calibração das vidrarias e equipamentos foram obtidas as contribuições da incerteza (Tipo B) de cada peça crítica, assim como certificados dos reagentes e padrões primários e MRC disponíveis no laboratório de engenharia sanitária com sistema de qualidade acreditado pela CGCRE-INMETRO, conforme a norma NBR ISO 17025, para a determinação do ensaio DBO. Estes valores estão apresentados no Apêndice A.

Para uma amostra que apresentou resultado igual a 54 ± 10 $mg.L^{-1}$ de O_2 foi possível avaliar as componentes críticas para ensaio DBO por luminescência, conforme Figura 19:

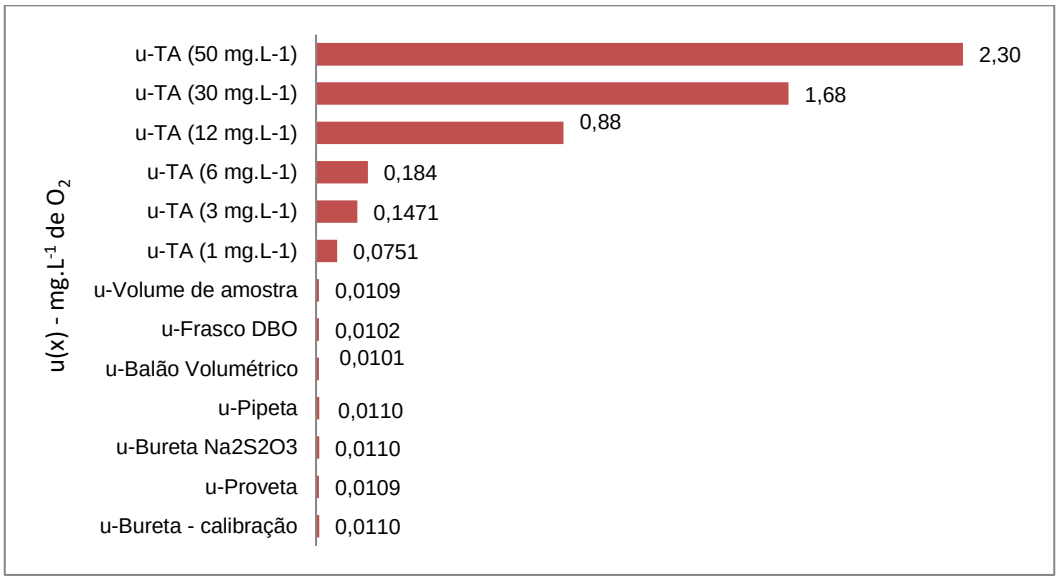
Figura 19 - Contribuição das fontes de incerteza Tipo Bpara o ensaio DBO



Fonte: O autor, 2020.

Na Figura 19 a maior componente Tipo B é igual a 0,011 $mg.L^{-1}$ de O_2 proveniente de vidraria, que é muito inferior aos valores decorrentes da dispersão dos dados, componente Tipo A (Figura 20):

Figura 20 – Contribuição das fontes Tipo A para DBO inferiores a 50 mg.L^{-1} em comparação às fontes de incerteza Tipo B (volumetria)



Fonte: O autor, 2020.

Conforme aumenta o valor da DBO menor é a representatividade das fontes Tipo B (legibilidade da balança analítica, dilatação térmica da vidraria, paralaxe no menisco das vidrarias, calibração das vidrarias). Por exemplo, para uma amostra com DBO igual a 1 mg.L^{-1}, a maior contribuição da incerteza padrão Tipo B (u-Bureta igual a 0,011mg.L^{-1}) é 7 vezes inferior à fonte Tipo A (0,0751 mg.L^{-1}). Na faixa de DBO igual a 12 mg.L^{-1} de O_2 a incerteza padrão Tipo A (uTA igual a 0,88 mgL^{-1}) é 80 vezes superior a componente Tipo B; na faixa de 50 mg.L^{-1}, é 209 vezes maior, e assim sucessivamente, demonstrando ter às fontes Tipo B pouca relevância para o cálculo de incerteza combinada dos resultados de DBO.

Na prática, visto que o resultado da DBO é expresso em número inteiro, e a expressão da incerteza deve acompanhar o resultado (JCGM 200, 2008), não há significância sanitária os valores estatísticos calculados com duas casas decimais.

Os resultados deste trabalho evidenciaram que a dispersão dos dados (Tipo A) foi a única fonte relevante para a estimativa da incerteza padrão expandida (U).

Uma análise crítica é fundamental para justificar os investimentos dos laboratórios nos itens verdadeiramente críticos para garantir a rastreabilidade metrológica (pureza declarada de reagentes e calibrações de equipamentos e vidrarias críticas para o ensaio) e que afetem expressivamente na estimativa de incerteza dos resultados, visando otimizar a precisão e exatidão, em função da

aplicação de cada método químico (faixa de detecção) de acordo com os objetivos pretendidos nos variados segmentos da ciência, como foram observadas nas pesquisas realizadas por:

- Pinto et al. (2016) estimaram as incertezas da concentração de sedimento em suspensão, e as maiores contribuições para a incerteza da concentração foram às incertezas da precisão intermediária e pesagens das amostras;
- Takano et al. (2017) estabeleceram procedimento para estimar a incerteza de medição de um método espectrofotométrico de UV validado para quantificação de desloratadina na formulação de comprimidos. As incertezas associadas à preparação de desloratadina e soluções de amostra foram as mais significativas;
- Pang et al. (2018) avaliaram a incerteza da determinação de resíduos multipesticidas no chá por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa. A principal componente da incerteza foi a repetibilidade, o processo de preparação da quantificação de curvas padrão, a quantificação de curvas padrão e as recuperações;
- Cindro et al. (2020) avaliaram a contribuição do procedimento de amostragem para a estimativa total de incerteza da espectrometria de raios gama de alta resolução de amostras de solo ambiental, água da torneira e filtro de aerossol. A incerteza de amostragem é estimada em cerca de 5% (k = 1) para amostras de solo e 30-40% (k = 1) para amostras de ar.

4.4 Etapa 4 - Repetibilidade das amostras ambientais

A contribuição Tipo A para estimar a incerteza dos resultados do ensaio DBO foi investigada em laboratório a partir das replicatas de amostras ambientais de matrizes distintas.

A fim de gerar uma maior faixa de concentração a ser investigada, as amostras pouco poluídas (0,1 a 5 $mg.L^{-1}$ de O_2) foram geradas em laboratório utilizando branco e soluçao padrão diluidas a partir do MRC (material de referência certificado). Para os testes com concentrações maiores de 10 $mg.L^{-1}$ de O_2 foram utilizadas amostras de esgotos sanitários (bruto e tratado) e efluentes industriais (farmacêutica, fabricantes de bebida e refrigerantes, alimentícia e chorume de aterro sanitário) coletados em empresas localizadas na região metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. A escolha dessas matrizes se deu por serem as mais analisadas no laboratório em questão.

Para a determinação do oxigênio dissolvido foi adotado o método por luminescência por se o medidor utilizado na rotina do laboratório. Foram realizadas coletas em 3 pontos (A, B e C) no rio dos Macacos, na Floresta da Tijuca, RJ. Os resultados das replicatas da DBO e os cálculos estão apresentados na Tabela 12:

Tabela 12 - Resultados das repetições da DBO em 3 amostras do rio dos Macacos, na Floresta da Tijuca - RJ. A medição do OD por luminescência

Replicatas	DBO ($mg.L^{-1}$ de O_2) do rio dos Macacos		
	Amostra A	Amostra B	Amostra C
1	1,2	2,2	5,7
2	1,8	2,9	5,8
3	1,4	3,1	6,1
4	1,3	3,4	6,8
5	1,6	2,6	5,2
6	1,5	2,9	5,9
7	1,4	2,6	6,1
Média	1,457	2,814	5,943
Desvio padrão	0,199	0,389	0,486
Coeficiente de variação	13,64%	13,83%	8,18%
uTA	0,0751	0,1471	0,184

Fonte: O autor, 2020.

De modo a viabilizar os cálculos estatísticos, para efeito didático, os resultados foram expressos com uma casa decimal. Contudo, chama-se a atenção para os resultados da DBO serem expressos em número inteiro devido ao significado sanitário e a própria imprecisão do método .

A Tabela 12 apresenta os resultados das amostras com baixa concentração de matéria orgânica (1 a 6 $mg.L^{-1}$ de O_2) e coeficiente de variação entre 8,2% e 13,8%, superiores aos coeficientes de variação dos resultados de DBO maiores que 800 $mg.L^{-1}$ de O_2, que se manteve na faixa de 2,6 a 3,5% do coeficiente de variação apresentados na Tabela 13:

Tabela 13 - Repetibilidade do ensaio DBO ($mg.L^{-1}$ de O_2) em amostras coletadas em estações de tratamento de efluentes industriais localizadas no Rio de Janeiro

Replicatas	Resultados da DBO ($mg.L^{-1}$ de O_2)										
	Esgoto Sanitário						Efluente Industrial				
	Tratado			Bruto			(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
1	12	28	46	135	186	368	880	1180	1882	2560	3870
2	8	22	52	140	189	409	935	1260	1944	2486	3855
3	9	36	48	124	191	422	890	1240	1990	2445	3920
4	12	28	60	130	175	391	882	1164	1870	2286	4018
5	15	30	50	136	190	418	870	1260	1840	2513	4156
6	10	32	42	124	188	428	898	1220	1893	2459	3800
7	12	26	56	130	194	384	905	1190	1930	2420	3940
Média	11,1	28,9	50,6	131,3	187,6	402,9	894,3	1216,3	1907,0	2452,7	3937,0
Desvio padrão	2,34	4,45	6,08	6,07	6,08	22,27	21,41	39,03	50,77	86,81	118,89
C. Variação, %	21,0	15,4	12,0	4,6	3,2	5,5	2,4	3,2	2,7	3,5	3,0
uTA	0,88	1,68	2,30	2,30	2,30	8,42	8,09	14,75	19,19	32,81	44,93

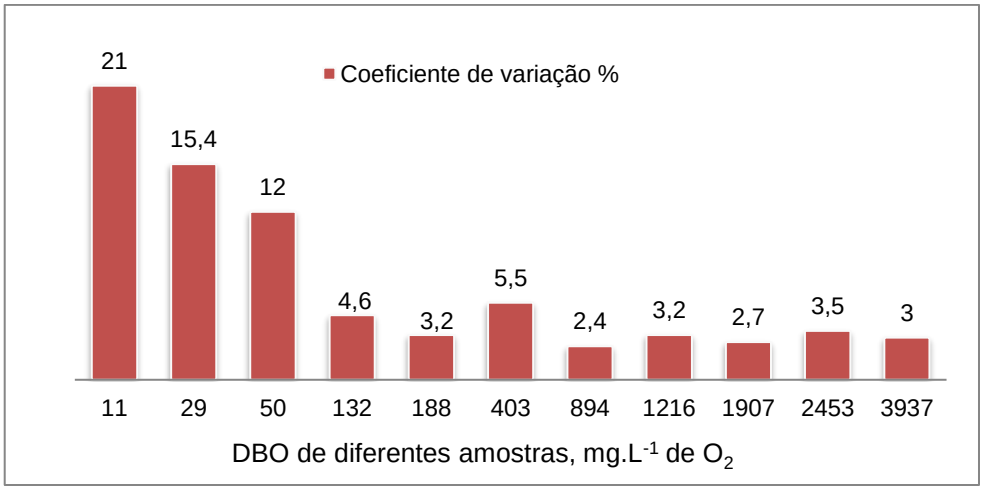
Legenda: (A) Farmacêutica; (B) Chorume; (C) Bebida; (D) Alimentícia; (E) Refrigerante.
Fonte: O autor, 2020.

Os maiores resultados do coeficiente de variação (12% a 21%) foram calculados com as amostras de esgotos sanitários tratados. Uma possibilidade para tal ocorrência observada pode ser atribuída a presença de flocos biológicos do lodo ativado, e o maior volume de amostra transportado para o frasco DBO com proveta promovendo uma pequena alteração na composição das amostras testadas.

A transferência de alíquotas das amostras com concentrações superiores a 100 mg.L^{-1} de O_2 foi realizada com pipeta volumétrica. Foram utilizadas pequenas alíquotas, ou até diluição da amostra, para não consumir todo o oxigênio dissolvido no frasco DBO durante os cinco dias de incubação a 20°C. Nestas condições as amostras submetidas aos ensaios foram mantidas homogêneas, e sem presença de material em suspensão, predominando as frações solúveis e coloidais de matéria orgânica, o que contribuiu para a baixa dispersão dos resultados, associada a destreza do analista, com precisão entre 2,4% e 5,5% (Tabela 13).

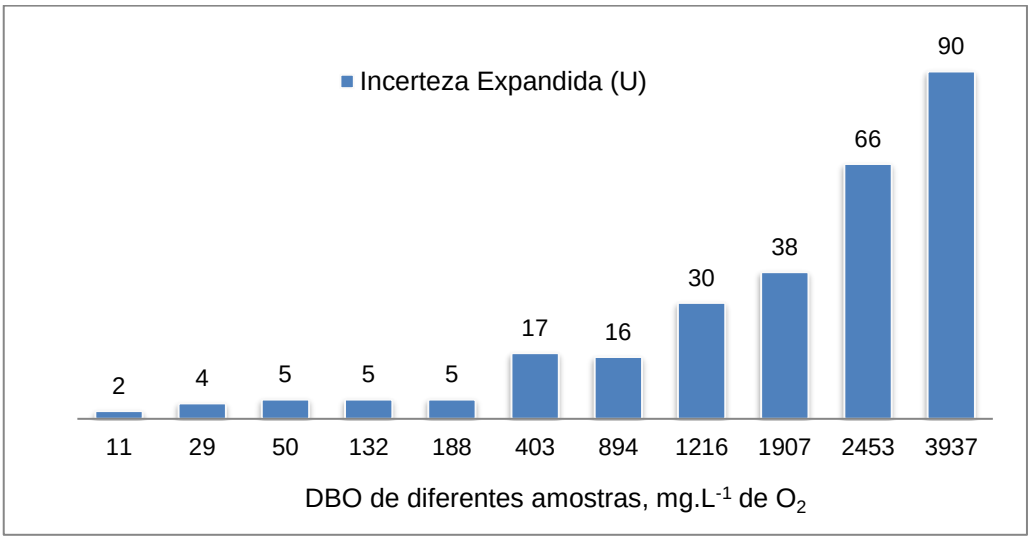
A contribuiçao da componente Tipo A, a mais relevante para a estimativa da incerteza, foi calculada pela aplicação da Equação 13, cujos valores estão apresentados na última linha dasTabelas 12 e 13. Conforme aumenta os valores da DBO aumenta proporcionalmente o valor da incerteza Tipo A. Esta tendência está ilustrada nas Figuras 21 e 22.

Figura 21 – Precisão da DBO em função da concentração e amostras, pela medição do oxigênio dissolvido por luminescência



Fonte: O autor, 2020.

Figura 22 - Incerteza expandida da DBO, medição do OD por luminescência.



Fonte: O autor, 2020.

O laboratório para atender os requisitos da qualidade, participa do programa anual de proficiência de ensaios químicos. Na Tabela 14 são apresentados os resultados das triplicatas das amostras X e Y submetidas ao controle externo promovido pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul- Brasil. A determinação da DBO utilizou o medidor de oxigênio dissolvido por luminescência, adotado na rotina do laboratório.

Tabela 14 - Resultados das proficiências da Rede Metrológica do Rio Grande do Sul

Amostra	Rodada	Resultado	Duplicata	Triplicata	Média	X_v	Z *score*
X	2ª	186	162	173	174	166	0,164
Y	2ª	331	297	316	315	301	0,134
Y	4ª	311	299	309	306	312	-0,054
X	4ª	186	203	195	195	166	0,425

Fonte: O autor, 2020.

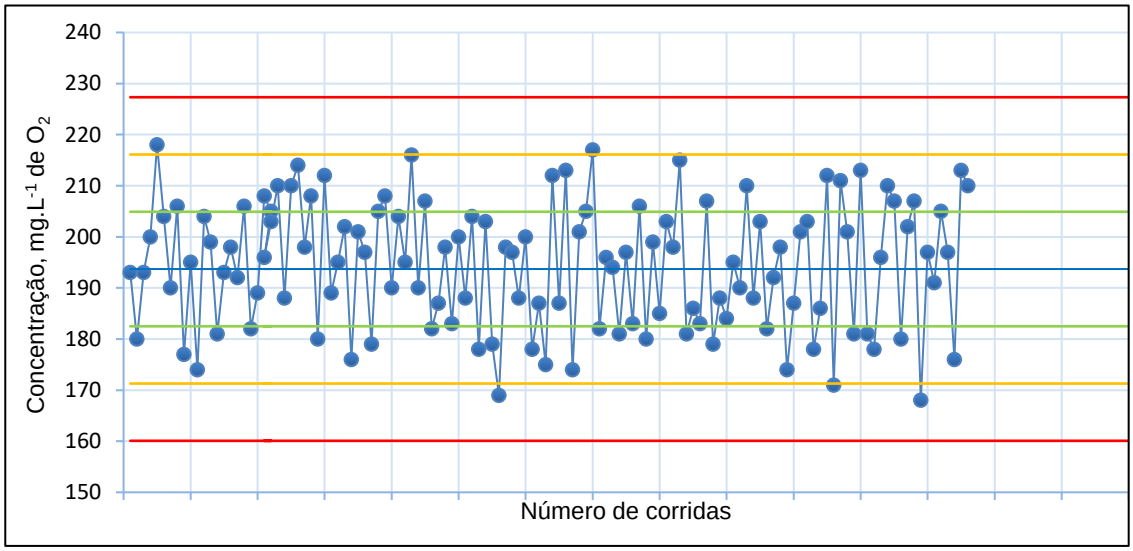
Sabendo que X_v corresponde ao resultado verdadeiro proveniente do estudo de homogeneidade do programa de ensaio de proficiência, conforme relatório do provedor.

O laboratório apresentou desempenho satisfatório no programa de ensaio de proficiência, com valores de *z score* variando entre -0,05 a 0,16 em duas rodadas de avaliação da amostra Y e uma avaliação da amostra X. A quarta rodada da amostra

X teve desempenho z = 0,425, superior aos demais resultados, todavia dentro da faixa considerada satisfatória (z score ≤ 2), quanto à exatidão.

A Figura 23 representa graficamente um dos controles de qualidade praticado rotineiramente no ensaio DBO. De acordo com a metodologia (APHA, 2017) o padrão de glicose e ácido glutâmico (300 $mg.L^{-1}$) tem recuperação aceitável na faixa de 198 ± 30 $mg.L^{-1}$ de O_2.

Figura 23 – Carta controle do ensaio DBO com padrão de 198 ± 30 $mg.L^{-1}$ de O_2



Fonte: O autor, 2020.

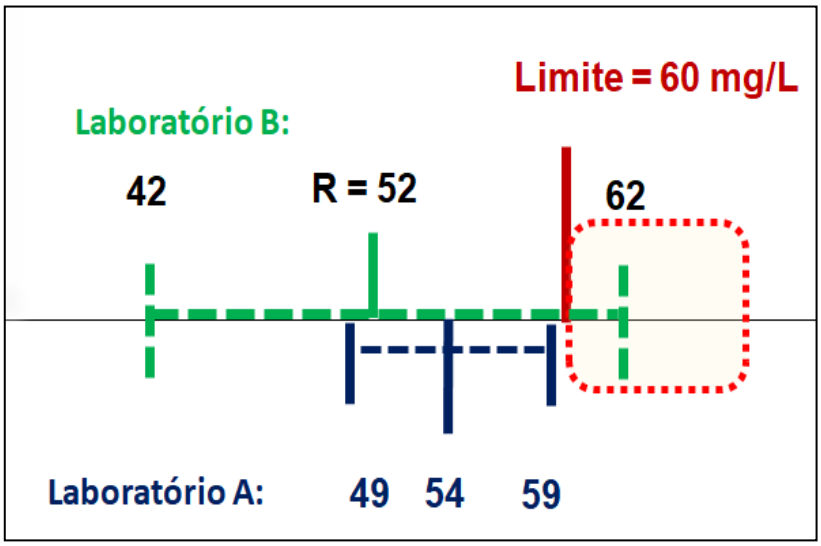
4.5 Etapa 5 – Elaboração da planilha eletrônica

Uma planilha foi elaborada utilizando o Excel @Microsoft para auxiliar os analistas a realizarem os cálculos para a estimativa da incerteza. Com base nos procedimentos do Guia Eurachem/Citac (2012) foram avalidadas as principais fontes de incerteza (Tipo A e Tipo B) ilustradas no diagrama Ishikawa (Figura 9). As fontes de incerteza padrão que foram identificadas estão apresentadas no Apêndice A desta dissertação. A planilha eletrônica desenvolvida está ilustrada no Apêndice C.

4.6 Interpretando a incerteza

Dois laboratórios A e B determinam a DBO do efluente industrial após tratamento biológico para avaliação quanto ao enquadramento legal conforme DZ 215-Rev.04 (RIO DE JANEIRO, 2007). O resultado do laboratório B foi igual a 52 ± 10 $mg.L^{-1}$ de O_2. O resultado obtido pelo laboratório A foi igual a 54 ± 5 $mg.L^{-1}$ de O_2. Os resultados dos dois laboratórios aparentemente atendem o padrão para lançamento de efluentes, entretanto quando associado ao intervalo da incerteza, o laboratório B ultrapassa o limite legal (Figura 24). O laboratório A, embora tenha informado um valor da DBO maior em relação ao laboratório B, a contribuição da incerteza do laboratório A (± 5) mantém o intervalo do resultado inferior ao limite legal.

Figura 24 - Interpretação do resultado associado à incerteza



Fonte: O autor, 2020.

CONCLUSÃO

A qualidade da água utilizada no preparo da água de diluição das amostras foi fundamental para se obter depleções de oxigênio dissolvido inferiores a 0,20 $mg.L^{-1}$ de O_2, limite preconizado no método 5210 (B) 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017), e consequentemente menores limites de quantificação. A água mineral apresentou resultados estáveis e satisfatórios para o branco: 0,11 $mg.L^{-1}$ e 0,18 $mg.L^{-1}$ quando testados por dois analistas, em comparação com a água reagente desionizada preparada no laboratório, cujos valores foram três vezes maiores.

Foi demonstrado que quanto menor o limite de quantificação, maior é o coeficiente de variação, ou seja, mais difícil é garantir precisão e exatidão dos resultados. Em relação às metodologias estudadas, obteve-se a correlação entre os limites de quantificação, LQ (1: 2: 7), determinados estatisticamente, nesta ordem: Winkler igual a 0,37 $mg.L^{-1}$ de O_2, luminescência igual a 0,79 $mg.L^{-1}$ de O_2, e eletrodo com membrana igual a 2,75 $mg.L^{-1}$ de O_2. Os limites de detecção equivalem a 1/3 dos limites de quantificação.

A determinação sistemática do oxigênio dissolvido com sensor por luminescência apresentou LQ igual a 1 $mg.L^{-1}$ de O_2, precisão de 4,3% e recuperação de 103%, permitindo medições confiáveis e replicáveis da DBO em águas de superfícies para o enquadramento da legislação ambiental Resolução Conama n° 357 - Águas doces - Classe I e II, cujos limites são 3 e 5 $mg.L^{-1}$ de O_2, respectivamente (BRASIL, 2005).

O limite de quantificação do método de eletrodo com membrana foi validado em 3 $mg.L^{-1}$ de O_2, precisão de 4,6% e recuperação de 106%. Não demonstrou ser seguro para aplicação nos ensaios com águas contendo pouca contaminação por matéria orgânica biodegradável porque o LQ é próximo do limite definido na norma supracitada, e quando associado à incerteza de medição ultrapassa o limite legal. Fatores como desgaste dos eletrodos, cápsula (membrana), saturação da solução eletrolítica, mecanismos de agitação adequada da amostra contribuíram para o aumento da dispersão dos resultados, e consequentemente do limite de quantificação do método.

O método químico (Winkler) demonstrou ser mais exato e preciso, porém, muito trabalhoso por incluir etapas de adição de produtos químicos, a cinética da reação, titulação e cálculos. Os resultados podem ser afetados pelo procedimento de preservação da amostra e por contaminantes (por exemplo: cor e turbidez intensas, sulfetos, cloro). Foi adotado na calibração com ajuste dos medidores de oxigênio dissolvido, a cada dia antes do uso, para assegurar os melhores resultados quanto à exatidão.

No estudo em questão, constata-se que a incerteza de maior contribuição é a dispersão dos dados, componente Tipo A. As demais fontes Tipo B (legibilidade da balança analítica, dilatação térmica da vidraria, paralaxe no menisco das vidrarias, calibração das vidrarias, pureza do reagente) demonstraram ter pouca relevância para a estimativa de incerteza combinada dos resultados da DBO.

Do ponto de vista prático, envolvendo a melhor condição, a estimativa da incerteza dos resultados da DBO pode ser considerada basicamente a partir do desvio padrão dos dados.

Uma criteriosa análise pela equipe técnica do laboratório fez-se necessária para justificar os relevantes investimentos nos itens que garantem a rastreabilidade metrológica (pureza declarada de reagentes e calibrações de equipamentos e vidrarias críticas para o ensaio) e que afetem expressivamente na estimativa de incerteza, na precisão e exatidão dos resultados, em concordância com a quantidade de casas decimais definidas em cada método químico (faixa de detecção), de acordo com os objetivos pretendidos nos variados segmentos da ciência.

Os resultados expressos com duas casas decimais neste trabalho serviram para uma avaliação estatística. Entretanto, o método DBO não preconiza precisão e relevância sanitária para resultados com casas decimais, pois são expressos em números inteiros.

Cuidados especiais devem ser adotados em relação à capacitação do técnico, pois a repetibilidade (Tipo A) foi a componente dominante na estimativa da incerteza (U) expandida (k = 2 e 95,45% de confiança): 0,8 ± 0,1 $mg.L^{-1}$; 11 ± 2 $mg.L^{-1}$; DBO entre 30 a 188 $mg.L^{-1}$ (U igual a 5 $mg.L^{-1}$); conforme o valor da DBO aumentou de 400 $mg.L^{-1}$ até 4000 $mg.L^{-1}$, U variou de ± 17 a ± 90 $mg.L^{-1}$, em função das matrizes estudadas.

A planilha eletrônica contemplando todas as componentes de entrada (Tipo A e Tipo B) estudadas nesta dissertação atendeu a expectativa de simplificação dos cálculos envolvidos na estimativa da incerteza. Assim foi possível constatar os itens críticos que merecem investimentos de recursos do laboratório: o contínuo treinamento da equipe técnica.

Com as condições ambientais controladas, o medidor de oxigênio dissolvido por luminescência acrescentou qualidade e produtividade ao laboratório, mantidas as calibrações com ajustes pelo método de Winkler. Quanto menor a incerteza do resultado, quando bem estimada, melhor é a qualidade do laboratório.

Por fim, cabe aos laboratórios continuarem buscando novas metodologias e assegurarem a rastreabilidade metrológica dos resultados a fim de atender aos limites dos parâmetros exigidos pelas legislações ambientais, cada vez menores.

Como aprofundamento da pesquisa, torna-se viável a realização de mais estudos, visando disseminar o conceito da metrologia em laboratórios de ensaios, abordando alguns tópicos:

- Ampliar o conceito de avaliação da incerteza dos resultados para outros ensaios físico-químicos, incluindo a investigação das fontes provenientes dos ajustes de modelos matemáticos na elaboração das curvas de calibração, e nos ensaios microbiológicos;
- Outros ensaios, em menores concentrações, $\mu g.L^{-1}$ e $ng.L^{-1}$, $pg.L^{-1}$, demandam que cada componente, Tipo B, considerada desprezível neste estudo, seja investigada sua relevância na estimativa da incerteza;
- Identificar as fontes de incerteza e estimá-las proveniente da etapa de amostragem;
- Recomenda-se continuar o estudo de validação das metodologias sobre o possível impacto na utilização de novos equipamentos, proficiência da equipe, qualidade dos reagentes e outros fatores relevantes;

REFERÊNCIAS

AMERICAN Public Health Association (APHA); American Water Works Association - AWWA; Water Environment Federation - WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23 rd. Washington: American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, 2017.

AMERICAN Public Health Association (APHA); American Water Works Association - AWWA; Water Environment Federation - WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 st. Washington: American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation, 2012.

AMERICAN Society for Quality (ASQ). *Kaouru Ishikawa.* Disponível em: <https://asq.org/about-asq/honorary-members/ishikawa>. Acesso em: 28 ago. 2020.

AMERICAN Society for Testing and Materials (ASTM) E287-02, Especificação padrão para buretas graduadas em vidro de laboratório, ASTM E287-02. International, West Conshohocken, PA, 2019.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. ABNT ISO 17034. Rio de Janeiro. 2017, 27p.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Estatística — Vocabulário e símbolos Parte 1: Termos estatísticos gerais e termos usados em probabilidade. ABNT NBR ISO 3534-1. Rio de Janeiro. 2010, 69p.

ASSOCIAÇÃO Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaios e calibração. ABNT ISO/IEC 17025. Rio de Janeiro. 2017, 32p.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria da Consolidação nº 5*, *de 28 de setembro de 2017*. Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Presidência da República. *Lei nº 14.026, de 15 de julho de 2020*. Diário da Câmara dos Deputados. Poder Legislativo. Brasília, DF, 2020.

BRASIL. Senado Federal. *Senado Notícia*. Brasília, DF. Disponível em: <https://www12.senado.leg.br/noticias/materias/2020/07/15/senadores-criticam-vetos-do-governo-ao-marco-legal-do-saneamento>. Acesso em: 15 jul. 2020.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. CONAMA. *Resolução nº 344, de 07 de maio de 2004.* Dispõe Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Diário Oficial da União. n. 087, de 07 maio 2004, p. 56-57. Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. CONAMA. *Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011.* Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União. n. 92, de 16 maio 2011, p. 89. Brasília, DF, 2011.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. CONAMA. *Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.* Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União. n. 53, de 18 mar. 2005, p. 58-63. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. CONAMA. *Resolução n° 396, de 3 de abril de 2008.* Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da União. n. 66, de 7 abr. 2008, p. 64-68. Brasília, DF, 2008.

CATÁLOGO da Hach Company. Disponível em: <https://www.hach.com/ hach-ldo-sc-model-2-do-probe-with-luminescent-dissolved-oxygen-technology/product-downloads?id=10182183350>. Acesso em: 28 jan 2018.

CATÁLOGO da Hach Company. Disponível em: <https://www.hach.com/quick.search-download.search.jsa?keywords=LDO+10360. Acesso em: 28 jan. 2018.

CATÁLOGO do Inmetro. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/ credenciamento/eventos-cgcre/workshop-2019-abril/exigencia-de-calibracao-dos-equipamentos-discussao-sobre-exemplos-em-avaliacoes.pdf>. Acesso em: 15 ago. 2019.

CINDRO, D. G. et al. Measurement uncertainty arising from sampling of environmental samples. *Applied Radiation and Isotopes*, v. 156, Feb. 2020, Article 108978.

CLARK, L. C. JR. *Eletrochemical devide for chemical analysis*. US Patent Office n. 2913386, 21 March 1956, 17 November 1959.

EURACHEM, CITAC, *Quantifying uncertainty in analytical measurement, Guide CG4*, 3rd ed., Eurachem, 2012. Disponível em: <http://www.eurachem.org>. Acesso em: 08 de jan. 2017.

EVALUATION OF MEASUREMENT DATA — *Guide to the expression of uncertainty in measurement.* 2008. Disponível em: <https://www.bipm.org /utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf>. Acesso em: 20 de jan 2018.

FERREIRA, M. A. C. *Desenvolvimento de sensores de oxigênio utilizando métodos eletroquímicos e ópticos para monitoramento em tempo real da qualidade da água*. 2007. 154p. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. 154p. Disponível em:

<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3140/tde-08012008-161104/publico/Tese_Sensores_OD_revisada.pdf>. Acesso em: 26 dez. 2019.

G1.COM. *Bolsonaro sanciona com vetos novo marco legal do saneamento básico*. Disponível em: <https://g1.globo.com/politica/noticia/2020/07/15/bolsonaro-sanciona-novo-marco-legal-do-saneamento-basico.ghtml>. Acesso em: 15 jul. 2020.

GIORDANO, G.; SURERUS, V. Efluentes Industriais - Estudo de Tratabilidade. Volume 1, Rio de Janeiro, Editora Publit Soluções Editoriais, 2015, 196p.

GREAT BRITAIN. Royal Commission on Sewer Disposal. (1908). *The fifth report of commissioners appointed to inquire and report what methods of treating and disposing of sewage (including any liquid from any factory or manufacturing process) may properly be adopted: methods of treating and disposing of sewage*. London: Printed for HMSO by Wyman and Sons, 238f. 1908.

HEATH, E. et al. The migration of bisphenols from beverage cans and reusable sports bottles. *Food Chemistry.* v. 331, June 2020. Article 127326.

INSTITUTO Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos, Rev. 05, Ago. 2016*. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>. Acesso em: 18 de set. 2018.

_____. *Avaliação de dados de medição: guia para a expressão de incerteza de medição – GUM 2008*. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/inovacao/publicacoes/gum_final.pdf>. Acesso em: fev. 2018.

_____. *NIT-DICLA-021 – Expressão da incerteza de medição por laboratórios de calibração. Rev. 10, Jul. 2020*. Disponível em: <https://www4.inmetro.gov.br/busca-google/?q=dicla%20021>. Acesso em: 20 de ago. 2020.

_____. *NIT-DICLA-057 – Critérios para acreditação da amostragem para ensaios de águas e matrizes ambientais. Rev. 4, Out. 2018*. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaios>. Acesso em: 08 de mar. 2019.

_____. *NIT-DICLA-030 – Rastreabilidade Metrológica na Acreditação de Organismos de Avaliação da Conformidade e no Reconhecimento da Conformidade aos Princípios das BPL. Rev. 12, Maio 2020*. Disponível em:<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaios>. Acesso em: 15 jun. 2020.

_____. *NIT-DICLA-026 – Requisitos para a Participação de Laboratórios em Atividades de Ensaio de Proficiência. Rev. 13, jan de 2020.* Disponível em:<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/doc_organismos.asp?tOrganismo=CalibEnsaios. Acessado em: 15 jun. 2020.

_____. *Calibração de balanças.* Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/ouvidoria/faqs.asp#balanca>. Acesso em: 4 de Jun. 2020.

_____. *Portaria Nº 236, 22 Dez 1994*. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC000180.pdf>. Acesso em: 05 de Maio 2020.

INSTITUTO Português de Acreditação (IPAC). *Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos*, OGC007. 2007. Disponível em:<http://www.ipac.pt/docs/documentos.asp>. Acesso em: 15 set 2018.

JCGM, Evaluation of measurement data - *Guide to the expression of uncertainty in measurement*, v. 100, n° 1, p. 120, Set. 2008.

LEQUY, E. et al. Assessment of the uncertainty of trace metal and nitrogen concentrations in mosses due to sampling, sample preparation and chemical analysis based on the French contribution to ICP-Vegetation. *Ecological Indicators*, v. 71, p. 20-31, Dez. 2016.

MARTINS, E. A. J. et al. Avaliação de incerteza de medição na determinação de interferentes endócrinos em água superficial por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. *XIII International Conference on Engineering and Technology Education – COPEC*, 2014, Portugal. Disponível em: <http://copec.eu/congresses/intertech2014/proc/works/61.pdf>. Acesso em: 28 de dez. 2019.

MENDEZ, E. A. C. *Confiabilidade Metrológica: o caso da análise de DQO em um laboratório acadêmico.* 2013. 124f. – Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.peamb.eng.uerj.br/trabalhosconclusao/2013/peamb2013EricaMendez2013.pdf. Acesso em: 15 de maio 2020.

MÉNDEZ, M. G.; LÓPEZ, A. S.; FUENTES, L. C., The estimation of uncertainty of measurement of glycated hemoglobin as an analytical performance specification and in the interpretation of its results*. Clinical Biochemistry*, v. 63, p. 92-96, Jan. 2019.

PANG, G. F. et al. Uncertainty Evaluation of the Determination of Multipesticide Residues in Tea by Gas Chromatography– Tandem Mass Spectrometry Coupled With Three Different Pretreatment Methods*. Analysis of Pesticide in Tea*, cap. 3.2, p. 513-534, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812727-8.00009-2>. Acesso em: 22 de Jun. 2020.

PINTO, M. C. F.; MAGALHÃES, W. F.; Estimação da Incerteza de Medição de um Procedimento Analítico Gravimétrico Aplicado À Hidrossedimentologia Fluvial - Um Exemplo Didático para o Ensino de Metrologia Química nos Cursos Técnico e de Graduação em Química. *Rev. Virtual Quim*., 2016, v. 8, nº (3), p. 780-802. Disponível em: <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v8n3a17.pdf> Acesso em: 22 de Jun. 2020.

PRENESTI, E. et al. Measurement uncertainty evaluation of the Total Antioxidant Capacity of human plasma tested by the CUPRAC-BCS method. *Measurement*, v. 152 , Fev 2020 , artigo 107289. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2019.107289>. Acesso em 05 Jul. 2020.

RIEDEL, K., KUNZE, G., KONIG, A. Microbial Sensors on a Respiratory Basis for Wastewater Monitoring. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, v. 75, p. 81-118, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11783844/>. Acesso em: 28 dez 2019.

RIO DE JANEIRO (Estado). *DZ 205 Rev6 - Diretriz de Controle de Carga Orgânica em Efluentes Líquidos de Origem Industrial*, INEA, Rio de Janeiro, 2007.

_____ *DZ 215 Rev4 - Diretriz de Controle de Carga Orgânica Biodegradável em Efluentes Líquidos de Origem Sanitária*, INEA, Rio de Janeiro, 2007.

SAWYER, C. N.; MCCARTY, P. L.; PARKIN, G. F. Chemistry for environmental engineering and science, 2003 – 5th ed. Mc Graw Hill, p. 768.

SIMON, F. X. et al. Improvement of the analysis of the biochemical oxygen demand (BOD) of Mediterranean seawater by seeding control. *Talanta,* v. 85, p. 527 – 532, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.04.032>. Acesso em: dez. 2019.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.Principles of Instrumental Analysis, Nine Edition – WEST, 2014.

SOTO-FERREIRO, R. M. et al. Isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry to measure the bioaccessible fraction of chromium in sediments. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,* v. 149, p. 15-21, nov 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2018.07.007>. Acesso em: 01 de jul. 2020.

SRIVASTAVA, M. et al. Simultaneous quantification of five bioactive phenylethanoid, iridoid, and flavonol glycosides in Duranta erecta L.: Ultra performance liquid chromatography methodv alidation and uncertainty measurement. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 174, p. 711-71710, set. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.044>. Acesso em: 23 de jun. 2020.

TAKANO, D. E. N. et al. Estimation of Uncertainty for Measuring Desloratadine in Tablets Formulation Using UV Spectrophotometry*, Measurement, Oxon*, v.101, p.40-44, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.measurement.2017.01.018>. Acesso em: 22 de jun. 2020.

TZAKOS, A. G. et al. Development of a validated LC-MS/MS method for thein vitroandin vivoquantitation of sunitinib in glioblastoma cells and cancer patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 1645, p. 690-697, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.030>. Acesso em: 01 de jul. 2020.

VASSILEVA, E.et al. Off-line preconcentration and inductively coupled plasma sector field mass spectrometry simultaneous determination of Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn mass fractions in seawater: Procedure validation*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy,* v. 153, p. 19-27, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sab.2019.01.001>. Acesso em: 22 de Jun 2020.

VIEIRA NETO, O. F.; GIORDANO, G; BILA, D. M. Validação do método para determinação do cloro residual total - DPD aplicado em águas de superfície e abastecimento. Congresso ABES, 30, 2019, Rio Grande do Norte, Jun 2019.

Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM). Conceitos fundamentais, gerais e termos associados. Rio de Janeiro, 2012, 94p.

ZHANG, Y. et al. Simultaneous determination of neonicotinoids and fipronils in tea using a modified QuEChERS method and liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 329, nov 2020, Artigo 127159. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127159>. Acesso em: 04 de Jul 2020.

GLOSSÁRIO

Avaliação Tipo A	Método de avaliação de incerteza pela análise estatística de séries de observações (JCGM 200, 2008)
Avaliação Tipo B	Método de avaliação de incerteza por outros meios que não a análise estatística de séries de observações. (JCGM 200, 2008)
Nível de confiança	O valor (1 – α) da probabilidade associada com um intervalo de confiança ou um intervalo estatístico de abrangência [ISO 3534-1, 1993]
Desvio-padrão	Para uma série de n medições de um mesmo mensurando, a grandeza s, que caracteriza a dispersão dos resultados, é dada pela fórmula: (JCGM 200, 2008) $s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n}}$ (23) Sabendo que $\bar{x}$ a média aritmética dos n resultados.
Erro de medição	Resultado de uma medição menos o valor verdadeiro do mensurando. (JCGM 200, 2008)
Incerteza de medição	Parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. (VIM, 2012)
Incerteza-padrão combinada	Incerteza-padrão do resultado de uma medição, quando esse resultado é obtido por meio dos valores de várias outras grandezas, sendo igual à raiz quadrada positiva de uma soma de termos, que constituem as variâncias ou covariâncias destas outras grandezas, ponderadas de acordo com o quanto

	o resultado da medição varia com mudanças nestas grandezas. (JCGM 200, 2008)
Incerteza expandida	Quantidade que define um intervalo em torno do resultado de uma medição com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mensurando. (JCGM 200, 2008)
Graus de liberdade	Em geral, o número de termos numa soma menos o número de restrições sobre os termos da soma (ISO 3534-1, 1993)
Material de referência certificado	Material de referência acompanhado duma documentação emitida por uma entidade reconhecida, a qual fornece um ou mais valores de propriedades especificadas com as incertezas e as rastreabilidades associadas, utilizando procedimentos válidos. (VIM, 2012)
Rastreabilidade metrológica	Propriedade dum resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através duma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza de medição. (VIM, 2012)
Repetibilidade	Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (VIM, 2012)
Reprodutibilidade	Grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando efetuadas sob condições modificadas de medição (VIM, 2012)
Semente	Cultura microbiana capaz de prover diferentes microrganismos responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica em efluentes industriais e esgotos sanitários (APHA, 2017)

APÊNDICE A - Fontes de incerteza padrão Tipo B - DBO

Nota 1: Para simplificação, o cálculo da dilatação volumétrica foi desprezado o valor do coeficiente de dilatação do vidro ($9{,}9x10^{-6o}C^{-1}$), que é muito inferior ao da água ($2{,}1x10^{-4o}C^{-1}$). Foi adotado a variação de altura Δh = 0,1 cm; ΔT= 10ºC para o cálculo dos erros relacionados à dilatação da vidraria.

Nota 2: Para o preenchimento das Tabelas a seguir, os valores de U e fator k são obtidos diretamente dos certificados de calibração, de reagentes ou informações do fabricante.

A seguir são apresentadas as fontes e equações utilizadas na estimativa da incerteza do resultado de amostra com DBO igual 58 $mg.L^{-1}$ de O_2.

1 – Preparo da solução de dicromato de potássio 0,025 N

1.1.uMP – Incerteza padrão da massa pesada de dicromato de potássio

- ✓ Valor (x) = massa pesada de dicromato de potássio = 1,2264g
- ✓ uDC – Incerteza do dicromato de potássio = $\frac{U_{K2Cr2O7}}{\sqrt{3}}$ (24)
- ✓ uLD – Incerteza da legibilidade digital = $\frac{Resolução\ da\ Balança}{2}$ (25)
- ✓ uB – Incerteza da balança = $\frac{U_{balança}}{k}$ (26)
- ✓ Incerteza Padrão = $ux = \sqrt{uLD^2 + uB^2 + uDC^2}$ (27)
- ✓ Incerteza Padrão relativa = $uMP = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (28)

Tabela 15 – Fontes Tipo B da pesagem do dicromato de potássio

Contribuição	Valor (U)	Tipo	Fator (k)	u(x)
uDC - $K_2Cr_2O_7$	0,0003	B	Raiz (3)	0,00017321
uLD - legibilidade digital	0,0001	B	2	0,00005
uB- balança	0,0001	B	2	0,00005

Fonte: O autor, 2020

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 25, com os dados obtidos na Tabela 15 e uMP pela Equação 28:

Incerteza Padrão u(x) = $\sqrt{(5x10^{-5})^2 + (5x10^{-5})^2 + (1{,}73x10^{-4})^2}$ = 0,000187

Incerteza Padrão Relativa, uMP = 0,0001525

1.2. uPu – Incerteza padrão da pureza do dicromato de potássio

✓ $valor\ (x) =\ Pureza\ \% = 99{,}97\ \%$ (29)

✓ Incerteza Padrão = $ux = \frac{U_{K2Cr2O7}}{\sqrt{3}}$ (30)

✓ Incerteza Padrão relativa = $uPu = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (31)

Logo, a partir do certificado do reagente, e Equações 30 e 31, obtém-se:

Incerteza Padrão u(x) = 0,00017321

Incerteza Padrão Relativa, uPu = 0,00017326 (32)

1.3. uBV – Incerteza padrão do balão volumétrico

✓ $valor(x)$ = volume calibrado do balão volumétrico = 1000,1 mL

✓ uBV – Incerteza do balão volumétrico = $\frac{U_{balão}}{k}$= (33)

✓ uREP – Incerteza da repetitividade do balão = Desvio padrão de 10 pesagens

✓ uEi – Incerteza do erro de indicação do balão = $\frac{Erro}{\sqrt{6}}$ (34)

✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (35)

✓ uEM – Incerteza do erro na leitura do menisco = $\frac{\pi \times (D/2)^2 \times \Delta h}{\sqrt{3}}$ (36)

✓ Incerteza Padrão = $ux = \sqrt{uBV^2 + uREP^2 + uEi^2 + uEM^2 + uDV^2}$ (37)

✓ Incerteza Padrão relativa = $uBV = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (38)

Tabela 16 - Fontes Tipo B do balão volumétrico da solução de dicromato de potássio

Contribuição	Valor (U)	Tipo	Fator (k)	u(x)
U $_{\text{Balão Volumétrico}}$ =	0,13	B	2,046	0,063538612
U repetitividade do balão	1%	A		10,001
Erro indicação do balão - uEi	0,1	B	raiz (6)	0,040824829
Dilatação volumétrica - uDV		B	raiz(3)	1,154816008
Erro na leitura do menisco - uEM		B	raiz (3)	0,18137994
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	2			

Fonte: O autor, 2020

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 37, com os dados obtidos na Tabela 16 e uBV pela Equação 38:

Incerteza Padrão u(x) =10,0693696

Incerteza Padrão Relativa, uBV = 0,01006836 (39)

Incerteza da solução de dicromato de potássio (uSDC):

$$uSDC = \text{Conc}_{\text{K2Cr2O7}} \times \sqrt{uMP^2 + uPu^2 + uBV^2} =$$

$$uSDC = 0{,}0250x\sqrt{0{,}0001525^2 + 0{,}00017326^2 + 0{,}01006836^2} =$$

$$= 0{,}02501 \text{ x } 0{,}01007 = 0{,}00025185 \quad (40)$$

2 - Padronização da solução de tiossulfato de sódio 0,025 N

2.1. uPV – Incerteza padrão da pipeta para transferência da solução $K_2Cr_2O_7$ na padronização da solução de tiossulfato de sódio 0,025N

- ✓ $valor(x)$ = volume calibrado da pipeta volumétrica = 10,009 mL
- ✓ uPV – Incerteza da pipeta volumétrica = $\frac{U_{pipeta}}{k}$ (41)
- ✓ uEi – Incerteza do erro de indicação da pipeta = $\frac{Erro}{\sqrt{6}}$ (42)
- ✓ uREP – Incerteza da repetitividade da pipeta = Desvio padrão de 10 pesagens
- ✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (43)
- ✓ uEM – Incerteza do erro na leitura do menisco = $\frac{\pi \times \left(D/2\right)^2 \times \Delta h}{\sqrt{3}}$ (44)
- ✓ Incerteza Padrão = $ux = \sqrt{uPV^2 + uREP^2 + uEi^2 + uEM^2 + uDV^2}$ (45)
- ✓ Incerteza Padrão relativa = $uPV = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (46)

Tabela 17 - Fontes Tipo B pipeta utilizada na solução de $Na_2S_2O_3$

Contribuição	Valor (U)	Distribuição	Fator (k)	u(x)
$U_{\text{Pipeta Volumétrico}}$ =	0,002	Triangular	2,158	0,000926784
Erro indicação da pipeta - uEi	0,1	Quadrada	Raiz (6)	0,003674235
U repetitividade da pipeta	1%	Tipo A		0,10009
Dilatação volumétrica - uDV		Tipo B	Raiz (3)	0,011557398
Erro na leitura do menisco - uEM		Tipo B	Raiz (3)	0,04534498
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	1			

Fonte: O autor, 2020

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 45, com os dados obtidos na Tabela 17 e uPV pela Equação 46:

Incerteza Padrão u(x) = 0,11055364

Incerteza Padrão Relativa uPV = 0,01104542 (47)

2.2. uBU – Incerteza padrão da bureta utilizada na titulação da solução de dicromato de potássio contra a solução de tiossulfato de sódio 0,025 N

- ✓ $valor(x)$= volume máximo calibrado da bureta = 10,007 mL
- ✓ uBu – Maior incerteza da bureta = $\frac{U_{bureta}}{k}$ (48)
- ✓ uEi – Incerteza do erro de indicação da pipeta = $\frac{Erro}{\sqrt{6}}$ (49)
- ✓ uREP – Incerteza da repetitividade da pipeta = Desvio padrão de 10 pesagens
- ✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (50)
- ✓ uEM – Incerteza do erro na leitura do menisco = $\frac{\pi \times (D/2)^2 \times \Delta h}{\sqrt{3}}$ (51)
- ✓ Incerteza Padrão = $ux = \sqrt{uBu^2 + uREP^2 + uEi^2 + uEM^2 + uDV^2}$ (52)
- ✓ Incerteza Padrão relativa = $uBU = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (53)

Tabela 18 - Fontes Tipo B da bureta utilizada na etapa da padronização

Contribuição	Valor (U)	Tipo	Fator (k)	u(x)
U $_{Bureta}$ =	0,002	B	2,149	0,000930665
U repetitividade da bureta	1%	A		0,10007
Erro indicação da bureta - uEi	0,007	B	raiz (6)	0,002857738
Dilatação volumétrica - uDV		B	raiz(3)	0,011555088
Erro na leitura do menisco - uEM		B	raiz (3)	0,04534498
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	1			

Fonte: O autor, 2020.

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 52, com os dados obtidos na Tabela 18 e uBU pela Equação 53:

Incerteza Padrão u(x) =	0,1105112	
Incerteza Padrão Relativa, uBU =	0,01104339	(54)

Combinando os resultados obtidos nas etapas (40), (54) e (47) com a próxima Equação (53) , obtém-se a uTIO:

Incerteza da solução de tiossulfato de sódio (uTIO):

$$uTIO = \mathrm{Conc}_{\mathrm{Na2S2O7}} \times \sqrt{uSDC^2 + uPV^2 + uBU^2} = \quad (55)$$

$$uTIO = 0{,}02501x\sqrt{0{,}00025185^2 + 0{,}01104542^2 + 0{,}01104339^2} = 0{,}000397$$

3 - Titulação do branco utilizado na calibração do oxímetro

3.1. uPRO – Incerteza padrão da proveta para transferência do branco

- ✓ $valor(x)$= volume calibrado da proveta = 100,08 mL
- ✓ uPRO – Incerteza da proveta = $\frac{U_{proveta}}{k}$ (56)
- ✓ uEi – Incerteza do erro de indicação da proveta = $\frac{Erro}{\sqrt{6}}$ (57)
- ✓ uREP – Incerteza da repetitividade da proveta = Desvio padrão de 10 pesagens
- ✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (58)
- ✓ uEM – Incerteza do erro na leitura do menisco = $\frac{\pi \times (D/2)^2 \times \Delta h}{\sqrt{3}}$ (59)
- ✓ Incerteza Padrão = $ux = \sqrt{uPRO^2 + uREP^2 + uEi^2 + uEM^2 + uDV^2}$ (60)
- ✓ Incerteza Padrão relativa = $uPRO = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (61)

Tabela 19 - Fontes Tipo B da proveta para transferência do branco

Contribuição	Valor	Tipo	Fator	u(x)
U $_{Proveta}$ =	0,04	B	2,255	0,017738359
U repetitividade da proveta	1%	A		1,0008
Erro indicação da proveta - uEi	0,08	B	raiz (6)	0,032659863
Dilatação volumétrica - uDV		B	raiz(3)	0,11556243
Erro na leitura do menisco - uEM		B	raiz (3)	0,40810486
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	3			

Fonte: O autor, 2020.

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 60, com os dados obtidos na Tabela 19 e uPRO pela Equação 61:

Incerteza Padrão u(x) = 1,08760572

Incerteza Padrão Relativa, uPRO = 0,01086736 (62)

3.2. uBU – Incerteza padrão da bureta utilizada na titulação do branco

- ✓ $valor(x)$ = volume máximo calibrado da bureta = 10,005
- ✓ uBu – Maior incerteza da bureta = $\frac{U_{Bureta}}{k}$ (63)
- ✓ uEi – Incerteza do erro de indicação da bureta = $\frac{Erro}{\sqrt{6}}$ (64)
- ✓ uREP – Incerteza da repetitividade do bureta = Desvio padrão de 10 pesagens
- ✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (65)

✓ uEM – Incerteza do erro na leitura do menisco $\frac{\pi \times (D/2)^2 \times \Delta h}{\sqrt{3}}$ (66)

✓ Incerteza Padrão = $ux = \sqrt{uBu^2 + uREP^2 + uEi^2 + uEM^2 + uDV^2}$ (67)

✓ Incerteza Padrão relativa = $uBU = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (68)

Tabela 20 - Fontes Tipo B da bureta utilizada na titulação do branco

Contribuição	Valor (U)	Tipo	Fator (k)	u(x)
U $_{Bureta}$ =	0,003	B	2,217	0,00135318
U repetitividade da bureta	1%	A		0,10005
Erro indicação da bureta - uEi	0,005	B	raiz (6)	0,002041241
Dilatação volumétrica - uDV		B	raiz (3)	0,011552779
Erro na leitura do menisco - uEM		B	raiz (3)	0,04534498
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	1			

Fonte: O autor, 2020

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 67, com os dados obtidos na Tabela 20 e uBU pela Equação 68:

Incerteza Padrão u(x) = 0,110479

Incerteza Padrão Relativa, uBU = 0,011042 (69)

Combinando os resultados obtidos, itens 69 e 62, com a Equação (70), se obtém uBRA:

$$\mathrm{uBRA} = \mathrm{Branco_{DBO}} \times \sqrt{\mathrm{uBu^2 + uPro^2}} = \quad (70)$$

Considerando que o valor do branco não pode ser superior a 0,20 mg.L^{-1} de O_2, logo:

$$\mathrm{uBRA} = 0{,}2\mathrm{x}\sqrt{0{,}011042^2 + 0{,}01086736^2} = 0{,}00309$$

4 - Volume da amostra utilizada no ensaio DBO

✓ $valor(x)$ = volume calibrado da proveta/pipeta volumétrica = 100,08 mL

✓ uPV – Incerteza da proveta/pipeta volumétrica = $\frac{U_{Pipeta}}{k}$ (71)

✓ uEi – Incerteza do erro de indicação da proveta/pipeta = $\frac{Erro}{\sqrt{6}}$ (72)

✓ uREP – Incerteza da repetitividade = Desvio padrão de 10 pesagens

✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (73)

✓ uEM – Incerteza do erro na leitura do menisco $\frac{\pi \times (D/2)^2 \times \Delta h}{\sqrt{3}}$ (74)

✓ Incerteza Padrão: $ux = \sqrt{uPV^2 + uREP^2 + uEi^2 + uEM^2 + uDV^2}$ (75)

✓ Incerteza Padrão relativa: $uVA = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (76)

Tabela 21 - Fontes Tipo B da proveta para transferência da amostra

Contribuição	Valor (U)	Tipo	Fator	u(x)
$U_{Proveta}$ =	0,05	B	2,512	0,019904459
U repetitividade da proveta	1%	A		1,0008
Erro indicação da proveta - uEi	0,08	B	raiz (6)	0,032659863
Dilatação volumétrica - uDV		B	raiz(3)	0,11556243
Erro na leitura do menisco - uEM		B	raiz (3)	0,40810486
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	3			

Fonte: O autor, 2020

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 75, com os dados obtidos na Tabela 21 e uPRO pela Equação 76:

Incerteza Padrão u(x) = 1,08764321

Incerteza Padrão Relativa, uVA = 0,01086774 (77)

Dependendo do aspecto e matriz da amostra, a alíquota utilizada no ensaio DBO pode variar de poucos mililitros até encher completamente o frasco DBO. Com base no histórico do laboratório na Tabela 22 foram registradas as contribuições, incerteza e fator k de abrangência para as principais vidrarias (pipetas e provetas).

Tabela 22 - Volume de amostra utilizada no ensaio DBO (pipeta ou proveta)

Volume	Volume RBC	U vidraria	k	uREP	uDV	uEM	uV	uEI	uVA
1	1,002	0,001	2,649	0,01002	0,000231	5,6681E-05	0,0003775	-0,000816	0,01004
2	1,996	0,001	2,517	0,01996	0,000461	5,6681E-05	0,0003972	0,0016329	0,01003
3	2,998	0,002	2,517	0,02998	0,000692	5,6681E-05	0,0007945	0,0008164	0,01001
4	4,002	0,002	2,429	0,04002	0,000924	5,6681E-05	0,0008233	-0,000816	0,01000
5	4,996	0,002	2,366	0,04996	0,001154	5,6681E-05	0,0008453	0,0016329	0,01000
8	7,999	0,002	2,133	0,07999	0,001847	5,6681E-05	0,0009376	0,0004082	0,01000
10	9,985	0,002	2,084	0,09985	0,002306	5,6681E-05	0,0009596	0,0061237	0,01002
15	15,012	0,002	2,035	0,15012	0,003467	5,6681E-05	0,0009828	-0,004898	0,01000
20	19,999	0,008	2,145	0,19999	0,004619	5,6681E-05	0,0037296	0,0004082	0,01000
50	50,04	0,05	2,512	0,5004	0,011556	0,09068997	0,0199044	-0,016329	0,01017
100	100,08	0,05	2,429	1,0008	0,023112	0,09068997	0,0205846	-0,032659	0,01005
250	250,11	0,06	2,169	2,5011	0,05776	0,09068997	0,0276625	-0,044907	0,01001

Fonte: O autor, 2020.

5 - Volume do frasco de DBO

- ✓ $valor(x)$ = volume do frasco utilizado = 298,85 mL
- ✓ uREP – Incerteza da repetitividade do balão = Desvio padrão de 10 pesagens
- ✓ uDV – Incerteza devido a dilatação volumétrica = $\frac{V \times \Delta T \times 2{,}0 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}}$ (78)
- ✓ Incerteza Padrão: $ux = \sqrt{uREP^2 + uDV^2}$ (79)
- ✓ Incerteza Padrão relativa = $uVFR = \frac{u_x}{valor\ (x)}$ (80)

Tabela 23 - Fontes Tipo B da proveta para transferência da amostra

Contribuição	Valor	Tipo	Fator	u(x)
U frasco DBO =	0,12	A	2	0,06
U repetitividade do frasco	1%	A		2,9885
Erro indicação do frasco - uEi	-1,15	B	raiz (6)	-0,46948553
Dilatação volumétrica - uDV		B	raiz(3)	0,34508225
Diâmetro $_{BV}$ (cm)	2			

Fonte: O autor, 2020.

Calcula-se u(x) pela aplicação da Equação 79, com os dados obtidos na Tabela 23 e uVFR pela Equação 80:

Incerteza Padrão u(x) = 3,04536216

Incerteza Padrão Relativa, uVFR = 0,01019027 (81)

Incerteza Padrão combinada relativa para o resultado DBO (u_c):

Incerteza Expandida: $U = k \times u_c$ (82)

Para uma amostra com DBO igual a 58 mg.L^{-1} de O_2 a incerteza padrão Tipo A pode ser obtida a partir da Tabela 12, e a incerteza expandida é:

$$u_c = \sqrt{\mathrm{uTA}^2 + \mathrm{uSDC}^2 + \mathrm{uTIO}^2 + \mathrm{uBRA}^2 + \mathrm{uVFR}^2 + \mathrm{uVA}^2 + uEQUI^2} =$$

$$\sqrt{2{,}3^2 + 0{,}00025185^2 + 0{,}000397^2 + 0{,}00309^2 + 0{,}01019027^2 + 0{,}01086774^2 + \left(\frac{0{,}01}{2}\right)^2} = 2{,}30$$

Para um nível de confiança de 95,45%, fator k = 2;

U = 2 x 2,30 = 4,6 ~ 5

Logo o resultado é 58 ± 5 mg.L^{-1} de O_2

APÊNDICE B – Volumes dos frascos aferidos para o ensaio DBO

Tabela 24 – Tabela indicativa dos volumes dos frascos DBO

n	Volume, mL	Erro	uEI	uDV	uREP	UV FRASCO DBO
1	296,00	-4,00	-1,63299	0,170896	2,96	3,384889
2	304,41	4,41	1,800375	0,175751	3,0441	3,541014
3	303,70	3,70	1,510519	0,175341	3,037	3,396436
4	309,61	9,61	3,923266	0,178753	3,0961	5,00098
5	312,80	12,80	5,225578	0,180595	3,128	6,092919
6	269,90	-30,10	-12,2883	0,155827	2,699	12,58215
7	305,42	5,42	2,212706	0,176334	3,0542	3,775619
8	281,20	-18,80	-7,67507	0,162351	2,812	8,175596
9	300,60	0,60	0,244949	0,173551	3,006	3,020953
10	302,04	2,04	0,832827	0,174383	3,0204	3,137965
11	300,20	0,20	0,08165	0,173321	3,002	3,008107
12	287,80	-12,20	-4,98063	0,166161	2,878	5,754751
13	303,00	3,00	1,224745	0,174937	3,03	3,272843
14	292,00	-8,00	-3,26599	0,168586	2,92	4,384232
15	292,70	-7,30	-2,98021	0,16899	2,927	4,180616
16	301,70	1,70	0,694022	0,174187	3,017	3,100693
17	293,80	-6,20	-2,53114	0,169626	2,938	3,88166
18	304,60	4,60	1,877942	0,175861	3,046	3,582696
19	290,30	-9,70	-3,96001	0,167605	2,903	4,912959
20	271,40	-28,60	-11,6759	0,156693	2,714	11,9882
21	309,30	9,30	3,796709	0,178574	3,093	4,900361
22	307,30	7,30	2,980213	0,17742	3,073	4,284446
23	293,40	-6,60	-2,69444	0,169395	2,934	3,987111
24	282,80	-17,20	-7,02187	0,163275	2,828	7,571718
25	310,70	10,70	4,368257	0,179383	3,107	5,363515
26	282,90	-17,10	-6,98105	0,163332	2,829	7,53425
27	282,40	-17,60	-7,18517	0,163044	2,824	7,721931
28	304,00	4,00	1,632993	0,175514	3,04	3,455296
29	288,01	-11,99	-4,8949	0,166283	2,8801	5,681782
30	302,66	2,66	1,08594	0,174741	3,0266	3,220265
31	271,40	-28,60	-11,6759	0,156693	2,714	11,9882
32	293,02	-6,98	-2,84957	0,169175	2,9302	4,090814
33	305,10	5,10	2,082066	0,17615	3,051	3,697922
34	305,50	5,50	2,245366	0,176381	3,055	3,795498
35	283,90	-16,10	-6,5728	0,16391	2,839	7,161596
36	302,60	2,60	1,061446	0,174706	3,026	3,211521

Fonte: O autor, 2020.

APÊNDICE C – Planilha para a estimativa da incerteza da DBO

Figura 25 - Componentes tipo A e tipo B (incerteza padrão) da DBO

Cálculo da Incerteza - Dados de Referência - DBO

1. Incerteza Tipo A - Repetitividade

Fonte dos dados: Relatório de validação, amostras cegas e carta controle.

	Branco	Rio dos Macacos			Esgoto Tratado			Esgoto Bruto			Esg. Sanitário				
1	0,14	1,46	2,81	5,94	11,14	28,9	51	131	188	403	894	1216	1907	2453	3937
2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2	mg/L de O_2
3	0,17	1,2	2,2	5,7	12	28	46	135	186	368	880	1180	1882	2560	3870
4	0,07	1,8	2,9	5,8	8	22	52	140	189	409	935	1260	1944	2486	3855
5	0,08	1,4	3,1	6,1	9	36	48	124	191	422	890	1240	1990	2445	3920
6	0,18	1,3	3,4	6,8	12	28	60	130	175	391	882	1164	1870	2286	4018
7	0,06	1,6	2,6	5,2	15	30	50	136	190	418	870	1260	1840	2513	4156
8	0,2	1,5	2,9	5,9	10	32	42	124	188	428	898	1220	1893	2459	3800
9	0,21	1,4	2,6	6,1	12	26	56	130	194	384	905	1190	1930	2420	3940
Desvio Padrão	0,066	0,199	0,389	0,486	2,340	4,451	6,079	6,075	6,079	22,274	21,406	39,029	50,771	86,810	118,885
Coef. Variação, %	47,4%	13,6%	13,8%	8,2%	21,0%	15,4%	12,0%	4,6%	3,2%	5,5%	2,4%	3,2%	2,7%	3,5%	3,0%
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
uTA	**0,025**	**0,075**	**0,147**	**0,184**	**0,884**	**1,682**	**2,298**	**2,296**	**2,298**	**8,419**	**8,091**	**14,751**	**19,190**	**32,811**	**44,934**

2. Ajuste do Oxímetro

2.1. Padronização da solução de tiossulfato de sódio 0,025N

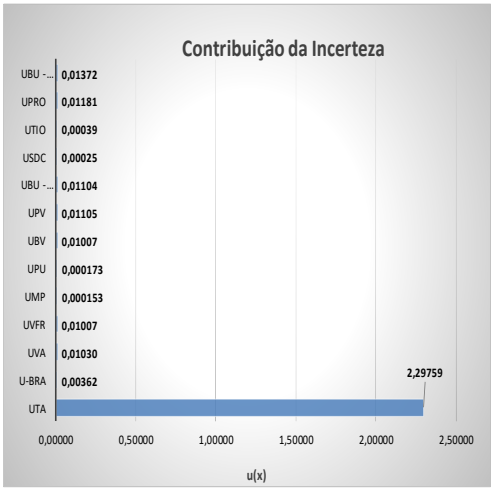
Dados de Entrada:

Dicromato de Potássio:		Balão volumétrico:		Balança:		Pipeta Volumétrica		Bureta:		Tiossulfato de sódio	
Conc (N) $_{K2Cr2O7}$ =	0,025	D (cm) $_{BV}$ =	2	Resolução balança (g) =	0,0001	D (cm) $_{PV}$ =	1	D (cm) $_{BU}$ =	1	Conc (N) $_{S2}$	0,02501
U $_{K2Cr2O7}$ =	0,0003	Erro (mL) $_{BV}$	-0,1	U balança =	0,0001	Erro (mL) $_{PV}$	0,009	Erro (mL) $_{BU}$	0,007		
m (g) $_{K2Cr2O7}$ pesada =	1,2264	k_{BV} =	2,046	k balança =	2	k_{PV} =	2,158	k_{BU} =	2,149		
Pureza % =	99,97	U_{BV} =	0,13			U_{PV} =	0,002	U_{BU} =	0,002		
		Vol. Cal (mL	1000,1			Vol. Cal (mL	10,009	Vol. (mL) $_{BU}$	10,007		
		Δh (cm) =	0,05			Δh (cm) =	0,1	Δh (cm) =	0,1		
		ΔT (°C) =	10			ΔT (°C) =	10	ΔT (°C) =	10		

Incertezas:

uMP	uDC =	0,0001732	uBV	uBV =	0,0635386	u PV	uPV =	0,0009268	uBu	uBu =	0,0009307
	uLD =	0,00005		uREP =	10,001		uEI =	0,0036742		uEI =	0,0028577
	uB =	0,00005		uEI =	-0,040825		uREP =	0,10009		uREP =	0,10007
	uMP =	#########		uDV =	1,154816		uDV =	0,0115574		uDV =	0,0115551
uPu	**uPu =**	#########		uEM =	0,09069		uEM =	0,045345		uEM =	0,045345
				uBV =	**0,0100671**		**uPV =**	**0,0110454**		**uBu =**	**0,0110434**

uSDC =	#########
uTIO=	**0,0003907**



2.2. Titulação da água utilizada para ajustar o oxímetro

Dados de Entrada:

Proveta		Bureta:	
D (cm) $_{PRO}$ =	3	D (mL) $_{BU}$ =	0,5
Erro (mL) $_{PRO}$ =	0,08	Erro indic.$_{BU}$	0,007
k_{PRO} =	2,255	k_{BU} =	2,149
U_{PRO} =	0,1	U_{BU} =	0,2
Vol. Cal (mL) $_{PRO}$ =	100,08	Vol. Cal. (m	10,007
Δh (cm) =	0,05	Δh (cm) =	0,05
ΔT (°C) =	10	ΔT (°C) =	10

Incertezas:

u PRO	uPRO=	0,0443459	uBu	uBu =	0,0930665
	uEI =	0,0326599		uEI =	0,0028577
	uREP =	1,0008		uREP =	0,10007
	uDV =	0,1155624		uDV =	0,0115551
	uEM =	0,2040524		uEM =	0,0056681
	uPRO=	**0,0118118**		**uBu =**	**0,0137196**

u=BRANCO	**0,0036208**	Calibração do oxímetro

Fonte: O autor, 2020.

Figura 26 - Planilha eletrônica para calcular o resultado e estimar a incerteza da DBO

[X] Batelada com semente [ ] Batelada sem semente

CONTROLE DE SEMENTE

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Média da Depleção (mg/L de O_2 por mL de semente)	Coef. De Variação (%) do controle de Semente (< 30%)
OD_i (mg/L)	7,97	7,97	7,96					
OD_i > 1,0 mg/L	4,90	4,73	3,56					
Depleção	3,07	3,24	4,40					
Volume Semente (mL)	12,00	13,00	15,00					
Consumo de OD (mg/L de O_2 por mL de Semente)	0,26	0,25	0,29				0,2661	8,9%

CONTROLE DA ÁGUA DE DILUIÇÃO: Tolerável:< 0,2 mg/L de O_2

	B7	B8	B9	B10	OD_{H2O}, mg/L de O_2
OD_i (mg/L)	7,94	7,94	7,94		
OD_f (mg/L)	7,79	7,89	7,94		
Depleção (mg/L)	0,15	0,05	0,00		
Branco da Água de Diluição (mg/L de O_2)					0,07

Cálculo $DBO_5 = \frac{\left[\left(OD_1^* - OD_2^*\right) - S \times V_s\right] \times V_m}{V_{am}}$

Número da Amostra	Código do Frasco	Volume do frasco (mL)	(V_s) Volume de Semente no frasco (mL)	(V_{am}) Volume de Amostra (mL)	OD_1* inicial da amostra (mg/L O_2)	OD_1* final da amostra (mg/L O_2)	A depleção de OD ≥ 2,0 mg/L O_2?	Depleção (mg O_2/L)	Cálculo	Resultados, mg/L de O_2	Média dos resultados (mg/L de O_2)	Coef. de Variação %	Incerteza (mg/L)	Média da Incerteza (mg/L)
Padrão	456	301,91	1,50	4,00	7,89	5,04	SIM	2,85	[(7,89 - 5,04) - 0,2661 X 1,5] X 301,91 / 4,00	185	194	5%	± 4	198 +/- 30,5 mg/L de O_2
	470	296,57	1,50	5,00	7,89	4,24	SIM	3,65	[(7,89 - 4,24) - 0,2661 X 1,5)] X 296,57 / 5,00	193			± 5	
	475	301,87	1,50	6,00	7,89	3,44	SIM	4,45	[(7,89 - 3,44) - 0,2661 X 1,5)] X 301,87 / 6,00	204			± 5	
509-1	6	269,90	1,50	0,50	7,78	4,60	SIM	3,18	[(7,78 - 4,60) - 0,2661 X 1,5)] X 269,90 / 0,50	1501	1404	10%	± 19	± 27
	4	309,61	1,50	1,00	7,88	3,26	SIM	4,62	[(7,88 - 3,26) - 0,2661 X 1,5)] X 309,61 / 1,00	1307			± 19	
									[(-) - X)] X /				±	
509-3	1	296,00	1,50	50,00	7,73	7,00	NÃO	0,73	[(7,73 - 7,00) - 0,2661 X 1,5)] X 296,00 / 50,00	2	3	-	± 0,1	± 1
	4	309,61	1,50	80,00	7,70	6,98	NÃO	0,72	[(7,70 - 6,98) - 0,2661 X 1,5)] X 309,61 / 80,00	1			± 0,1	
	5	312,80	1,50	100,00	7,63	5,02	SIM	2,61	[(7,63 - 5,02) - 0,2661 X 1,5)] X 312,80 / 100,00	7			± 0,1	
510-1	605	300,00	1,50	5,00	7,81	3,93	SIM	3,88	[(7,81 - 3,93) - 0,2661 X 1,5)] X 300,00 / 5,00	209	209	-	± 4,7	± 5
									[(-) - X)] X /				±	
									[(-) - X)] X /				±	
527-2	422	302,15	1,50	50,00	7,67	5,77	NÃO	1,90	[(7,67 - 5,77) - 0,2661 X 1,5)] X 302,15 / 50,00	9	11	21%	± 0,1	± 2
	454	301,35	1,50	80,00	7,36	3,33	SIM	4,03	[(7,36 - 3,33) - 0,2661 X 1,5)] X 301,35 / 80,00	14			± 1,5	
	479	301,80	1,50	100,00	6,99	2,93	SIM	4,06	[(6,99 - 2,93) - 0,2661 X 1,5)] X 301,80 / 100,00	11			± 1,5	
527-3	514	297,09	1,50	50,00	7,59	6,99	NÃO	0,60	[(7,59 - 6,99) - 0,2661 X 1,5)] X 297,09 / 50,00	1	2	-	± 0,1	± 1
	527	296,64	1,50	80,00	7,44	6,31	NÃO	1,13	[(7,44 - 6,31) - 0,2661 X 1,5)] X 296,64 / 80,00	3			± 0,1	
	532	296,49	1,50	100,00	7,32	6,42	NÃO	0,90	[(7,32 - 6,42) - 0,2661 X 1,5)] X 296,49 / 100,00	1			± 0,1	

DEMONSTRAÇÃO DE CAPACIDADE DO ENSAIO

Avaliação	CONTROLES ANALÍTICOS											PARECER FINAL			
	Padrão de Glicose + Ác. Glutâmico (198 ± 30,5mg/L de O_2)	Coeficiente de Variação(< 30%)			Depleção de OD (> 2,0 mg/L de			OD Final (> 1,0 mg/L de O_2)			Branco da Água de Diluição (< 0,20 mg/L de O_2)	AVALIAÇÃO		DATA	ASSINATURA
		Amostras	Padrão	Contr. da Semente	Amostras	Padrão	Contr. da Semente	Amostras	Padrão	Contr. da Semente					
Satisfatório	◉	◉	◉	◉	○	◉	◉	◉	◉	◉	◉	Satisfatório	O		
Insatisfatório	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	Insatisfatório	O		
Satisfatório com	○	○	○	○	◉	○	○	○	○	○	○	Satisfatório com Exceções	O		

Data de Início	Data de término:	Digitado por:	Cálculos verificados por:	Data:	Dados verificados por:	Data:
15/03/2019	20/03/2019	Camilla	Luana	21.03.2019		

Fonte: O Autor, 2020.

ANEXO A - Método do ensaio DBO

Os ensaios de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) foram realizados com base nos procedimentos definidos no método 5210 B. 5-Day BOD Test descrito por AWWA (APHA, 2017), a seguir:

MATERIAIS E SOLUÇÕES

Equipamentos

a) Incubadora, capaz de atender faixa de 20 ± 1ºC;
b) Balança semi-analítica com precisão de 1mg;
c) Recipiente de 20L para preparo da água de diluição;
d) Frascos para oxigênio dissolvido;
e) Provetas de 100, 500 e 1000 mL com tampa;
f) Pipetas volumétricas de 1; 2; 5 e 10 mL;
g) Bécher de 50 e 100 mL;
h) Garrafa especial de DBO (garrafas de ± 300 mL com tampa esmerilhada);
i) Bomba a vácuo;
j) Bureta de 10 mL;
k) Termômetro;
l) pHmetro;
m) Medidor de oxigênio por luminescência;
n) Medidor de oxigênio dissolvido com eletrodo de membrana.

Reagentes

Solução tampão de fosfato: Dissolver 8,5 g de fosfato monopotassio (KH_2PO_4), 21,75 g de fosfato dipotássio (K_2HPO_4), 33,4 g de fosfato dissódio ($Na_2HPO_4 .7H_2O$), e 1,7 g de cloreto de amônio (NH_4Cl) em cerca de 500 mL de água e diluir para 1 L. O pH deve ser 7,2 sem ajuste posterior.

Solução de sulfato de magnésio: Dissolver 22,5 g de $MgSO_4.7H_2O$ em água e diluir para 1 L.

Solução de cloreto de cálcio ($CaCl_2$): Dissolver 27,5 g de $CaCl_2$ em água e diluir para 1 L.

Solução de cloreto férrico: Dissolver 0,25 g de $FeCl_3.6H_2O$ em água e diluir para 1 L.

Solução ácida e alcalina 1 N, para neutralização de amostras:
Ácido – Adicionar, vagarosamente, 28 mL de ácido sulfúrico concentrado à água. Diluir para 1 L.
Base – Dissolver 40 g de hidróxido de sódio em água. Diluir para 1 L.

Solução de sulfito de sódio: Dissolver 1,575 g de Na_2SO_3 em 1000mL de água. Esta solução é instável; preparar diariamente.

Solução de Glicose e Ácido Glutâmico (GGA): Secar os reagentes glicose e ácido glutâmico grau reagente, a 103ºC por 1h. Adicionar 150 mg de glicose e 150 mg de ácido glutâmico a água e diluir para 1L. Preparar imediatamente antes do uso a menos que a solução seja mantida em condição estéril. Armazenar todas as misturas GGA em ≤ 6ºC.

Solução de cloreto de amônio: Dissolver 1,15 g de NH_4Cl em cerca de 500 mL de água de grau reagente, ajustar o pH para 7,2 com solução de NaOH e diluir para 1L. A solução contém 0,3 mg de N/mL.

Água de diluição DBO: água de nascente, na região montanhosa de Campos do Jordão – SP.

DETALHAMENTO

Condições ambientais do trabalho

A metodologia informa que devem ser garantidas as temperaturas das etapas críticas do ensaio: água de diluição: 20 ± 1ºC; pré-tratamento da amostra: 20 ± 3ºC;

preparo da água de diluição: 20 ± 3ºC; manuseio das amostras: 20 ± 3ºC e incubação das amostras: 20 ± 1ºC.

Preservação e validade da amostra

Armazenar amostra em frasco de polietileno ou vidro preferencialmente, com volume mínimo de 500 mL. A amostra deve ser analisada logo após a coleta, caso contrário, armazená-la em temperatura de ≤ 6°C. Prazo recomendado para a análise é de 6 h, preferencialmente, e 48 h, no máximo.

Interferentes

Substâncias tóxicas: certos despejos industriais, por exemplo, despejos de galvanização, contêm metais tóxicos. Tais amostras geralmente necessitam de um estudo e tratamento especiais. No entanto, a própria diluição da amostra reduz a interferência de materiais tóxicos.

Compostos de cloro residual: amostras cloradas podem não conter uma população microbiana suficiente. No caso em que o cloro residual não se dissipe em um tempo razoavelmente curto, proceder a eliminação do cloro residual pela adição de solução de $Na_2S_2O_3$, com a menor quantidade suficiente para não diluir a amostra.

Alternativamente, o cloro residual em amostras pode ser eliminado por aquecimento em banho maria, pois é volátil acima de 35 ºC. Neste caso, outras substâncias voláteis também serão eliminadas por aquecimento. Considerar esta informação e registrar no relatório de ensaio para analisar criticamente os resultados obtidos.

Amostras supersaturadas com oxigênio: amostras que contenham mais de 9 $mg.L^{-1}$ podem causar perda de oxigênio durante a incubação. Reduzir o OD para saturação a 20ºC através da agitação da amostra em recipiente parcialmente preenchido ou por aeração com ar comprimido limpo e filtrado.

Amostras contendo alcalinidade cáustica (pH > 8) ou acidez (pH < 6): Pode produzir a desnaturação de proteínas e, consequentemente, a inativação da maioria das enzimas. Neutralizar, se necessário, as amostras para pH a faixa de 6,5 - 7,5 com solução de ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio 1N (ou concentrações diferentes), de tal modo que a quantidade de reagente não dilua a amostra por mais de 0,5%.

População microbiana: é necessário ter presente uma população de microrganismos capaz de oxidar a matéria orgânica biodegradável na amostra. Alguns despejos industriais não tratados, despejos desinfetados, com altas temperaturas ou com valores extremos de pH não contêm uma população microbiana suficiente. Para tais despejos, semear a água de diluição ou a amostra utilizando uma população de microrganismos (semente). Pode-se utilizar como semente o efluente ou lodo misturado de um processo de tratamento biológico ou o sobrenadante de água residuária doméstica (esgoto doméstico), após sedimentação à temperatura ambiente por pelo menos 1h e não mais que 36h.

Amostras contendo peróxido de hidrogênio: o excesso em amostras de alguns processos industriais, tais como fábricas de papel e nas indústrias de tecidos, pode causar supersaturação dos níveis de oxigênio nas amostras. Para eliminação, devem-se misturar tais amostras vigorosamente em recipientes abertos por tempo suficiente, para permitir a dissipação do peróxido. Verificar a eficiência da remoção observando as concentrações de oxigênio durante o tempo de mistura ou utilizando tiras de teste específicas para peróxido. Os tempos de mistura podem variar de 1 a 2 h dependendo da concentração de peróxido. A reação pode ser considerada completa quando a concentração de OD não aumentar durante 30 minutos após a mistura.

3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Preparo da Água de Diluição

Estimar o volume de água de diluição a ser utilizado da seguinte forma:

$$V_t = 1{,}2 \times (A \times 3 + B + P) \times 300 \qquad (83)$$

Sabendo que:

A = quantidade de amostras a analisar;

B = quantidade de brancos;

P = quantidade de padrões;

300 mL = volume médio das garrafas de DBO;

V_T = volume total da água de diluição, em mL;

Colocar o volume de água mineral estimado no recipiente de água de diluição. Não é necessário promover a areação da água de diluição se a concentração de OD for igual ou superior a 7,50 $mg.L^{-1}$ de O_2. Adicionar as soluções nutrientes durante o preenchimento do recipiente para promover homogeneização. Aguardar no mínimo 30 minutos para utilizar a água. Se a água estiver com OD inferior a 7,5 $mg.L^{-1}$ promover a aeração de acordo: Saturar com oxigênio a água de diluição por aproximadamente (10 – 20) minutos através de aeração utilizando uma bomba de vácuo, tubos de silicone e pedra porosa de vidro. Durante a aeração, adicionar para cada litro de água aerada, 1mL de cada uma das seguintes soluções: tampão de fosfatos, solução de sulfato de magnésio 22,5 $g.L^{-1}$, cloreto de cálcio 27,5 $g.L^{-1}$ e cloreto férrico 0,25 $g.L^{-1}$.

Deixar a água de diluição em repouso em geladeira com temperatura (20 ± 1ºC), por aproximadamente 1 a 2 horas antes do início do teste. Não armazenar água de diluição por mais de 24 horas, principalmente se já foram adicionados os nutrientes.

Determinação do oxigênio dissolvido dos brancos da água de diluição

Inicialmente encher 4 frascos de DBO com água de diluição. Separar uma garrafa para determinação do oxigênio dissolvido (inicial) pelo método de Winkler. Os outros três (3) frascos de DBO com água de diluição devem ser armazenados na incubadora por 5 dias a 20 ± 1°C, para determinação do OD final. Após o 5º dia, retirar os 3 frascos da incubadora e determinar o oxigênio dissolvido (final) pelo método de Winkler. Registrar os dados brutos e calcular o OD.

Preparo das amostras, brancos e padrões

Para cada dia de trabalho, analisar, no mínimo, 3 controles de semente, 3 padrões de controle de 300 $mg.L^{-1}$ de glicose + ácido glutâmico e 3 ensaios brancos sem adição de semente para controle da água de diluição. Os controles de semente e padrões deverão ser tratados da mesma forma que as amostras.

Em caixa plástica contendo água na faixa de 20 ± 1ºC, alcançada com gelo gel, deixar as amostras atingirem equilíbrio térmico antes do início do ensaio. O mesmo tratamento deve ser adotado quando concluir o ensaio DBO após o 5º dia. Ao retirar os frascos da incubadora, mantê-los em caixa plástica contendo água na faixa de 20 ± 1ºC.

Para cada amostra utilizam-se três garrafas de DBO, podendo, também, fazer uma quarta diluição, se a experiência com a amostra particular for desconhecida. Para evitar grandes diluições da amostra, estimar uma faixa de volume de amostra (Va), em mL, a ser utilizado nas garrafas através do valor da DQO, em mgL^{-1} de O_2, conforme a seguir: Frasco 1 (1200/DQO); Frasco 2 (1500/DQO); Frasco 3 (2100/DQO); Frasco 4 (valor intermediário entre as outras garrafas).

Verificar o pH de todas as amostras usando pHmetro. Se pH < 6,0 ou pH > 8,0 devem ser neutralizadas para pH na faixa de 6,5 – 7,5 utilizando solução de H_2SO_4 ou NaOH, de modo a não diluir a amostra por mais de 0,5%.

Verificar o cloro residual, com medidor de cloro, das amostras brutas provenientes de despejos industriais, efluentes industriais ou águas residuárias contaminadas por cloro. Eliminar conforme detalhado no tratamento de interferências.

Amostras com elevado teor de matéria orgânica, fazer diluições maiores 1:100.

Uso da semente liofilizada:

Preparar a semente pela adição de uma ampola em 500 mL de água mineral. Fazer aeração por 30 minutos, esperar que ocorra a sedimentação e utilizar apenas

o sobrenadante. Em cada garrafa de amostra e padrão, adicionar entre 0,5 a 1,5 mL de semente liofilizada. Não utilizar semente com pH fora da faixa 6,0 – 8,0.

Para amostras que se tenha o conhecimento de terem passado por algum processo de desinfecção ou que apresentem condições extremas de pH, como amostras de chorume, utilizar volumes maiores de esgoto (semente). Em paralelo, inocular em 3 garrafas distintas a solução padrão de verificação (solução glicose + ácido glutâmico 300 $mg.L^{-1}$ de O_2).

Determinação do oxigênio inicial e final do ensaio

A determinação do oxigênio dissolvido inicial e final das amostras e brancos de semente deverá ser realizada por oxímetro, após calibração pelo método de Winkler. Registrar o valor do oxigênio dissolvido de cada amostra na ficha de dado bruto.

Fazer o ajuste do oxímetro utilizando duas garrafas de DBO, preenchidas cuidadosamente com água de diluição, no mesmo instante, evitando formação de bolhas de ar e manter o selo d'água. Na primeira garrafa medir a concentração do OD com uso do oxímetro. Utilizar a segunda garrafa para determinar o OD pelo método de Winkler.

Preencher a garrafa do branco da água de diluição. Usar um tubo de silicone que deverá ser conectado a torneira da recipiente de água de diluição. Inserir o tubo no interior da garrafa de DBO, sem manter contato com o líquido para evitar contaminação. Abrir a torneira da recipiente e, com cuidado para evitar o borbulhamento dentro da garrafa de DBO, deixar a água escorrer. Conforme a garrafa de DBO for sendo preenchido, suspender lentamente o tubo de silicone até que todo o frasco esteja preenchido com água de diluição.

Inserir de 0,5 a 1,5 mL de semente devidamente preparada em cada frasco DBO.

Com auxílio de proveta ou pipeta, transferir para o frasco DBO a alíquota (volume) da amostra estimada com base no valor da DQO. Completar o volume das garrafas com água de diluição até o gargalo. Evitar ao máximo o borbulhamento durante o preenchimento da garrafa.

Fazer a leitura inicial de oxigênio dissolvido inicial das amostras com auxílio do oxímetro. Iniciar a leitura de OD das bateladas pelo branco da água de diluição, controle de semente, padrão e amostras. Se necessário, recolocar água de diluição após a leitura do OD para repor o conteúdo deslocado com a introdução da sonda na garrafa de DBO. Registrar a leitura do OD inicial de cada amostra, branco e padrão diretamente na ficha de dados brutos.

Fechar cuidadosamente cada garrafa de DBO de modo a formar um selo de água (excesso de água de diluição que ultrapassa o gargalo, mas não transborda) e não ocasionar bolhas no interior da garrafa.

Transferir os frascos DBO para a incubadora por 5 dias a 20 ± 1ºC, dentro de bacias contendo água, de modo que as garrafas fiquem submersas cerca de 2/3 da sua altura. No quinto dia fazer a leitura do oxigênio final com auxílio do oxímetro calibrado.

Registrar a leitura do oxigênio dissolvido final de cada amostra, branco e padrão na ficha de dado bruto. Qualquer ocorrência durante o procedimento que venha interferir no ensaio deverá ser registrada na ficha de dados brutos.

RESULTADOS

Cálculo da DBO

$$DBO_5, mg.L^{-1}\ de\ O_2 = \frac{[(D_1 - D_2) - (S) \times V_s] \times V_m}{V_a} \quad (84)$$

Sabendo que:

D_1: OD inicial da amostra, em mg.L^{-1} de O_2;

D_2: OD final da amostra após 5 dias de incubação a 20 ± 1ºC, em mg.L^{-1} de O_2;

S: Depleção de oxigênio da semente (diversidade de microrganismos responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica). É calculada pela variação do OD por mL de suspensão de semente adicionada por garrafa (S = 0 se as amostras não forem semeadas);

V_s: Volume da semente no respectivo frasco de DBO, em mL;

V_m: Volume médio da garrafa de DBO, em mL;

V_a: Volume de amostra, em mL.

De posse dos resultados de cada diluição da amostra e na ausência de uma anomalia óbvia, reportar a média dos resultados válidos. Os resultados de oxigênio dissolvido devem ser expressos com duas casas decimais. O resultado da DBO em número inteiro, em $mg.L^{-1}$ de O_2.

Caso os resultados divergirem entre si, os mesmos devem ser analisados criticamente, pelo laboratório, levando em consideração o volume da amostra utilizado no ensaio, a origem da amostra e a depleção de O_2 obtida, os resultados devem apresentar valores com divergência máxima e 30% entre o menor e maior valores.

ACEITAÇÃO DOS RESULTADOS

Utilizar a média aritmética dos valores de oxigênio dissolvido nas leituras dos ensaios de controle de semente. Se, a partir da recuperação do padrão, algum resultado do branco for suspeito, desconsidere-o dos cálculos. Faça uma observação e investigue a causa.

Observar as concentrações de OD no ensaio. O OD inicial apresenta, geralmente, concentrações com valores próximos. Caso haja alguma oscilação acentuada ou tendenciosa, realizar a verificação e ajuste do oxímetro. Para os casos onde a estabilização da concentração seja demorada, verificar o oxímetro.

É importante destacar que o volume utilizado de amostra pode promover o aumento ou diminuição do OD inicial, em virtude da matriz analisada. Por exemplo: em matrizes de lagoa e água de rio, observa-se concentração de OD elevada, já amostras de efluente tratado, tais como, petroquímica, chorume, apresentam baixa concentração.

A depleção de oxigênio dissolvido atribuída ao controle de semente deve ser no mínimo 2 $mg.L^{-1}$ e um OD residual de, no mínimo, 1 $mg.L^{-1}$ após 5 dias de inoculação.

As amostras diluídas que apresentem resultados de Oxigênio Dissolvido, após 5 dias de incubação, menores que 1,0 $mg.L^{-1}$ de O_2 devem ser rejeitadas e, para efeitos de cálculos, considerar apenas aquelas diluições com OD final maior que 1,0 $mg.L^{-1}$ de O_2.

Plotar o resultado do padrão na planilha de carta controle. Padrões com recuperação satisfatória liberar os resultados de DBO, quando ultrapassar os limites, rejeitar o teste e repetir o ensaio de DBO com uma amostra recém coletada ou relatar no relatório final como controle de qualidade não atendido.