

Agradecimentos

Como parte da formação académica, profissional e até individual, é adquirida pela partilha de experiências, pelos ensinamentos, colaboração, apoio, dedicação e disponibilidade, desejo expressar o meu sincero agradecimento e reconhecimento a todos os que me ajudaram ao longo destes dois anos de Mestrado em Química e que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Desta forma, gostaria de agradecer ao Dr. Américo Freitas e ao Dr. António Ferreira Neves, responsáveis pela direcção da empresa A3 – Análises, Águas e Alimentos, Lda., por me terem acolhido durante este período de estágio na sua empresa.

Assim, não poderei deixar de expressar o meu agradecimento à Doutora Elisabete Lima, Responsável Técnica de Química, pela dedicação, pelo acompanhamento e interesse no meu trabalho realizado, pela transmissão de conhecimentos, pelo companheirismo e por todos os momentos passados no laboratório, pois sei que ganhei uma grande amiga para a vida.

O meu próximo agradecimento é dirigido à Engenheira Mónica Leal, que sempre se preocupou com a escrita desta dissertação, pela disponibilidade em esclarecer de todas as minhas dúvidas e acima de tudo, por sempre me ter tratado da mesma maneira, desde o primeiro ao meu último dia de estágio.

De seguida gostaria de agradecer ao Miguel Santos pela demonstração de lealdade, pela defesa dos seus princípios e ideais e ainda pelas dicas dadas sobre “sobrevivência”.

Mas, tudo isto não seria possível sem a orientação, a disponibilidade e paciência do Professor Doutor Jorge Luís Gabriel F. S. Costa Pereira, que cativou e motivou os seus alunos para a descoberta do mundo exterior ao departamento, auxiliando na utilização de ferramentas estatísticas, que no início eram vistas apenas como simples ferramentas teóricas, mas com uma forte componente prática que com um pouco de imaginação e engenho nos podem ser muito úteis em qualquer ramo de actividade, independentemente do tipo de produto ou serviço que estamos a estudar.

Um agradecimento muito especial às minhas grandes amigas de curso, que partilharam comigo todos estes anos e os quais eu garanto que nunca esquecerei.

Por último, dirijo-me a um conjunto de pessoas que são e serão insubstituíveis nesta e noutras fases da minha vida, cujas palavras de agradecimento são insignificantes comparando com a importância do seu contributo – Mãe, Irmã e Daniel, muito obrigado.

No fundo todo este trabalho é o reflexo de um conjunto de pessoas que tive o prazer de encontrar e que em muito influenciaram na minha formação não só neste momento mas também na construção do meu futuro.

Um sincero OBRIGADO a todos!

Objectivos

Sendo este um projecto desenvolvido para o Mestrado em Química, vertente de Controlo de Qualidade e Ambiente, os seus principais objectivos focam-se na obtenção de competências profissionais no controlo químico de qualidade, nomeadamente no desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos e ainda no desenvolvimento de conhecimentos em auditorias.

Estes também foram os principais objectivos a atingir com este estágio laboratorial, os quais garantiram a consolidação das bases teóricas adquiridas durante o processo de aprendizagem, visando a iniciação como profissional no mercado de trabalho relacionado com o controlo químico da qualidade.

Resumo

A validação de um método analítico determina o desempenho característico de um método, partindo-se da avaliação de parâmetros como a exactidão, precisão, selectividade, linearidade e gama de trabalho, limites de detecção e quantificação, variações intralaboratoriais e interlaboratoriais.

Deste modo, o presente trabalho teve como base o desenvolvimento, implementação e teste em condições reais do método para a determinação de fósforo total que, de alguma forma, tenha sido provado que tais métodos executam e conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida.

Com o recurso à estatística conseguiu-se atingir o objectivo inicialmente proposto, bem como a validação do método estudado.

Abstract

The validation of an analytical method determines the performance characteristics of a method, starting from the evaluation of parameters such as accuracy, precision, selectivity, linearity and working range, limits of detection and qualification, interlaboratorial and interlaboratorial variations.

Therefore, this work was based on the development, implementation and testing under real conditions of the method for the determination of total phosphorus that, somehow, has been proven that such methods perform and conduct a credible and appropriate to the desired quality.

With the use of statistical tools was possible to reach the objective initially proposed, as well as the validation of the method studied.

Lista de Acrónimos

ANOVA – Análise de variâncias

CE – Comunidade Europeia

EN – Norma Europeia

HACCP – Hazard Analysis and Critical Control Points

ICH – Conferência Internacional sobre a Harmonização

IEC – International Electrotechnical Commission

IPAC – Instituto Português de Acreditação

ISO – International Standardization Organization

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MCR – Material Certificado de Referência

MQ – Manual da Qualidade

MRI – Material de Referência Interno

NP – Norma Portuguesa

PO – Procedimentos Operacionais

PSQ – Procedimentos do Sistema da Qualidade

SQ – Sistema da Qualidade

SS – Soma de Quadrados

VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo Recomendável

Lista de Símbolos

ΔE – Diferença de energia

ΔS^2 – Diferença de variâncias

ε – Absortividade molar

ν – Graus de liberdade

σ_0 – Desvio padrão do branco

σ_{b_0} – Desvio padrão da ordenada de origem

σ_{b_1} – Desvio padrão da sensibilidade

σ_{fit}^2 – Variância do ajuste

σ_T – Estimativa de repetibilidade

τ – Valor conhecido ou real

A – Absorvância

AL_x – Linha de acção da carta de controlo de posição (X-chart)

AL_r – Linha de acção da carta de controlo de dispersão (R-chart)

b_0 – Ordenada na origem

b_1 – Declive

CL_x – Linha central da carta de controlo de posição (X-chart)

CL_r – Linha central da carta de controlo de dispersão (R-chart)

dy/dx – Derivada do sinal instrumental em ordem à concentração

dx – Incremento na concentração

dy – Incremento na resposta instrumental

E – Sensibilidade

E_i – Energia do estado fundamental

E_f – Energia do estado excitado

F – Valor teste de Fisher

$F_{\alpha(f)}^u$ – Valor crítico previsto para a distribuição de Fisher em modo unilateral e referente ao grau de confiança de $100 \times (1 - \alpha)\%$ com f graus de liberdade

G – Valor teste de Grubbs

$G_{\alpha(m)}$ – Valor crítico para o teste de Grubbs ao nível de confiança de $100 \times (1 - \alpha)\%$ com m valores experimentais

h – Constante de Plank

H_0 – Hipótese nula

H_1 – Hipótese alternativa

I – Intensidade da radiação transmitida

I_0 – Intensidade da radiação incidente

l – Percurso óptico

p – Número dos parâmetros do modelo

P_1 – Polinómio completo de primeiro grau ($y = b_0 + b_1 \cdot x$)

P_2 – Polinómio completo de segundo grau ($y = b_0 + b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^2$)

p_{H_0} – Valor prova

r – Limite de repetibilidade

R – Limite de reprodutibilidade

s – Desvio padrão

S^2 – Variância

S_{ri} – Desvio padrão de repetibilidade

S_{Ri} – Desvio padrão de reprodutibilidade

S_{y1} – Desvio padrão residual do ajuste polinomial de 1º grau

S_{y2} – Desvio padrão residual do ajuste polinomial de 2º grau

SS_0 – Dispersão puramente aleatória

SS_A – Dispersão do factor A

SS_B – Dispersão do factor B

SS_T – Dispersão total

TV – Valor de teste (test value)

$t_{\alpha(f)}^b$ – Valor crítico previsto para a distribuição de Student em modo unilateral e referente ao grau de confiança de $100 \times (1 - \alpha)\%$ com f graus de liberdade

WL_x – Linha de aviso da carta de controlo de posição (X-chart)

WL_r – Linha de aviso da carta de controlo de dispersão (R-chart)

\bar{x} – Valor médio

X_0 – Média aritmética dos valores

$x_?$ – Valor suspeito

$x_{adicionado}$ – Concentração adicionada do padrão

x_i – Concentração dos padrões

$x_{inicial}$ – Concentração inicial da amostra

x_{Total} – Concentração final da amostra

$\%RE$ – Erro relativo percentual (relative error)

$\%RI$ – Taxa de recuperação percentual (recovery index)

Índice

1. Introdução	1
1.1 Laboratório de controlo de qualidade	3
1.2 Qualidade	4
1.2.1 Sistemas de qualidade.....	5
1.2.2 Certificação e acreditação.....	9
2. Fundamentação.....	13
2.1 Água.....	15
2.1.1 Poluição da água	16
2.2 Fósforo	17
2.2.1 Análise do fósforo total.....	18
2.3 Método de análise.....	20
2.3.1 Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-visível.....	20
2.3.2 Componentes do espectrofotómetro	21
2.4 Estatística	24
2.4.1 Procedimento.....	25
2.4.2 Confronto de valores.....	26
2.4.3 Estimativas populacionais	28
2.4.4 Quantificação	28
2.4.5 Análise de variabilidade	28
2.4.6 Cartas de controlo	29
2.4.7 Comparação	29
2.5 Validação de um método analítico.....	30
2.5.1 Identificação do analito.....	31
2.5.2 Especificidade e selectividade.....	31
2.5.3 Gama de trabalho.....	32
2.5.4 Linearidade.....	32
2.5.5 Sensibilidade	32
2.5.6 Limiares analíticos	33
2.5.6.1 Limite de detecção	34
2.5.6.2 Limite de quantificação.....	34
2.5.7 Precisão	34
2.5.8 Exactidão	35

2.5.9	Robustez.....	36
2.5.10	Coerência.....	36
3.	Procedimentos	37
3.1	Determinação de fósforo total.....	39
3.1.1	Reagentes.....	39
3.1.2	Material	39
3.1.3	Descrição do procedimento experimental.....	40
3.2	Tratamento de resultados.....	40
3.2.1	Estimativa central e de dispersão	41
3.2.2	Análise de valores discrepantes populacionais.....	41
3.2.3	Análise da variabilidade	42
3.2.4	Escolha do modelo	42
3.2.5	Verificação de valores discrepantes do modelo	43
3.2.6	Análise de variância.....	44
3.2.6.1	Efeito de factor único	44
3.2.6.2	Efeito de factor duplo.....	46
3.2.7	Carta de controlo de posição	48
3.2.8	Carta de controlo de dispersão	49
3.2.9	Comparação de estimativas	50
3.2.9.1	Teste <i>t</i> -student	50
3.2.9.2	Teste <i>t</i> -emparelhado	51
3.3	Processo de validação	51
3.3.1	Especificidade e selectividade.....	51
3.3.2	Gama de trabalho.....	52
3.3.3	Linearidade.....	53
3.3.4	Limite de detecção	55
3.3.5	Limite de quantificação	57
3.3.6	Precisão	57
4.	Resultados e Discussão	59
4.1.	Verificação dos espectros dos padrões.....	61
4.2.	Estudo da estabilidade do sinal analítico	62
4.3.	Definição da gama de trabalho	64
4.4.	Verificação da linearidade.....	65
4.5.	Definição da sensibilidade.....	67

4.6.	Estudo dos limiares analíticos	67
4.7.	Avaliação da precisão	71
4.8.	Estudo da exactidão	72
4.9.	Avaliação da estabilidade das curvas de calibração.....	73
4.10.	Coerência da calibração	75
5.	Conclusão	77
	Bibliografia	82
	ANEXOS	85

Capítulo **1**

Introdução

Este trabalho foi realizado no âmbito da disciplina de Projecto de Mestrado em Química, na área de Controlo de Qualidade e Ambiente do Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

O presente capítulo visa fazer o enquadramento do trabalho realizado, desde a apresentação da empresa e o meio envolvente do trabalho desenvolvido, passando por uma breve descrição da evolução da Qualidade, desde o seu início até ao desenvolvimento actual, bem como a sua importância, independentemente da sua área de aplicação.

1.1 Laboratório de controlo de qualidade

A empresa A3 – Análises, Águas e Alimentos, Lda. encontra-se sedada em Ílhavo desde 2006 e pertence ao grupo Avelab muito conceituado em todo o distrito. Realiza análises laboratoriais em águas e alimentos e presta serviços de apoio, nomeadamente auditorias e assessoria técnica na área de segurança alimentar.

O Laboratório A3 está acreditado, desde 2010, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 pela entidade acreditadora nacional, o Instituto Português de Acreditação (IPAC), com o certificado de acreditação número L0502. O âmbito da sua acreditação abrange a colheita de amostras, ensaios físico-químicos e microbiológicos de água de consumo, processo e piscinas.

Um laboratório acreditado oferece a garantia da sua integridade e competência no serviço prestado. O Laboratório A3 tem a qualidade dos serviços prestados como um dos factores estratégicos do seu desenvolvimento. O controlo de qualidade encontra-se presente em duas áreas distintas: área ambiental relativamente à qualidade da água e área alimentar no controlo analítico do sector da restauração e indústria alimentar.

O sistema de Gestão implementado assenta num conjunto de acções que visam atingir os seguintes valores: cumprir a NP EN ISO/IEC 17025 e melhorar continuamente a eficácia do Sistema de Gestão da Qualidade; cumprir as boas práticas de laboratório de forma a garantir a qualidade dos resultados fornecidos ao cliente; prestação de um serviço de rigor e excelência cumprindo os requisitos dos clientes bem como os legais, normativos e regulamentares; obter o reconhecimento de competência técnica pela entidade nacional acreditadora, garantindo

credibilidade e profissionalismo; promover a formação contínua dos colaboradores, de modo a manter a qualificação necessária à fiabilidade do seu desempenho.

Para garantir a qualidade da água existe um conjunto de critérios, normas e exigências da legislação que é necessário monitorizar. Para tal, o Laboratório A3 assegura esse controlo através da realização de análises físico-químicas e microbiológicas aos diferentes tipos de água.

A segurança alimentar desempenha cada vez mais um papel determinante na saúde pública e constitui um factor de crescente preocupação por parte das autoridades e consumidores, obrigando a um controlo de qualidade por todos os intervenientes do sector. Tal como no controlo de qualidade da água, o Laboratório A3 garante o controlo de qualidade dos alimentos através da monitorização de parâmetros como a higiene, integridade, existência de contaminantes, entre outros, pela realização de ensaios físico-químicos e microbiológicos a diferentes matrizes alimentares.

A área de consultoria tem um papel preponderante no cumprimento das normas de segurança alimentar e para tal devem ser garantidas as normas impostas pela Comunidade Europeia de modo a salvaguardar os consumidores. Para tal, é necessária a implementação do Sistema HACCP, segundo os Regulamentos (CE) nº 852/2004 e 853/2004, ao qual a A3 dá apoio, de forma a assegurar a qualidade e segurança alimentar de quem procura este serviço.

1.2 Qualidade

O conceito Qualidade encontra-se inequivocamente, associado ao sentido de bem-estar, satisfação do cliente, garantia de satisfação e fiabilidade do produto. A evolução da Qualidade ao longo do Século XX é um processo gradual, que pode ser descrita muito brevemente em quatro etapas distintas: inspecção, controlo da qualidade, garantia da qualidade e gestão da qualidade total.

A **etapa da inspecção** da qualidade surgiu com a Revolução Industrial, assistindo-se à massificação da produção, levando a uma quantidade elevada de produção defeituosa, que era detectada pelos inspectores da qualidade, que se limitavam a separar os produtos não conformes dos produtos conformes. Por volta dos anos 30, surge a **etapa do controlo de qualidade**, a partir da qual se inicia a aplicação de algumas técnicas estatísticas, bem como a supervisão das técnicas de controlo de amostragem e as causas que levam à produção de

produtos não conformes. A **etapa da garantia da qualidade** surgiu no decurso da década de 60, onde o termo Garantia da Qualidade funcionava como forma de assegurar a qualidade final do produto ou serviço prestado. No final dos anos 80, surgiu a **etapa da gestão da qualidade total**, completamente focado nas pessoas, que visava o aumento contínuo da satisfação dos clientes, a custos reais e cada vez mais baixos, envolvendo todas as áreas funcionais da empresa, bem como todos os seus colaboradores, fornecedores e clientes^[1].

Nesta etapa do trabalho o tema “Qualidade” vai ser aprofundado, apresentando os principais factores do sistema da qualidade num laboratório, bem como a referência aos termos Certificação e Acreditação.

1.2.1 Sistemas de qualidade

A implementação de Sistemas da Qualidade (SQ) tem como principal objectivo facilitar os intercâmbios internacionais de ensaios, através da adopção de normas comuns em organizações de diferentes países. Assim, o Sistema de Qualidade procura o controlo e a melhoria contínua dos processos de trabalho para uma crescente satisfação dos seus clientes.

No Sistema de Gestão da Qualidade, a organização diz o que vai fazer (a nível das normas e procedimentos documentados), faz o que pretende e prova o que fez (por meio dos documentos). Através das informações registadas em suportes físicos são objectivadas as acções, possibilitando o controlo dos resultados.

Segundo a Norma ISO 9000:2000, um sistema de gestão da qualidade procura auxiliar organizações a aumentar continuamente a satisfação de seus clientes, atendendo às suas necessidades e expectativas. Estas expectativas são continuamente reflectidas em requisitos para materiais, serviços e informações e são partilhadas por um grande número de organizações em todo o mundo. Trata-se de uma rede internacional de informações sobre normas, padrões e qualificações para o alcance da qualidade por excelência^[2].

O sistema da qualidade é formado por três áreas, figura (1.1): estrutura organizacional, documental e funcional.

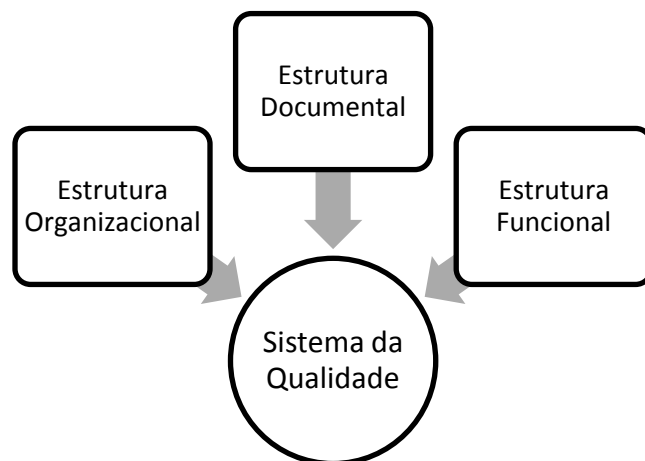


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo das áreas envolvidas do Sistema de Qualidade.

A **estrutura organizacional** define as políticas, que são a base para se construírem estratégias, se formularem planos de acção e se tomarem decisões. Dela também fazem parte a Política da Qualidade de uma empresa, o cumprimento dos requisitos da norma de referência e a melhoria contínua e sustentável do Sistema da Qualidade, para uma melhor satisfação dos clientes. Por fim na estrutura organizacional ainda são definidas, as funções e responsabilidades de todo o pessoal envolvido ou abrangido pelo Sistema da Qualidade^[3].

Num Sistema da Qualidade, tanto as funções, como as responsabilidades, devem ser transmitidas de uma forma clara, sendo que a autoridade atribuída a um elemento do laboratório, obriga-o a comprometer-se sobre a correcta actuação do laboratório nessa área de actividade e a responder perante uma falha.

O pessoal efectivo ou contratado de um laboratório deve incluir um director, um director técnico, um gestor da qualidade e técnicos de controlo da qualidade. É frequente os laboratórios terem ainda um responsável financeiro e auxiliares. O director é o responsável máximo do laboratório. A sua função é disponibilizar os meios para concretizar a política de qualidade assumida, garantir a competência de todos os colaboradores e supervisionar a actuação do laboratório a todos os níveis. Ainda faz parte das suas responsabilidades a nomeação do director técnico e do gestor da qualidade, assim como a aprovação do Manual da Qualidade (MQ).

O director técnico é o responsável pela componente técnica do laboratório e a sua principal função diz respeito à validação dos resultados emitidos. É também responsável pelo levantamento das necessidades de formação técnica do pessoal, pela revisão e aprovação dos documentos do Sistema da Qualidade (MQ – Manual da Qualidade, PSQ – Procedimentos do

Sistema da Qualidade, PO – Procedimentos Operacionais, e Registos) e pela análise dos certificados de calibração e do trabalho não-conforme da área técnica, bem como a implementação das acções correctivas que conduzam ao seu encerramento.

O gestor da qualidade tem a seu cargo a implementação do Sistema da Qualidade, bem como a sua optimização e sustentabilidade. É também sua função elaborar o Manual da Qualidade, garantir o cumprimento de todos os requisitos a nível normativo, gerir os documentos do laboratório, realizar auditorias não programadas e elaborar o relatório de revisão do Sistema de Qualidade, fazer o levantamento das necessidades de formação do pessoal na área da qualidade e ainda a elaboração, revisão e aprovação dos Procedimentos do Sistema da Qualidade, Procedimentos Operacionais e Registos.

Os técnicos de controlo, têm a função de executar os ensaios e/ou calibrações, de acordo com o Manual da Qualidade, Procedimentos do Sistema da Qualidade e Procedimentos Operacionais. Fazem parte da responsabilidade destes a gestão dos reagentes, material, entre outros e ainda a verificação e manutenção do equipamento e, por vezes, a recepção das amostras. Finalmente, existem os auxiliares de laboratório que apesar de terem responsabilidade limitada podem influenciar de forma indirecta nos resultados analíticos, uma vez que: interagem com o ambiente do laboratório durante a actividade de limpeza, são responsáveis pela lavagem do material de laboratório e na ausência de técnicos de controlo podem receber materiais, amostras e reagentes.

A **estrutura documental** é formada por um conjunto de documentos hierarquizados que formalmente sustentam o Sistema da Qualidade, tal como é demonstrado na figura (1.2). Além dos documentos referidos em baixo, ainda se pode considerar o documento de referência do guia, especificações de clientes, certificados de calibração, e outros^[3].



Figura 1.2 – Esquema hierárquico representativo da estrutura documental do Sistema de Qualidade.

No topo da hierarquia encontra-se o Manual da Qualidade, que é definido como sendo um documento interno elaborado pelo próprio laboratório, onde se encontra uma descrição geral do Sistema de Qualidade do laboratório. Aqui encontra-se uma declaração emitida pelo mesmo laboratório sobre a política da qualidade, bem como os pontos que servem como indicação para a implementação e o cumprimento do documento de referência.

No patamar inferior, encontram-se os Procedimentos do Sistema da Qualidade, que pretendem complementar a informação descrita no Manual de Qualidade, sistematizando e descrevendo a forma de proceder à implementação da Qualidade.

Os Procedimentos Técnicos de Ensaio e as Especificações Técnicas fazem parte do seguinte patamar. Estes contêm toda a informação de carácter técnico-operativo de um ensaio de acreditação e de controlo de qualidade.

Por último, na base da pirâmide encontra-se os Impressos, que funcionam como documentos de suporte para a criação de registos do Sistema da Qualidade do laboratório, após preenchido, verificado e aprovado.

E finalmente, a última área do Sistema de Qualidade: **estrutura funcional**, figura (1.3), que é constituída por vários factores que influenciam de forma directa a qualidade de resultados, como é o exemplo dos métodos e equipamentos, que têm de ser adequados e específicos, encontrando-se em bom estado e bem calibrados; as matérias-primas, que devem ser de boa referência, bons reagentes e consumíveis; e a equipa profissional, que deve ser qualificada e possuir uma formação contínua^[3].

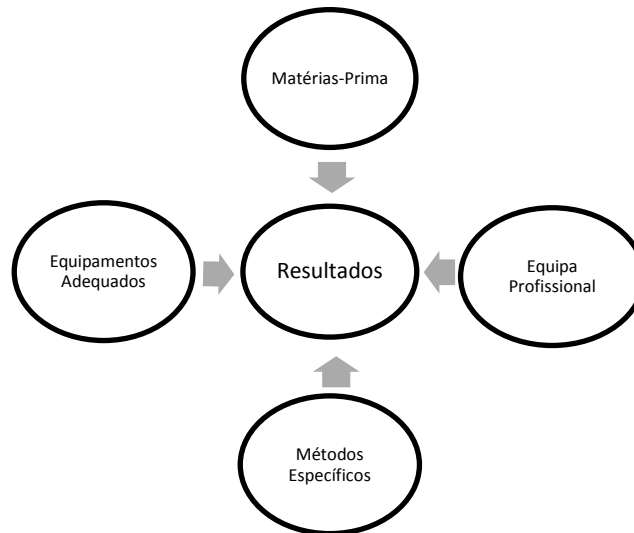


Figura 1.3 – Esquema ilustrativo dos vários factores que podem influenciar a qualidade dos resultados obtidos.

1.2.2 Certificação e acreditação

A certificação e a acreditação de Sistemas de Gestão são actividades que se diferenciam quer quanto aos objectivos quer aos respectivos referenciais.

A certificação é o processo através do qual uma entidade certificadora concede uma garantia escrita, isto é, o certificado, de que um produto, processo ou serviço está conforme com as respectivas exigências específicas. Estas precisam de ser renovadas periodicamente ou serão válidas por um período específico de tempo.

A série ISO 9000 é um conjunto de normas que formam um modelo de gestão de qualidade para organizações que podem, se desejarem, certificar os seus sistemas de gestão através de organismos de certificação. Ela foi elaborada através de um consenso internacional sobre as boas práticas da qualidade e com a finalidade de garantir o fornecimento de produtos ou serviços que satisfaçam os requisitos dos clientes, bem como a prevenção de problemas e a ênfase na melhoria contínua. Embora a padronização tenha surgido nas indústrias e com principal atenção para o fabrico, hoje em dia a Norma vem sendo implementada por outros tipos de organizações de áreas distintas. Contudo cada área possui uma ISO com certas especificações para determinado trabalho, como é o exemplo dos laboratórios, indústria alimentar, entre outros^[1].

Contudo, a certificação apenas pela ISO 9000 não demonstra a competência do laboratório para produzir resultados válidos, em oposição à acreditação pela ISO 17025 que assegura a precisão, exactidão e fiabilidade dos resultados. A ISO 17025 é a Norma equivalente à ISO 9000

mas, é específica para a certificação de laboratórios de ensaios e/ou calibração, enquanto a ISO 9000 é para empresas em geral, a ISO 9001 é para Sistemas de Gestão da Qualidade e a ISO 9002 é para o modelo de garantia da qualidade em produção, instalação e serviços associados^[4].

A acreditação é o reconhecimento formal, por parte de um organismo de acreditação de que um laboratório ou organismo de certificação ou organismo de inspecção, cumpre os requisitos previamente definidos e demonstra ser competente para realizar as suas actividades com confiança.

É o procedimento através do qual o organismo de acreditação reconhece formalmente que uma entidade é tecnicamente competente para efectuar uma determinada função específica, de acordo com Normas internacionais, europeias ou nacionais em vigor, baseando-se complementarmente, nas orientações emitidas pelos organismos internacionais de acreditação de que Portugal faça parte.

Com o objectivo de verificar se o laboratório continua a atender aos requisitos da acreditação, são realizadas reavaliações periódicas sendo que a primeira deve ocorrer até 12 meses a contar com a data da acreditação e as demais até 24 meses, contados a partir da última reavaliação.

A acreditação é comprovada através de um certificado de acreditação onde é descrito em pormenor o âmbito da acreditação (que pode não abranger todas as actividades que a entidade exerce). O certificado tem a validade de três anos, apesar de os laboratórios serem auditados anualmente.

O processo de acreditação de um laboratório é constituído por vários passos, contudo pode ser resumido apenas a três tópicos, que são a análise da solicitação, a avaliação e a decisão, tal como se verifica na figura (1.4).

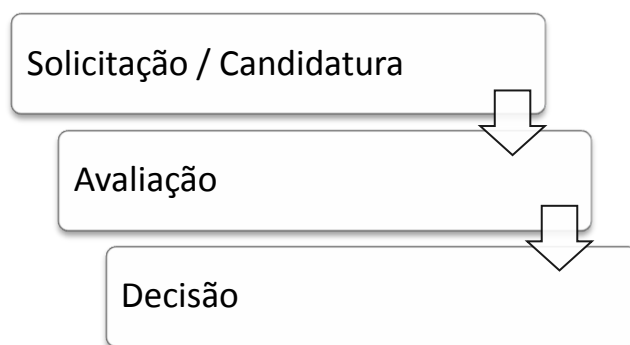


Figura 1.4 – Ilustração dos passos a realizar para a obtenção do título de acreditação.

A análise da solicitação começa com a abertura de um processo de candidatura junto do Organismo Nacional de Acreditação. Quando este reconhece que o processo de candidatura está completo, atribui um gestor para acompanhar o processo, assim como um número que irá identificar o processo. De seguida, dá-se a avaliação onde é feita uma análise da documentação, uma visita prévia e, finalmente é agendada e efectuada uma auditoria que resulta num relatório onde ficam registados algumas opiniões, oportunidades de melhoria e não-conformidades com a norma. Perante o relatório da auditoria, o laboratório poderá ter de desencadear um plano de acções correctivas como resposta às eventuais observações negativas registadas no relatório. No final, o organismo avaliador examina o plano de acções correctivas e, se a avaliação for positiva, emite um certificado de acreditação que é formalmente entregue ao laboratório. Concluído todo o processo, o laboratório adquire o estatuto de acreditado, podendo usar a marca da acreditação nos seus boletins de análise e certificados de calibração, desde que estes contenham pelo menos um parâmetro obtido no âmbito da acreditação^[5].

O facto de o laboratório ter sido dado como acreditado não significa que se trate de uma situação permanente, mas sim o oposto, pois exige que o laboratório se esforce para manter o seu estado. A partir do momento que o laboratório é reconhecido com a marca da acreditação passam a ser obrigados a cumprir as premissas publicadas pela norma, assim como também fica sujeito a várias auditorias de acompanhamento e renovação que são marcadas e cumpridas.

Capítulo **2**

Fundamentação

Neste capítulo são abordados alguns conceitos relativos à importância em avaliar a qualidade da água, bem como algumas das suas características e factores de poluição. Encontra-se também uma breve explicação sobre o fósforo, a sua análise e o método analítico utilizado, para além das bases estatísticas e das técnicas de validação de métodos analíticos utilizadas no desenvolvimento deste trabalho, para a sua futura aplicação ao fósforo total.

2.1 Água

A água é essencial à vida e como tal é um recurso precioso que a Terra fornece à Humanidade. Contudo, a quase totalidade da água existente encontra-se nos oceanos e apenas uma fracção muito pequena (cerca de 1%) de toda a água terrestre está directamente disponível ao Homem e aos outros organismos, sob a forma de lagos e rios, como humidade presente no solo, na atmosfera e como componente dos mais diversos organismos. Alguma negligência e falta de planeamento em relação a este recurso, tem posto em causa a abundância e qualidade da água^[6]. É por isso importante administrar de forma adequada e expedita os recursos hídricos terrestres, manter os seus reservatórios naturais e salvaguardar a sua pureza para não comprometer ainda mais o Homem e outras espécies.

Além do papel estruturante que a água tem no organismo humano (75-80% em massa), também intervém em numerosos metabolismos como por exemplo digestão, depuração renal, evolução celular e assegura o bom equilíbrio iónico. Por tudo isto, é recomendado a cada indivíduo a ingestão diária de cerca de dois litros de água.

A água possui a característica de solvente universal, pois em contacto com outras moléculas polares consegue envolvê-las e separá-las, o que também é possível com sais, gases, proteínas, entre outras. As substâncias hidrofílicas são solúveis na água, possuindo afinidade com a mesma. Isto ocorre porque as moléculas hidrofílicas são polarizadas e tal como a água é uma molécula dipolar capaz de se ligar tanto a moléculas de carga positiva como de carga negativa. As substâncias hidrofóbicas são insolúveis na água, possuindo aversão à mesma. Estas não são moléculas polarizadas e por isso não existe atracção nem interacção entre elas e a água^[6].

Muitos compostos dissolvidos na água são vitais à vida. Alguns dos sais e nutrientes possíveis de encontrar são o cálcio, ferro, sódio, potássio, cloretos, azoto, fósforo, magnésio, entre outros^[7]. O cálcio é fundamental na constituição dos ossos e dentes, actuando também

nos mecanismos de coagulação do sangue e de contracção dos músculos. Os sais de ferro fazem parte da constituição da hemoglobina e dos glóbulos vermelhos do sangue, permitindo e facilitando a transporte dos gases pelo organismo. O sódio, potássio e cloretos são responsáveis pela regulação osmótica das células, contudo apenas os iões de potássio e sódio são responsáveis pela transmissão de impulsos nervosos dos neurónios. O azoto é essencial ao desenvolvimento de algas e pode ser encontrado na forma molecular, orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato; o excesso de azoto amoniacal em águas provoca a morte dos seres aquáticos e posterior oxidação em nitritos e depois em nitratos, levando ao consumo do oxigénio e afectando de modo significativo a vida aquática. O fósforo, tal como o azoto, é um nutriente essencial ao crescimento dos microrganismos responsáveis pela biodegradação da matéria orgânica e também do crescimento de algas. Os sais de magnésio são essenciais na captação de energia solar e na participação do processo de equilíbrio hídrico.

A água também possui pequenas quantidades de gases dissolvidos, como o oxigénio, dióxido de carbono, entre outros. O oxigénio é vital para os organismos aeróbios presentes na água e a sua presença deve-se às interacções com a atmosfera e como produto final do processo de fotossíntese; contudo a sua concentração diminui com o aumento da decomposição da matéria orgânica. O dióxido de carbono encontra-se presente na água como resultado do metabolismo dos organismos^[7].

2.1.1 Poluição da água

A contaminação com poluentes inviabiliza a sua utilização por parte do Homem, quer na sua utilização pessoal (alimentação e meio de higiene e limpeza) quer à escala industrial, como solvente ou em meios de cultura (campos e piscicultura).

A maior fonte de contaminação da água está, regra geral, relacionada com descargas provenientes de instalações industriais, de águas residuais de origem urbana, da aplicação de pesticidas e fertilizantes na agricultura e de uma forma ocasional devido a derrames ou acidentes de transporte.

Por tudo isto o controlo da qualidade das águas para consumo humano e águas residuais (destinadas a rega ou outros afins) tornou-se num instrumento imprescindível no intuito de assegurar que a água utilizada apresenta os padrões de qualidade mínimos de acordo com os fins a que se destina^[6].

A existência de inúmeros contaminantes na água, leva a um controlo cada vez mais apertado, quer por parte dos laboratórios de análise, quer por parte da legislação referente a esta matéria. Deste modo, são estabelecidos limites máximos legais permitidos para um determinado contaminante presente na água, no sentido de uma maior e melhor preservação dos recursos hidrológicos existentes, e conseqüentemente a protecção do meio que deles dependem.

2.2 Fósforo

O fósforo é um dos elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento de plantas e animais. Este encontra-se presente em águas naturais e residuais maioritariamente sob a forma de fosfatos. Estes são classificados como ortofosfatos, que são representados pelo ião fosfato (PO_4^{3-}), ião hidrogeno-fosfato (HPO_4^{2-}) e ião dihidrogeno-fosfato (H_2PO_4^-), que podem-se combinar com catiões e originar sais inorgânicos. Os polifosfatos ou fosfatos condensados, figura (2.1), que são polímeros de ortofosfatos e que facilmente se hidrolisam e se convertem em ortofosfatos e ainda os fosfatos orgânicos, para os casos em que o fósforo faz parte da constituição de moléculas orgânicas.

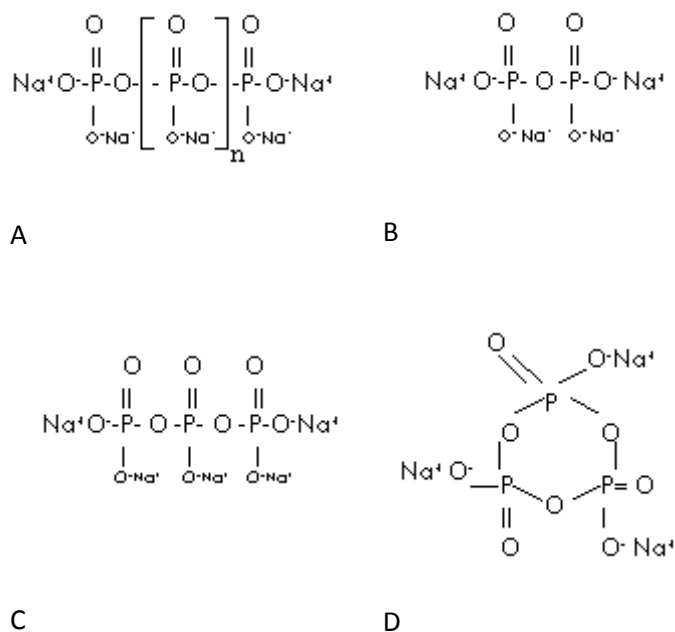


Figura 2.1 – Representação de algumas estruturas químicas: A) polifosfato de sódio, B) pirofosfato de sódio, C) tripolifosfato de sódio e D) trimetafosfato de sódio.

Estas formas de fosfatos provêm de diversas origens, tais como a sua adição durante o tratamento das águas, devido à lavagem ou outro processo equivalente (detergentes comerciais), pelo uso de pesticidas orgânicos e também no recurso aos processos de tratamento biológicos^[8].

No ambiente os fosfatos estimulam o crescimento de plâncton e plantas aquáticas, que servem de alimento aos peixes. Contudo, um excesso de fosfato poderá originar um crescimento descontrolado de algas e plantas aquáticas, desencadeando um processo designado de eutrofização, que pode resultar na morte de vida aquática pela redução drástica dos níveis de oxigénio dissolvido^[8].

Os fosfatos não são tóxicos para as pessoas e animais, contudo se existirem em elevadas concentrações nos organismos, podem desencadear problemas digestivos.

Segundo o Decreto-Lei número 236/98, de 1 de Agosto, que é relativo às normas, critérios e objectivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus usos, é possível consultar os valores máximos admissíveis (VMA) e os valores máximos recomendáveis (VMR).

O Anexo XX, do referido Decreto-Lei, referente aos objectivos ambientais de qualidade mínima para as águas superficiais, apenas refere como VMA a quantidade de 1 mg/L de fósforo, não apresentado nenhum valor quanto ao VMR^[9].

Após uma breve explicação sobre o fósforo na água, nesta secção será ainda apresentado uma explicação sucinta de diversos métodos para a sua determinação.

2.2.1 Análise do fósforo total

Para a determinação de fósforo total, é necessário proceder à degradação da matéria orgânica, seguida da libertação de fósforo em forma de ortofosfatos. Assim, pode-se recorrer a um dos três métodos de digestão distintos: ácido perclórico, ácido sulfúrico e nítrico e oxidação com persulfato.

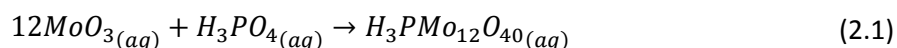
A digestão com ácido perclórico é bastante morosa e drástica, sendo mais apropriada para amostras de sedimentos. A digestão ácida com ácido sulfúrico e nítrico é o método mais usado e aplicado em diversos tipos de amostras^[8]. Contudo a oxidação com persulfato mostrou-se

ser mais eficaz por ser o método de digestão mais indicado para o tipo de amostras que este laboratório processa.

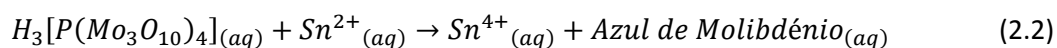
A chamada análise colorimétrica é uma das técnicas usadas quando é necessário quantificar substâncias em misturas complexas, ou que não absorvem significativamente a luz a nenhum comprimento de onda. Deste modo o composto a quantificar é posto em contacto com um reagente específico, de modo a desenvolver uma cor cuja intensidade é directamente proporcional à concentração da mistura na amostra original.

Para a colorimetria também se pode recorrer a três métodos para esta determinação, sendo que a escolha irá depender do intervalo de concentrações de ortofosfatos. Para tal tinha-se três hipóteses: ácido vanadomolibdofosfórico, cloreto de estanho (II) e ácido ascórbico. Neste trabalho em concreto recorreu-se ao uso de cloreto de estanho (II) pois é o mais adequado à gama de trabalho pretendida (0,01 a 6 mg P/L), sendo também mais sensível que o uso de ácido vanadomolibdofosfórico (1 a 20 mg P/L)^[8].

Como forma de resumo, neste método os iões ortofosfato, presentes na amostra digerida, vão reagir com o molibdato de amónio de modo a formarem o ácido molibdofosfórico, equação (2.1).



Em seguida através da adição do cloreto de estanho (II), ocorre a redução do ácido molibdofosfórico, levando à formação de um complexo de geometria octaédrica designado de azul de fosfomolibdénio, de estado de oxidação (V), equação (2.2).



Apesar de este complexo ter uma estrutura ainda mal conhecida, é ele que desenvolve a coloração azul; absorve na região do visível nas soluções a analisar, sendo que essa mesma coloração azul é proporcional à quantidade de fosfatos existentes (quanto maior a quantidade de fosfatos, mais intensa será o azul apresentado pela solução).

2.3 Método de análise

Como já foi referido na Introdução, este trabalho desenvolveu-se em torno da determinação de fósforo total; portanto, nesta secção serão apresentados os princípios básicos e a fundamentação do método analítico usado.

2.3.1 Espectrofotometria de Absorção Molecular no UV-visível

É uma técnica analítica que há mais de 50 anos tem sido aplicada para a identificação e determinação quantitativa de muitas espécies moleculares, inorgânicas ou orgânicas, incluindo espécies provenientes de matrizes biológicas. Graças à sua versatilidade analítica, permite um grande número de aplicações, ao seu baixo custo e robustez do método instrumental, a espectrofotometria é uma das técnicas analíticas mais utilizadas nos laboratórios nos laboratórios de controlo químico da qualidade^[10-12].

Quando a radiação electromagnética monocromática passa através de um material transparente, uma parte dessa radiação pode ser absorvida e a outra parte transmitida, figura (2.2).

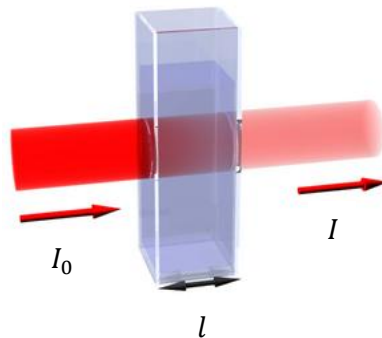


Figura 2.2 – Esquema representativo da absorção de um feixe de luz monocromática a atravessar a célula de percurso óptico l .

Como resultado da absorção de energia, os átomos ou as moléculas passam de um estado de baixa energia – estado fundamental – para um estado de maior energia – estado excitado. A figura (2.3) mostra esse processo de excitação, que é quantizado. A radiação electromagnética que é absorvida tem a mesma energia que a diferença de energia entre o estado excitado e o fundamental^[10,12]. A parte de uma molécula responsável pela absorção de luz é chamada de cromóforo.

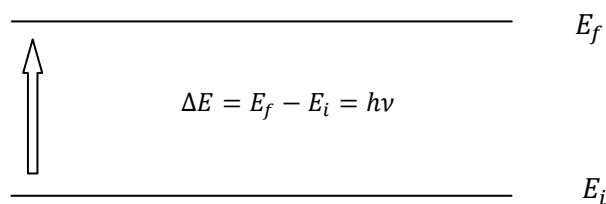


Figura 2.3 – Esquema ilustrativo do processo de excitação de um electrão através da radiação electromagnética.

A espectrofotometria de absorção molecular UV-Vísivel é fundamentada pela lei de Beer-Lambert, que é a base matemática para as medidas de absorção de radiação por amostras em estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro electromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se a equação (2.3),

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon lc \quad (2.3)$$

onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação transmitida pela amostra. A absorvidade molar (ϵ) é uma grandeza característica da espécie absorvente, cuja magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente. O termo c é a concentração da espécie absorvente e l é a distância percorrida pelo feixe através da amostra^[13].

2.3.2 Componentes do espectrofotómetro

Os requisitos essenciais para um espectrofotómetro estão representados na figura (2.4). A luz proveniente de uma fonte com emissão espectral contínua passa por um monocromador, que selecciona uma estreita faixa de comprimentos de onda do feixe incidente. A luz monocromática passa pela amostra de caminho óptico l , e a energia da luz transmitida é assim medida^[14].

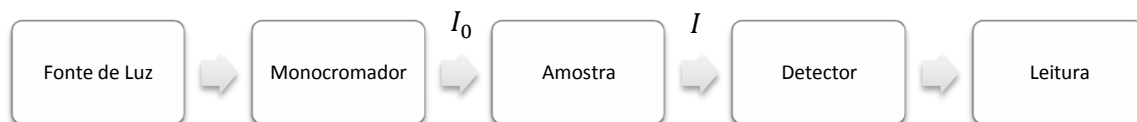


Figura 2.4 – Esquema representativo dos Componentes básicos de um espectrofotômetro de absorção molecular no UV-Visível, em que I_0 corresponde à intensidade do feixe de radiação electromagnética incidente na amostra e I a intensidade de radiação do feixe transmitido pela amostra.

As fontes de radiação mais comuns baseiam-se na incandescência e são muito usadas na região do infravermelho e no visível, contudo devem trabalhar a elevadas temperaturas na região do ultravioleta. Uma boa fonte de radiação deve preencher os seguintes requisitos: gerar radiação contínua, isto é, deve emitir todos os comprimentos de onda dentro da região espectral de trabalho; ter intensidade de potência radiante suficiente para permitir a sua detecção pelo sistema detector do equipamento e ser estável, para que a potência de radiação seja constante.

As fontes de radiação mais usadas são de tungsténio e de deutério. As lâmpadas de filamentos de tungsténio são uma fonte incandescente que emitem radiação contínua na faixa dos 350 a 2500 nm; o seu invólucro de vidro absorve toda a radiação abaixo dos 350 nm, limitando assim o seu uso par a gama do visível e infravermelho^[14], figura (2.5).

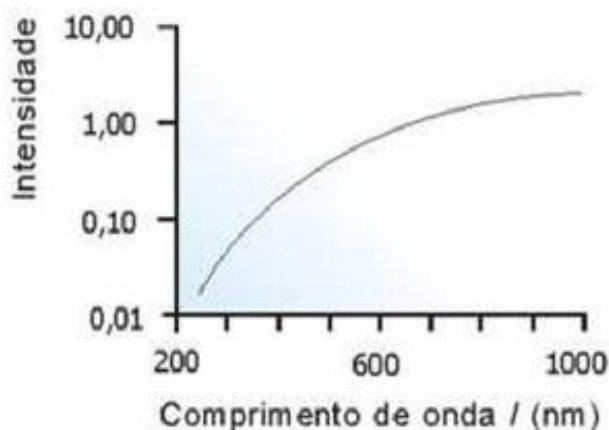


Figura 2.5 – Espectro de emissão de uma lâmpada de tungsténio.

As lâmpadas de deutério são mais utilizadas para a emissão de radiação na região ultravioleta, figura (2.6). Consistem num par de eléctrodos fechados num tubo de quartzo ou vidro, com uma janela em quartzo, cheio de deutério; ao ser aplicada elevada voltagem, dá-se

uma descarga de electrões que levam à excitação de outros electrões gasosos a grandes níveis de energia. Quando estes voltam ao seu estado fundamental, emitem radiação contínua de 180 a 350 nm^[14].

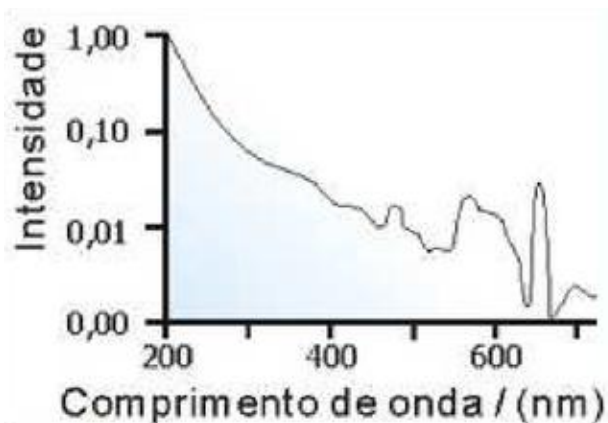


Figura 2.6 – Espectro de emissão de uma lâmpada de deutério.

Os monocromadores são dispositivos essenciais nos espectrofotómetros, tendo como função seleccionar o comprimento de onda específico para o analito em estudo. Este é formado por uma fenda de um elemento de dispersão de radiação e de uma fenda de saída da radiação. O elemento de dispersão de radiação pode ser um prisma ou uma rede de difracção. O monocromador prismático onde a radiação policromática procedente da fonte de radiação passa pela fenda de entrada e incide sobre a face de um prisma, sofrendo um desvio. Os prismas de quartzo são específicos para a região ultravioleta, embora tenham mais dispersão que o vidro. Na região do visível recorre-se aos prismas de vidro. Os prismas de quartzo apresentam a desvantagem de serem altamente refringentes e opticamente activos. Quanto ao monocromador reticular, o seu principal elemento de dispersão é a rede de difracção, que consiste numa placa transparente de inúmeras ranhuras paralelas e de igual distância. As redes de difracção dispersam a radiação policromática baseada no fenómeno da interferência, e a dispersão resultante desta rede é linear. As redes de difracção possuem uma melhor resolução que os prismas e podem ser utilizadas em todas as regiões do espectro^[12].

A amostra para ser analisada no espectrofotómetro é colocada numa célula rectangular de vidro ou quartzo. As células de vidro são usadas quando se trabalha na região visível do espectro. Para o caso da região ultravioleta, deve-se recorrer ao uso de células de quartzo, que

são transparentes à radiação ultravioleta, uma vez o que vidro absorve esta mesma radiação. A célula ideal deve ser de 1 cm, de modo a simplificar os cálculos da expressão da Lei de Beer-Lambert^[13].

Os espectrofotômetros variam na sua complexidade e desempenho. Existem modelos simples e mais sofisticados, equipamentos com programas especiais de acordo com a necessidade de cada laboratório ou empresa.

2.4 Estatística

Pode-se dizer que a estatística é a ciência da ilação e previsão – recorre à amostragem e a teorias probabilísticas para explicar e prever a frequência da ocorrência de eventos ou fenómenos com um certo grau de aleatoriedade associada.

A estatística fornece um conjunto de ferramentas para o controle da qualidade, essenciais para uma abordagem analítica completa. Estas ferramentas servem para, com critérios estatísticos, auxiliar a tomar decisões na interpretação dos resultados, podendo facilitar o planeamento de um dado processo/produto/serviço, tornando-se eficazes como instrumentos de suporte à tomada de decisões por parte de todos os elementos envolvidos no processo, uma vez que permitem antecipar falhas, de modo a planear o processo e promover a diminuição dos custos associados à reavaliação de trabalho, erros cometidos e atrasos^[1,15-17].

Os testes estatísticos servem para, com critérios estatísticos, auxiliar a tomar decisões na interpretação dos resultados. Qualquer teste estatístico depende do nível de confiança ao qual se pretende tirar conclusões e do número de graus de liberdade dessa situação.

Em torno deste tema, existem duas temáticas importantes de explorar: o procedimento seguido para o estudo dos testes estatísticos e o confronto de valores.

Nesta secção será também apresentada uma explicação sucinta de cada tipo de ferramenta estatística usada no tratamento dos resultados experimentais.

2.4.1 Procedimento

Os testes estatísticos devem ser efectuados com base numa certa sequência lógica de procedimento: formulação do problema, escolha do teste, estabelecimento do nível de confiança, escolha das hipóteses de trabalho, simetria do teste, cálculo do teste, comparação com o valor crítico e conclusão final^[16].

A formulação do problema debruça-se sobre o que se pretende provar estatisticamente.

A escolha do teste é feita com base no que se pretende verificar, sendo a sua eleição efectuada segundo a distribuição estatística que melhor se adequa ao teste escolhido.

O estabelecimento do nível de significância é imprescindível para que se possa tirar as devidas conclusões. É inicialmente estipulado um certo nível de significância ($100 \times \alpha$) para a conclusão estatística a tomar, o que corresponde a um determinado nível de confiança $100 \times (1 - \alpha)$ para que a decisão tomada esteja correcta. Normalmente, o nível de significância refere-se a $\alpha = 0,05$ podendo também ser baixado para $\alpha = 0,01$ para serem tiradas as conclusões finais, contudo, quando os testes implicam decisões críticas (como por exemplo escolher o melhor modelo de calibração ou retirar pontos da curva de calibração) o nível de significância de referência é o valor $\alpha = 0,01$ ^[16].

As hipóteses de trabalho servem para explicar o caso em estudo, não devendo por isso ser sobreponíveis e devendo abranger todo o cenário possível: a hipótese nula, H_0 , deve ser formulada no sentido de não haver diferença, isto é, no sentido da igualdade, enquanto que a hipótese alternativa, H_1 , incide sobre a diferença significativa, ou seja, da desigualdade e é estabelecida de forma a abranger o universo complementar da hipótese nula.

A simetria do teste depende apenas das hipóteses formuladas anteriormente; se o que se pretende é um teste de desigualdades apenas se está interessado em comparar a sobreposição unilateral das caudas (valores extremos) das duas distribuições, usando-se para tal um teste unilateral; caso o que se pretende seja um teste de igualdade está-se interessado em comparar a sobreposição central das distribuições (valores interiores, intervalo de confiança), usando-se para tal um teste bilateral^[18].

O cálculo do teste, TV (valor de teste) é calculado com base na expressão da distribuição estatística subjacente, baseando-se principalmente nas distribuições t -student e F de Fisher.

Os valores críticos estão tabelados de acordo com o nível de significância e com o número de graus de liberdade, sendo estes responsáveis por definir as regiões de aceitação e de

rejeição das hipóteses anteriormente formuladas. Sempre que seja possível, deve-se estimar o respectivo valor de prova, p_{H_0} , com o objectivo de confirmar a conclusão anteriormente assumida, uma vez que estima a probabilidade para a ocorrência da hipótese nula.

No caso do valor de prova ser igual ou superior a 0,05 a hipótese nula é aceite. Contrariamente, se este for inferior a 0,01 a hipótese nula tem de ser rejeitada em detrimento da hipótese alternativa. Para valores intermédios (na gama 0,01 a 0,05) há dúvida estatística quanto à decisão a tomar. Se se assumir o valor intermédio (0,03) como critério de desempate então, valores entre 0,03 e 0,05 são favoráveis à aceitação da hipótese nula sob restrições; valores entre 0,01 e 0,03 são dúbios mas favoráveis à rejeição da hipótese nula sob restrição^[16].

2.4.2 Confronto de valores

Tal como foi referido no procedimento anterior para o tratamento dos testes estatísticos, surgir a necessidade de formular hipóteses ou teorias, requerendo posterior confirmação experimental.

Ao proceder a testes de significância o analista está a testar a veracidade de uma hipótese que é conhecida como a hipótese nula. A hipótese nula deve ser sempre formulada no sentido da igualdade, isto é, não haver uma diferença significativa a um certo nível de confiança. Neste caso, considera-se que os valores são estatisticamente iguais^[15].

O nível de confiança dá a probabilidade da aceitação da hipótese nula. Se a hipótese nula for rejeitada, então assume-se que a hipótese alternativa é a verdadeira, para um determinado nível de confiança, ou seja, é importante apreciar que a hipótese alternativa só é válida para aquele nível de confiança^[15].

Outro aspecto importante é o uso do teste indicado, ou seja, na maioria das situações, o analista não tem nenhuma ideia, antes da experiência se existe diferença significativa entre as duas estimativas a comparar. Assim, o teste utilizado tem que abranger ambas as possibilidades. Tal teste é chamado de teste bilateral (ou de duas caudas) e pode ser representado pelo gráfico da figura (2.7).

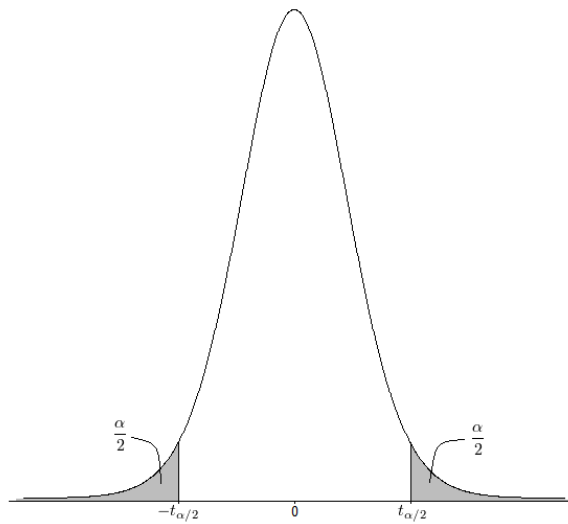


Figura 2.7 – Representação gráfica de um teste bilateral.

em que $-t_{\alpha/2}$ e $t_{\alpha/2}$ representam os valores críticos em causa.

Em alguns casos, porém, um tipo diferente de teste pode ser o apropriado. Este tipo de teste é chamado de teste unilateral (ou de uma cauda), o qual é representado pelo gráfico da figura (2.8).

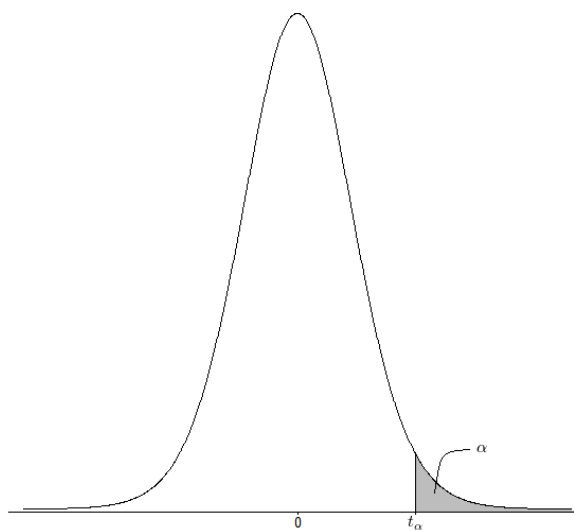


Figura 2.8 – Representação gráfica de um teste unilateral.

em que t_{α} representa o valor crítico determinado ou tabelado.

Sendo a área definida abaixo da curva da distribuição indicadora da respectiva probabilidade, pode-se concluir que, para um determinado nível de confiança, o valor crítico do teste bilateral difere do valor do teste unilateral.

2.4.3 Estimativas populacionais

Quando há a necessidade de quantificar uma determinada propriedade de uma distribuição recorre-se a determinadas estimativas populacionais. Através destas, as distribuições podem ser caracterizadas e deste modo reter a informação essencial característica. Estas permitem ainda a fácil comparação entre diferentes populações o que se torna bastante vantajoso na análise de resultados do acontecimento em causa^[19]. Deste modo, nesta secção será apresentada uma breve explicação sobre algumas estimativas, tais como a média, o desvio padrão e a análise de valores discrepantes¹.

2.4.4 Quantificação

Para que a validação de um método analítico seja devidamente descrito e estatisticamente suportado, é necessário proceder à aplicação de alguns testes estatísticos, como o teste de Fisher, teste de Mandel, teste F e teste t -student. A sua descrição será realizada pormenorizadamente no capítulo 3 (secção 3.2).

2.4.5 Análise de variabilidade

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. Trata-se de uma ferramenta estatística de relevo uma vez que oferece a possibilidade de discernir, dentro da variabilidade total de diferentes conjuntos de valores experimentais, as contribuições puramente aleatória e contribuição sistemática, entre amostras; deste modo permite verificar se as amostras (ou factores) exercem um efeito significativo fazendo com que se sobreponham à componente aleatória contribuindo para diferenças significativas entre si^[19-22].

¹ São resultados estatisticamente diferentes dos restantes ou do que seria esperado. A esses resultados atribui-se o nome de valor discrepante (outlier).

Esta ferramenta estatística permite comparar em simultâneo várias médias (níveis diferentes do factor) e estimar as diversas contribuições de variabilidade: puramente aleatória (estimada dentro de cada amostra), variabilidade entre amostras, etc.

2.4.6 Cartas de controlo

Uma forma de controlar o grau de variabilidade de uma dada variável consiste na construção de um gráfico que possui linhas que delimitam determinado tipo de controlo, designadas de cartas de controlo. A linha central representa o valor de referência ou pretendido; as linhas de aviso e de controlo alertam para a eventualidade do fenómeno em estudo poder apresentar um desvio significativo em relação ao valor de referência^[23,24].

O estabelecimento de uma carta de controlo assume que um determinado processo se encontra em controlo estatístico e é caracterizado por possuir uma determinada posição (estimativa central) e dispersão características e que na presença de determinado factor pode ser observado um desvio sistemático (erro na posição ou alteração da dispersão) de modo a já não ser coerente com as estimativas originais^[23].

Assim sendo, as cartas de controlo permitem evidenciar prontamente as situações de “fora-de-controlo”, evitar falsos alarmes (situações acidentais que não representam uma efectiva alteração do processo), e ainda evidenciar a necessidade de uma reavaliação do processo.

As cartas de controlo mais utilizadas são a X-chart (posições de médias) e R-chart (carta de amplitudes). A primeira permite diagnosticar desvios sistemáticos enquanto que a outra é mais adequada para o controlo da imprecisão do processo.

2.4.7 Comparação

Este conjunto de testes estatísticos permite estabelecer comparação entre valores típicos de distribuições. O teste *t*-student e o teste *t*-emparelhado são dois exemplos de testes estatísticos que permitem estabelecer tal comparação. Os testes podem ser conduzidos sobre a estimativa central (posição), estimativa da dispersão ou frequência (forma da distribuição). A comparação directa de valores centrais deve estar relacionada com as respectivas estimativas

de imprecisão no sentido de verificar se estas diferenças são estatisticamente similares ou superiores.

2.5 Validação de um método analítico

Um dos principais requisitos em qualquer processo que envolva análises químicas é a obtenção de dados de qualidade que alcancem os objectivos propostos. Nesse sentido, a validação de métodos analíticos tem como objectivo demonstrar, através de estudos laboratoriais, que o método é adequado aos requisitos exigidos pela aplicação analítica pretendida, isto é, o processo de validação pretende demonstrar que o método é adequado para a quantificação do analito na matriz, a um certo nível de concentração, com exactidão e precisão satisfatórias.

A validação de um método analítico confere uma garantia de qualidade operacional e de desempenho analítico. Através deste processo procura-se demonstrar que o método analítico em causa é adequado para a análise da amostra a que vai ser sujeito. Este processo é moroso mas vital para dar credibilidade ao método analítico desenvolvido^[24-26].

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações alterar de forma significativa o valor do resultado final. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objectivos, para demonstrarem através do processo de validação que os métodos internos de ensaio que executam conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida.

A validação é importante, não só para os laboratórios ou instituições como para os clientes destes, na medida em que é fundamental saber seleccionar o método que melhor se adapta a cada análise e assegure a validade dos resultados^[26].

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreende o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros:

- Identificação do analito;
- Especificidade / Selectividade;
- Gama de trabalho;
- Linearidade;

- Sensibilidade;
- Limiares analíticos: detecção e quantificação;
- Precisão;
- Exactidão;
- Robustez;
- Coerência.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por avaliação directa e por avaliação indirecta, e deverá pelo menos abranger as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo conhecido.

2.5.1 Identificação do analito

Após a escolha do melhor método para a determinação e detecção do analito em estudo, existe a necessidade de garantir que o sinal instrumental fornecido pelo equipamento corresponde realmente ao analito em questão. Normalmente, as condições de análise são referidos na literatura, contudo há sempre a necessidade de as verificar experimentalmente, devido, por exemplo, à possibilidade de interferências de matriz.

2.5.2 Especificidade e selectividade

Diz-se que um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito^[26]. Assim, será necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa.

A selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes^[25]. Esta característica é essencialmente função do princípio de medida utilizado, mas depende no entanto do tipo de compostos a analisar.

Para tal, para analisar as interferências poder-se-á realizar um teste de recuperação utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho.

2.5.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações onde o analito pode ser determinado com precisão, exactidão e linearidade através desse método analítico^[25]. Para os métodos que apresentam boa linearidade, é suficiente construir uma curva de calibração, usando-se cinco padrões, incluindo o branco. Para os casos em que a linearidade não é tão acentuada, recorre-se a um maior número de padrões.

Quando se utiliza uma metodologia que envolve a realização de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias. Para tal, recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 para modelos lineares^[27] e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau^[28].

2.5.4 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados directamente proporcionais à concentração da substância em estudo, dentro de uma determinada faixa de aplicação. Embora somente dois pontos definam uma recta, na prática as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados.

2.5.5 Sensibilidade

A sensibilidade é a medição da capacidade de um método (ou aparelho) distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Em métodos que envolvam uma curva de calibração, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração numa determinada zona de concentração^[25], tal como é indicado na seguinte equação (2.4):

$$E = \frac{dy}{dx} \quad (2.4)$$

Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa recta de calibração.

O estudo da sensibilidade tem interesse pelo seu aspecto relativo, isto é, quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo, compara-se a sensibilidade de vários métodos analíticos, baseados em modelos lineares ou comparar a sensibilidade para vários analitos.

O conceito de sensibilidade encontra-se associado à capacidade de resposta do analito e não deve ser confundido com o limite de detecção, que corresponde à menor concentração do analito que pode ser detectada.

2.5.6 Limiares analíticos

Quando são realizadas análises em amostras com baixos teores de analito, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado e quantificado pelo método.

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de detecção e quantificação do método analítico a esse nível de concentração. Estes são estimados com base na incerteza da quantificação do analito e podem ser obtidos através de: réplicas do branco, incerteza dos parâmetros da curva de calibração e incerteza na dispersão dos valores em torno da curva de calibração.

Sempre que possível deve-se estimar os limites inferiores com base nas leituras de réplicas de branco de padrão. No caso de não se dispor de brancos de padrão ou algum destes limites conduzir a uma concentração sem significado físico deve-se utilizar os parâmetros da recta de calibração. Só em último caso deve ser utilizado o desvio padrão do ajuste para este propósito^[25,26].

2.5.6.1 Limite de detecção

Em termos qualitativos o limite de detecção corresponde ao início da gama em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística, o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal, indicar se o analito em questão está ausente ou presente na amostra^[25]. Ou seja, o limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser estatisticamente detectada mas não quantificada, uma vez que a quantificação a este nível está sujeita a erros significativos. Uma leitura inferior ao limite de detecção não significa, obviamente, a completa ausência do analito a analisar.

2.5.6.2 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor concentração de analito que pode ser estatisticamente determinada com adequada precisão e exactidão, em determinadas condições operacionais^[25]. Na prática, quando a curva de calibração já se encontra bem definida ou verificada, corresponde normalmente, ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exactidão e precisão conseguida é satisfatória. Este teste pode ser realizado através da determinação, em condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar da quantificação.

2.5.7 Precisão

A precisão é uma medida do grau de proximidade dos valores obtidos pelo método analítico, na repetição da análise sobre a mesma amostra. Já a imprecisão de uma medida está relacionada com a dispersão dos valores obtidos e pode ser quantificada através de estimativas paramétricas como o desvio padrão e o coeficiente de variação.

Existem duas medidas extremas para avaliar essa dispersão: repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou variabilidade laboratorial.

A repetibilidade (precisão entre ensaios) refere-se à dispersão dos resultados do método, operando num curto intervalo de tempo e nas mesmas condições (mesma amostra, analista, equipamento, método, laboratório, etc.)^[25]. Pode ser estimada a partir de ensaios efectuados

no próprio laboratório. O limite de repetibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, realizados nas mesmas condições.

A reprodutibilidade está relacionada com a dispersão de resultados de um método obtida com estudos interlaboratoriais, reflectindo erros aleatórios de quantificação. Ela permite avaliar a concordância dos resultados entre ensaios dependentes e/ou independentes sobre a mesma amostra e/ou padrão em condições operacionais bem definidas^[25].

2.5.8 Exactidão

A exactidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados num determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro. É importante observar que um valor exacto ou verdadeiro é um valor obtido por uma medição perfeita, e este valor é indeterminado por natureza.

Para as aproximações quantitativas, a ICH (Conferência Internacional sobre a Harmonização) recomenda pelo menos nove determinações através da escala específica devem ser obtidas, por exemplo, três réplicas a três níveis da concentração para cada um. A recuperação da percentagem ou a diferença entre a média e o valor verdadeiro aceite junto com os intervalos de confiança são recomendadas.)

A exactidão pode ser avaliada através do erro absoluto, que corresponde à diferença entre o valor obtido e o valor correcto e através do erro relativo, que fornece apenas uma indicação percentual do desvio obtido. Uma boa exactidão nem sempre é sinónima de uma boa precisão, tal como se pode constatar pela figura (2.9).

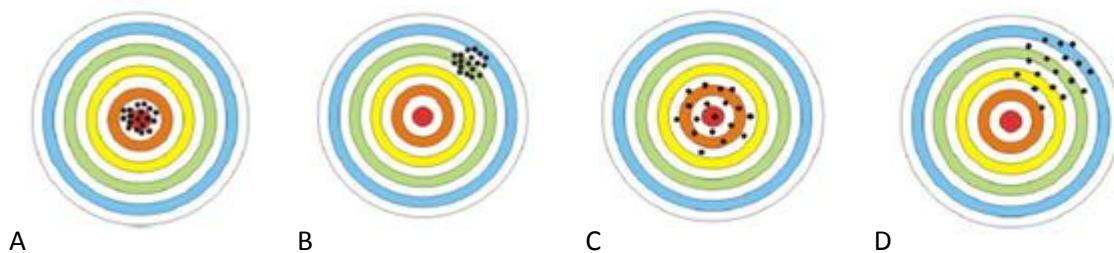


Figura 2.9 – Esquema representativo da relação entre a exactidão e a precisão: A) boa exactidão e boa precisão, B) má exactidão mas boa precisão, C) boa exactidão mas má precisão e D) má exactidão e má precisão.

Os processos mais utilizados para avaliar a exactidão de um método são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação, adição padrão e ensaios interlaboratoriais.

2.5.9 Robustez

A robustez é a capacidade do método para conduzir ao mesmo resultado apesar das alterações introduzidas deliberadamente^[26]. Essas alterações podem ser: variação da temperatura, humidade, pH, comprimento de onda, etc. Para tal pode-se recorrer ao teste de Youden, que permite não só avaliar a robustez de um método, como também verificar a influência de cada uma das variações nos resultados obtidos. Uma maior robustez de um método revela maior insensibilidade (dependência) de factores experimentais deliberadamente alterados, o que é vantajoso, pois o método continua a conduzir a valores concordantes apesar das alterações efectuadas. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse método quanto à sua precisão.

2.5.10 Coerência

A coerência é a capacidade de um método conduzir sempre ao mesmo resultado, ou seja, quando se usa o mesmo método sobre a mesma amostra, deve haver auto concordância de valores.

Capítulo **3**

Procedimientos

Neste capítulo será apresentado de uma forma sucinta o procedimento para a determinação de fósforo total em águas residuais. Foi com base neste procedimento experimental que se adquiriu os dados experimentais, com o auxílio do respectivo equipamento de medição e controlo de qualidade dos ensaios realizados. Os dados experimentais obtidos são posteriormente tratados com as ferramentas estatísticas descritas ao longo deste capítulo para a validação do método.

3.1 Determinação de fósforo total

De uma forma muito genérica, será apresentado a lista de reagentes e equipamentos necessários para a determinação de fósforo, bem como um breve resumo sobre os principais passos a seguir para a sua análise.

3.1.1 Reagentes

- Solução de ácido sulfúrico;
- Solução aquosa de indicador de fenolftaleína, 10%;
- Persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$);
- Solução de hidróxido de sódio, 5M;
- Reagente de molibdato de amónio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot H_2O]$;
- Reagente de cloreto de estanho (II) ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$);
- Solução comercial de fosfatos, 1000 mg/L.

3.1.2 Material

- Espectrofotómetro UV-Visível (UV-1800 Shimadzu);
- Autoclave (JSM-0932);
- Material de vidro de uso corrente em laboratório.

3.1.3 Descrição do procedimento experimental

Partindo de uma solução de 1000 mg/L em fosfato foi preparada uma solução intermédia de 100 mg/L de fosfato, equivalente a 32,6 mg/L P, por uma diluição de 1:10. A partir desta solução intermédia foram preparados sete padrões para a curva de calibração contendo 1 a 8 mg/L de fosfato, equivalente a 0,326 a 2,609 mg/L P, de acordo com a tabela A.2.1.

O controlo de qualidade de cada sessão de trabalho é preparado de modo semelhante, contudo não se pode recorrer à preparação da solução intermédia de 100 mg/L de fosfato a partir da mesma solução padrão comercial de 1000 mg/L em fosfato. Esta terá de ser de igual concentração mas de marca ou lote diferente da solução anteriormente usada no primeiro parágrafo. É apenas necessário proceder à preparação de dois padrões para o controlo de cada sessão de trabalho, de acordo com a tabela A.2.2.

Tanto os padrões da curva de calibração, os padrões para o controlo de qualidade como as amostras e branco de amostra são digeridos, através de uma oxidação com persulfato, em simultâneo no autoclave a 120°C durante 60 minutos.

Após todas as soluções arrefecerem, estas são neutralizadas e posteriormente transferidas para balões de diluição de 100 mL e perfeitos com água ultra-pura. Após a adição dos reagentes de coloração, responsáveis pelo desenvolvimento da cor azul das soluções, a sua análise terá de ser realizada num prazo de 10 a 15 minutos.

Após uma fase inicial de estabilização, foram realizadas as leituras de absorvância a 690 nm, numa célula de quartzo com percurso óptico de 1 cm.

Os detalhes do procedimento técnico deste método analítico encontram-se no anexo A.2.

3.2 Tratamento de resultados

Todos os resultados apresentados no capítulo 4 foram sujeitos a um tratamento estatístico adequado e específico para cada caso, deste modo, nesta secção é apresentada uma explicação sucinta de cada método estatístico usado.

3.2.1 Estimativa central e de dispersão

Existem duas estimativas populacionais indispensáveis na análise de resultados a média, \bar{x} , equação (3.1) e o desvio padrão, s , equação (3.2), em que x_j representa cada um n valores constantes na amostra^[19,20].

$$\bar{x} = \sum_j \frac{x_j}{n} \quad (3.1)$$

$$s = \sqrt{\sum_j \frac{(x_j - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.2)$$

Através do cálculo da media e do desvio padrão podemos perceber a variação dos valores em relação a sua media, ou seja, quanto maior o desvio padrão, mais dispersos se encontram os valores e portanto menos precisos são.

3.2.2 Análise de valores discrepantes populacionais

Por vezes, no decorrer de qualquer trabalho laboratorial, deparamo-nos com resultados que são significativamente diferentes dos restantes ou do que seria esperado. A esses resultados atribui-se o nome de valor discrepante (outlier)^[22]. Existem várias formas de avaliar a existência de outliers num conjunto de dados, contudo apenas se fará referência ao teste de Grubbs.

O teste de Grubbs, equação (3.3) pressupõe à priori que a distribuição em causa é normal e segundo este teste, um determinado valor pode ser considerado discrepante se a sua distância à estimativa central exceder um valor múltiplo do desvio padrão global. Como hipótese nula assume-se que o valor em causa ($x_?$) não difere significativamente da estimativa central.

$$G = \frac{|x_? - \bar{x}|}{s_x} \quad (3.3)$$

em que \bar{x} é a média e s_x o desvio padrão dos n valores experimentais (incluindo o valor em causa, $x_?$).

Este valor só é excluído se exceder o valor crítico tabelado referente a 95% de confiança e para n valores experimentais, tabela A1.1.

3.2.3 Análise da variabilidade

Quando está em causa a comparação de variâncias de distribuições normais aleatórias e independentes, que segue a distribuição de Fisher, recorre-se à equação (3.4) para calcular o valor teste de Fisher^[25].

$$TV = \frac{\sigma_1^2}{\sigma_2^2} \quad (3.4)$$

onde em numerador fica a variância maior (s_1^2) e em denominador a menor (s_2^2).

Como hipótese assume-se como hipótese nula que não há diferença significativa entre as variâncias, sendo esta uma diferença puramente aleatória, o que corresponde a efectuar um teste bilateral para o quociente de variâncias. A hipótese alternativa por sua vez assume que se houver diferença significativa, a variância do numerador excede a do denominador.

3.2.4 Escolha do modelo

No teste de escolha do melhor modelo que descreve a curva de calibração, ajusta-se um polinómio de primeiro grau ($P_1(x) = b_0 + b_1 \cdot x$) e um polinómio de segundo grau ($P_2(x) = b_0 + b_1 \cdot x + b_2 \cdot x^2$), estimar as respectivas somas de resíduos quadrados e comparar o aumento da variância do ajuste ao baixar o grau do polinómio^[19,20].

Este teste permite comparar o incremento da variância do ajuste ao excluir um parâmetro (coeficiente do termo de segundo grau) com uma estimativa de erro puramente aleatória que pode ser estimado com base na variância do modelo que melhor ajusta os valores experimentais (σ_{fit}^2), equação (3.5).

$$TV = \frac{\Delta SS / \Delta v}{\sigma_{pe}^2} = \frac{(SS_1 - SS_2) / (v_1 - v_2)}{\sigma_{fit}^2} \quad (3.5)$$

em que SS_1 representa a soma dos quadrados dos resíduos do polinómio de primeiro grau, SS_2 é a soma de quadrados dos resíduos do polinómio de segundo grau, v_1 e v_2 os respectivos graus de liberdade e σ_{fit}^2 a variância do ajuste.

Se o aumento na variância do ajuste à eliminação de um parâmetro for equiparável à variância aleatória, o parâmetro excluído não é necessário ao modelo, isto é, se o valor F calculado não exceder o valor crítico $F_{0,01(1,v_2)}^u$ a hipótese nula deve ser aceite, o que indica que o polinómio de primeiro grau é adequado à curva de calibração em estudo.

3.2.5 Verificação de valores discrepantes do modelo

Os eventuais valores discrepantes da curva de calibração podem ser testados através de um teste F (similar ao teste de Mandel), através da estimativa do intervalo de confiança dos valores previstos pelo modelo.

Este teste baseia-se na comparação do aumento da variabilidade residual ao incluir o valor suspeito da curva de calibração com uma estimativa de erro puramente aleatório^[19,20]. Compara-se o aumento na variância do ajuste ao introduzir o valor dúbio no conjunto dos pontos da curva de calibração ($\Delta\sigma_{fit}^2$) com uma estimativa puramente aleatória que resulta da variância do ajuste com $(n - 1)$ valores experimentais ($\sigma_{fit(n-p-1)}^2$), equação (3.6).

$$TV = \frac{(SS_{(n)} - SS_{(n-1)}) / ((n - p) - (n - p - 1))}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta\sigma_{fit}^2}{\sigma_{fit(n-p-1)}^2} \leq F_{\alpha(1,n-p-1)}^u \quad (3.6)$$

onde $SS_{(n)}$ e $SS_{(n-1)}$ correspondem à soma de quadrados dos resíduos com e sem o ponto dúbio, respectivamente, bem como os respectivos graus de liberdade, $(n - p)$ e $(n - p - 1)$, em que n representa o número de pontos e p o número de parâmetros do modelo.

Se este valor exceder o valor crítico isso indica que a hipótese nula (a hipótese nula indica que o valor em questão também pertence à curva de calibração ou seja, não afecta significativamente a qualidade do ajuste) tem uma probabilidade inferior a $100 \times \alpha\%$ de não ser válida sugerindo a rejeição deste valor como precaução estatística no sentido de não

cometer erros sistemáticos na calibração e de reduzir a incerteza na estimativa da concentração das amostras. Como a rejeição de pontos de uma curva de calibração é um procedimento “crítico” que vai afectar todas as estimativas subsequentes, deve-se recorrer a um nível de confiança de 99% ($\alpha = 0,01$).

3.2.6 Análise de variância

Tal como foi referido no ponto 2.4.3, a ferramenta estatística ANOVA é importante para distinguir as diversas contribuições sobre a variância total observada. Deste modo, será apresentado o modo de cálculo de cada contribuição e o modo de interpretação dos resultados obtidos.

3.2.6.1 Efeito de factor único

A componente puramente aleatória concerne apenas à dispersão dos valores experimentais enquanto que o efeito do factor faz-se sentir a partir da componente sistemática^[22]. Assim, a dispersão total (SS_T) pode ser decomposta em duas parcelas: a dispersão interna ou puramente aleatória (SS_o) e a dispersão consequente do efeito em causa (SS_A), tal como é demonstrado pela equação (3.7).

$$SS_T = SS_o + SS_A \quad (3.7)$$

O modo de obter cada uma destas quantidades encontra-se sumariado na tabela (3.1).

Tabela 3.1 – Construção da tabela de resultados da ANOVA de um factor.

Fonte de variação	SS	v	MQ
Entre níveis	$SS_A = \frac{S_x^2}{n} - \frac{(S_x)^2}{\sum_{i=1}^n m_i}$	$(n - 1)$	$s_A^2 = \frac{SS_A}{(n - 1)}$
Dentro dos níveis	$SS_0 = SS_T - SS_A$	$\sum_{i=1}^n m_i - n$	$s_0^2 = \frac{SS_0}{\sum_{i=1}^n m_i - n}$
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} x_{ij}^2 - \frac{(S_x)^2}{\sum_{i=1}^n m_i}$	$\sum_{i=1}^n m_i - 1$	$s_T^2 = \frac{SS_T}{\sum_{i=1}^n m_i - 1}$

em que S_x representa o somatório de todos os valores, S_x^2 o somatório dos valores elevados ao quadrado, m o número de réplicas, n o número de níveis do factor e x_{ij} o valor médio referente à réplica j do nível i do factor em estudo.

Se for efectuado um estudo da ANOVA sobre réplicas da mesma determinação realizada em dias diferentes, a dispersão interna traduz a repetibilidade enquanto que o factor em estudo permite estimar a precisão intermédia desse mesmo factor.

O valor de teste F é obtido pela equação (3.8) e é posteriormente comparado com o respectivo valor crítico da distribuição cumulativa de Fisher unilateral para um certo nível de confiança α , com $\nu_1 = (n - 1)$ e $\nu_2 = (n(m - 1))$ graus de liberdade.

$$TV = F = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(n-1;n(m-1))}^u \quad (3.8)$$

em que s_A^2 e s_0^2 correspondem à variância entre os diferentes níveis do factor A e à variância do erro puramente aleatório que existe dentro de todos os n níveis do factor e m ao número de réplicas.

Se o factor em estudo (factor A) não influi de modo significativo, ambas as dispersões são estimativas da variância da componente aleatória – hipótese nula. Quando o factor influi de modo significativo, a dispersão devida ao factor A (s_A) torna-se maior que a componente puramente aleatória (s_0) – hipótese alternativa.

No caso de o valor calculado na equação (3.8) exceder o valor crítico diz-se que, ao nível de confiança $100 \times (1 - \alpha)\%$, há uma diferença significativa entre níveis do factor em estudo

e a hipótese nula deve ser excluída em detrimento da hipótese alternativa: a dispersão originada pelo factor é estatisticamente superior à estimada para o erro aleatório².

3.2.6.2 Efeito de factor duplo

Com este tipo de tratamento pretende-se estudar o efeito simultâneo de dois factores sobre os resultados observados. Para este caso, a dispersão total (SS_T) pode ser decomposta em três contribuições distintas: uma que traduz a variabilidade puramente aleatória (SS_0) e duas que dão conta do efeito individual de cada factor (SS_A e SS_B)^[22], como é indicado na equação (3.9).

$$SS_T = SS_0 + SS_A + SS_B \quad (3.9)$$

O modo de obter cada uma destas *quantidades encontra-se* sumariado na tabela (3.2).

² Esta ferramenta estatística pode ser directamente obtida através de uma função disponível no Microsoft Excel. Para tal, recorre-se ao sector Dados escolhendo o item Análise de Dados; seleccionar de seguida a opção Anova e preencher os requisitos pedidos.

Tabela 3.2 – Construção da tabela de resultados da ANOVA de dois factores.

Fonte de variação	SS	v	MQ
Linhas	$SS_A = M \cdot \sum_i^N (\bar{x}_i - \bar{X})^2$	$(N - 1)$	$s_A^2 = \frac{SS_A}{(n - 1)}$
Colunas	$SS_B = N \cdot \sum_j^M (\bar{x}_j - \bar{X})^2$	$(M - 1)$	$s_B^2 = \frac{SS_B}{(M - 1)}$
Erro	$SS_0 = \sum_i^N \sum_j^M (x_{ij} - \bar{x}_i - \bar{x}_j + \bar{X})^2$	$(N - 1) \times (M - 1)$	$s_0^2 = \frac{SS_0}{(N - 1) \times (M - 1)}$
Total	$SS_T = \sum_i^N \sum_j^M (x_{ij} - \bar{X})^2$	$(N \cdot M - 1)$	$s_T^2 = \frac{SS_T}{(N \cdot M - 1)}$

em que \bar{x}_i corresponde à média de cada nível do factor A, \bar{x}_j a média de cada nível do factor B, x_{ij} o valor médio referente ao nível i do factor A e do nível j do factor B em estudo, \bar{X} a média global dos factores, N e M o número de níveis do factor A e B, respectivamente.

O valor de teste F é obtido pela equação (3.10) e é posteriormente comparado com o respectivo valor crítico da distribuição cumulativa de Fisher unilateral para um certo nível de confiança α , com $\nu_1 = (N - 1)$ e $\nu_2 = ((N - 1)(M - 1))$ graus de liberdade.

$$TV = F = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(N-1; (N-1)(M-1))}^u \quad (3.10)$$

em que s_A^2 e s_0^2 correspondem à variância entre os diferentes níveis do factor A e à variância do erro puramente aleatório que existe dentro de todos os n níveis do factor e m ao número de réplicas.

A Anova compara o efeito de cada factor (s_A e s_B) com a estimativa de erro puramente aleatória assumindo como hipótese nula o factor não influi significativamente e como hipótese alternativa o facto de o factor apresentar uma contribuição sistemática que supera a variabilidade aleatória.

No caso de o valor calculado na equação (3.9) não exceder o valor crítico diz-se que ao nível de confiança $100 \times (1 - \alpha)\%$, não há uma diferença significativa entre níveis do factor em estudo e a hipótes nula deve ser considerada válida: não há motivos para considerar que o factor altera a variabilidade dos resultados⁴.

3.2.7 Carta de controlo de posição

A X-chart pode representar indivíduos ($m = 1$) ou valores médios ($m > 1$). Em geral expressa a posição de cada valor médio diário \bar{x}_i em relação aos valores típicos do processo^[23].

A linha central é a (CL_x) estimativa do valor central do processo (μ), sendo obtida com base nos n dias diferentes, equação (3.11).

$$CL_x = \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \bar{x}_i}{n} \simeq \mu \quad (3.11)$$

onde \bar{x} corresponde à média dos valores experimentais e \bar{x}_i é dado pela equação (3.12):

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_j^m x_{ij}}{m} \quad (3.12)$$

em que x_{ij} é o valor medido e m o número de réplicas diárias.

Segundo uma perspectiva probabilística, as linhas de aviso (WL_x) expressam os limites ao nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) que englobam os valores médios diários (\bar{x}_i , m réplicas) do processo, tal como é expresso na equação (3.13).

$$WL_x = CL_x \pm t_{0,05(n-1)}^b \times \frac{\sigma_r}{\sqrt{m}} \quad (3.13)$$

em que CL_x representa a linha central, $t_{0,05(n-1)}^b$ estabelece o limite ao nível de confiança de 95% para $(n - 1)$ graus de liberdade para n dias diferentes, σ_r é a estimativa da repetibilidade e m o número de réplicas diárias.

Por outro lado, as linhas de acção (AL_x) definem os limites de confiança a 99% ($\alpha = 0,01$) que englobam os valores médios do processo, tal como é representado pela equação (3.14).

$$AL_x = CL_x \pm t_{0,01(n-1)}^b \times \frac{\sigma_r}{\sqrt{m}} \quad (3.14)$$

onde CL_x representa a linha central, $t_{0,01(n-1)}^b$ estabelece o limite ao nível de confiança de 99% para $(n - 1)$ graus de liberdade para n dias diferentes, σ_r é a estimativa da repetibilidade e m o número de réplicas diárias.

Estas linhas servem de guias aos valores experimentais sucessivos para detectar situações fora de conformidade na estimativa central. Para este caso, as situações de não conformidade³ são as seguintes: um valor fora das linhas de acção, dois ou três valores sucessivos fora da mesma linha de aviso, sete valores consecutivos do mesmo lado da linha central, sete valores sucessivos com a mesma tendência e dez ou onze valores do mesmo lado da faixa central^[22].

3.2.8 Carta de controlo de dispersão

A R-chart permite diagnosticar perturbações ao nível da dispersão; este tipo de registo temporal exprime a amplitude diária de valores. Contrariamente à carta de posições, esta apresenta-se como assimétrica dado que as amplitudes são grandezas estritamente positivas^[23].

Inicialmente para se construir uma R-chart têm que ser calculadas as amplitudes diárias (R_i) através da equação (3.15).

$$R_i = x_{i,Máx} - x_{i,mín} \quad (3.15)$$

em que $x_{i,Máx}$ simboliza o valor diário máximo e $x_{i,mín}$ o valor diário mínimo. Assim, a linha central da R-chart (CL_r) é dada pela equação (3.16), durante n dias diferentes.

$$CL_r = \bar{R} = \frac{\sum_{i=1}^n R_i}{n} \quad (3.16)$$

Em relação à linha de acção (AL_r), esta é estimada estatisticamente através do parâmetro estatístico D_4 , equação (3.17). Este parâmetro é tabelado e é específico para cada caso consoante o número de réplicas do ensaio.

$$AL_r = \bar{R} \times D_4 \quad (3.17)$$

Quanto à linha de aviso (WL_r) o seu cálculo é realizado através da equação (3.18), sendo calculada com base na linha de acção (AL_r) e na linha central (CL_r).

³ O termo não conformidade é na verdade o reconhecimento de que o controle foi perdido ou de que não foi eficaz.

$$WL_r = \bar{R} + \frac{2}{3}(AL_r - CL_r) \quad (3.18)$$

Para este caso, as situações de não conformidade são as seguintes: um valor fora das linhas de acção, dois valores sucessivos na região de aviso, sete ou mais valores consecutivos com a mesma tendência e sete ou mais valores sucessivos abaixo da linha central^[22].

3.2.9 Comparação de estimativas

Durante o tratamento estatístico dos dados experimentais surge a necessidade em estabelecer uma comparação entre valores. Para tal, serão descritos dois testes que visam esse objectivo.

3.2.9.1 Teste *t*-student

Quando está em causa a comparação de estimativas de posição, assumindo que se trata de dispersões normais e independentes, calcula-se o valor teste de Student^[22] através da equação (3.19).

$$TV = \frac{|\bar{x} - \tau|}{s_x/\sqrt{n}} \leq t_{\alpha(n-1)}^b \quad (3.19)$$

em que \bar{x} é a média dos ensaios experimentais, τ o valor previamente conhecido, s_x o desvio padrão dos valores experimentais e n representa o número de ensaios realizados.

O valor obtido da equação (3.19) é posteriormente comparado com o valor crítico da distribuição *t*-student ao nível de confiança de $100 \times (1 - \alpha)\%$. A hipótese nula assume que não existe diferença significativa entre a média e o valor previamente conhecido, enquanto que a hipótese alternativa assume que existe uma diferença significativa entre esses valores, e consequentemente o valor crítico refere-se à distribuição cumulativa bilateral. Caso se verifique a condição de o valor teste ser inferior ao valor crítico calculado para o nível de confiança em questão, diz-se que a hipótese nula é válida e que assim sendo as estimativas de dispersão são iguais, não havendo diferenças significativas entre elas.

3.2.9.2 Teste t-emparelhado

É um teste estatístico para definir o nível de semelhança ou diferença entre dois momentos de uma mesma amostra ou população. Ao contrário do teste t "comum", que compara as médias e as variâncias, esse teste estuda as diferenças entre duas situações de uma mesma população^[22], equação (3.20).

$$TV = \frac{|\bar{d} - 0|}{s_d^2/\sqrt{n}} \quad (3.20)$$

em que \bar{d} é a diferença da média dos ensaios experimentais, s_d^2 a variância entre as diferenças, e n representa o número de ensaios realizados.

O valor obtido da equação (3.20) é posteriormente comparado com o valor crítico da distribuição t-student ao nível de confiança de $100 \times (1 - \alpha)\%$. Como hipótese nula assume-se que não existe diferença significativa entre as estimativas comparadas, enquanto que a hipótese alternativa assume a existência de diferença significativa entre elas, e consequentemente o valor crítico refere-se à distribuição cumulativa bilateral. Caso se verifique a condição de o valor teste ser inferior ao valor crítico calculado para o nível de confiança em questão, diz-se que a hipótese nula é válida e que assim sendo não existe diferença significativa entre as estimativas comparadas.

3.3 Processo de validação

Para que o processo de validação de um método analítico seja devidamente concluído é necessário proceder a algum tratamento estatístico dos dados experimentais, consoante o parâmetro a validar, tal como é apresentado nesta secção.

3.3.1 Especificidade e selectividade

Um método analítico pode ser considerado específico e selectivo quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, equação (3.21), se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%.

$$\%RI = \frac{x_{total} - x_{inicial}}{x_{adicionado}} \times 100 \quad (3.21)$$

onde $\%RI$ corresponde à taxa de recuperação percentual, x_{total} representa a quantidade determinada após a adição da quantidade conhecida de analito, $x_{inicial}$ é a quantidade determinada antes da adição da quantidade conhecida de analito e $x_{adicionado}$ representa a quantidade conhecida de analito adicionada à amostra.

3.3.2 Gama de trabalho

Para métodos que envolvam uma curva de calibração linear, aconselha-se a escolha de 10 níveis de concentração distribuídos igualmente pela gama de trabalho, onde o primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes, segundo o modelo representado na tabela (3.1), sendo x_i a concentração e y_{ij} o sinal instrumental.

Tabela 3.1 – Tabela modelo para o cálculo da homogeneidade das variâncias.

i	x_i	y_{i1}	y_{i2}	y_{i3}	y_{i4}	y_{i5}	y_{i6}	y_{i7}	y_{i8}	y_{i9}	y_{i10}
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											

As variâncias associadas ao primeiro e último padrão (s_1^2 e s_2^2) são determinadas segundo a equação (3.22) e (3.23),

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (3.22)$$

sendo

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (3.23)$$

para $i = 1$ e $i = 10$ e sendo i o número do padrão e j o número de repetição efectuadas para cada padrão.

As variâncias são testadas para verificar se existem diferenças significativas entre elas, nos limites da gama de trabalho, através do cálculo do teste F , apresentado pela equação (3.24) e (3.25).

$$F = \frac{s_{10}^2}{s_1^2}, \text{ para } s_{10}^2 > s_1^2 \quad (3.24)$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_{10}^2}, \text{ para } s_1^2 > s_{10}^2 \quad (3.25)$$

Compara-se este valor F com o valor tabelado ou calculado da distribuição de Fisher, para $n - 1$ graus de liberdade. Assim, se $F \leq F_{crítico}$, diz-se as diferenças de variância não são significativas e que por isso a gama de trabalho em causa encontra-se bem ajustada. Por outro lado se $F > F_{crítico}$, as diferenças de variância são significativas e que a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter $F \leq F_{crítico}$.

Para métodos que não envolvam curvas de calibração, a gama de trabalho terá de ser definida previamente e poderá ser função de alguns factores, como a quantidade de amostra disponível, da boa visualização de pontos de viragem e volumes gastos no caso de volumetrias.

3.3.3 Linearidade

Esta pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1 para funções de calibração lineares e com a norma ISO 8466-2, para funções de calibração não lineares, bem como os respectivos desvios-padrão residuais, S_{y_1} e S_{y_2} .

A diferença das variâncias (ΔS^2) é calculada pela equação (3.26),

$$\Delta S^2 = (n - 2) \times S_{y_1}^2 - (n - 3) \times S_{y_2}^2 \quad (3.26)$$

em que n é o número de padrões de calibração S_{y_1} e S_{y_2} são dados pelas respectivas equações (3.27) e (3.28),

$$S_{y_1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_1)^2}{n - 2}} \quad (3.27)$$

$$S_{y_2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_2)^2}{n - 3}} \quad (3.28)$$

onde \hat{y}_1 e \hat{y}_2 correspondem aos valores previstos pelo ajuste polinomial de polinómio de primeiro e segundo grau, respectivamente.

O valor de teste TV é calculado pela equação (3.29) e comparado com o valor calculado ou tabelado da distribuição de Fisher, onde se pode concluir se a função de calibração é ou não linear se $TV \leq F_{crítico}$ ou $TV > F_{crítico}$, respectivamente.

$$TV = \frac{\Delta S^2}{S_{y_2}^2} \quad (3.29)$$

Caso se verifique a condição de $TV > F_{crítico}$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho. Caso se justifique pode-se recorrer à norma ISO 8466-2 ou então a uma função susceptível de bom ajuste.

Para avaliar a linearidade poder-se-á também recorrer a uma representação gráfica da função, juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação. Este teste deve ser bem interpretado, pois os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade^[25].

O Método dos Mínimos Quadrados é uma técnica de optimização matemática que procura encontrar o melhor ajustamento para um conjunto de dados tentando minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre a curva ajustada e os dados (tais diferenças são chamadas resíduos).

Um requisito implícito para trabalhar com o método dos mínimos quadrados é que os erros em cada medida sejam distribuídos aleatoriamente e que os resíduos sejam independentes.

Este método permite a determinação dos parâmetros e para o caso de uma regressão linear como é o exemplo da equação (3.30).

$$y = b_0 + b_1x \quad (3.30)$$

onde b_1 e b_0 são dados pelas equações (3.31) e (3.32):

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^N [(x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.31)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1\bar{x} \quad (3.32)$$

sendo \bar{y} a média dos valores de y , \bar{x} a média dos valores de x , x_i os valores individuais de concentração e y_i os valores individuais do sinal instrumental.

Para uma completa análise da linearidade do método de ensaio, deverão ser estabelecidas medidas para o estudo das curvas de calibração obtidas, bem como critérios de aceitação dos ser parâmetros, de modo a funcionarem como ferramenta de aceitação de novas curvas de calibração.

3.3.4 Limite de detecção

A determinação deste limite com base nas réplicas do branco, resulta na equação (3.34), que traduz o sinal instrumental referente à detecção.

$$y_{LD} = \bar{y}_0 + 2 \times t_{0,05(m_0-1)}^u \times \frac{\sigma_0}{\sqrt{m_0}} \quad (3.34)$$

onde \bar{y}_0 é a média do sinal instrumental medido de m_0 brancos, preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina; σ_0 representa o desvio padrão associado a \bar{y}_0 ; $t_{0,05(m_0-1)}^u$ é o valor crítico

(unilateral) para um nível de confiança de 95% para $(m_0 - 1)$ graus de liberdade, em que m_0 representa o número de réplicas do branco.

Caso o método em estudo envolva a utilização de uma calibração linear, recorre-se a equação (3.35),

$$y_{LD} = b_0 + 2 \times t_{0,05}^u(n-p) \times \sigma_{b_0} \quad (3.35)$$

em que b_0 corresponde à ordenada na origem, $t_{0,05}^u(m_0-1)$ é o valor crítico (unilateral) para um nível de confiança de 95% para $(n - p)$ graus de liberdade, em que n é o número de pontos da curva de calibração, p o número de parâmetros e σ_{b_0} é o desvio padrão associado à ordenada na origem.

Se se pretender calcular o sinal instrumental do limite de detecção pelo método da dispersão dos resíduos, utiliza-se a equação (3.36).

$$y_{LD} = 2 \times t_{0,05}^u(n-p) \times \sigma_{fit} \quad (3.36)$$

onde tal como anteriormente $t_{0,05}^u(m_0-1)$ é o valor crítico (unilateral) para um nível de confiança de 95% para $(n - p)$ graus de liberdade, em que n é o número de pontos da curva de calibração, p o número de parâmetros e σ_{fit} é o desvio padrão residual.

Pelos três métodos apresentados é possível verificar que o resultado final obtido é o sinal instrumental mínimo a partir do qual é possível detectar o analito em questão. Se se pretender determinar a concentração correspondente ao limite de detecção de cada um dos métodos referidos anteriormente, recorre-se à equação (3.37), obtida a partir da equação (3.30).

$$x_{LD} = \frac{y_{LD} - b_0}{b_1} \quad (3.37)$$

em que y_{LD} é o sinal instrumental obtido a partir da equação (3.34), (3.35) ou (3.36), b_0 é a ordenada na origem e b_1 o declive da curva de calibração.

3.3.5 Limite de quantificação

Tal como para o limite de detecção, pode-se recorrer a três métodos para a determinação do respectivo sinal instrumental: réplicas de branco, parâmetros da curva de calibração e dispersão dos resíduos, equação (3.38), (3.39) e (3.40) respectivamente.

$$y_{LQ} = \bar{y}_0 + 3 \times 2 \times t_{0,05(m_0-1)}^u \times \frac{\sigma_0}{\sqrt{m_0}} \quad (3.38)$$

$$y_{LQ} = b_0 + 3 \times 2 \times t_{0,05(n-p)}^u \times \sigma_{b_0} \quad (3.39)$$

$$y_{LQ} = 3 \times 2 \times t_{0,05(n-p)}^u \times \sigma_{fit} \quad (3.40)$$

Em que o significado estatístico de cada parâmetro é o mesmo que referido anteriormente para o ponto 3.3.4.

Tal como para o limite de detecção, caso se pretenda converter a resposta instrumental obtida por cada um dos métodos, em concentração, sendo esta considerada como a concentração mínima a partir da qual é possível quantificar o analito, recorre-se à equação (3.30) a partir da qual se obteve a equação (3.41).

$$x_{LQ} = \frac{y_{LQ} - b_0}{b_1} \quad (3.41)$$

em que y_{LQ} é o sinal instrumental obtido a partir da equação (3.38), (3.39) ou (3.40), b_0 é a ordenada na origem e b_1 o declive da curva de calibração.

3.3.6 Precisão

Para a sua determinação da repetibilidade, deve-se efectuar uma série de leituras superiores a 10 sobre a mesma amostra ou padrões, nas mesmas condições de repetibilidade. Para um nível de confiança de 95%, o limite de repetibilidade é avaliado segundo a equação (3.42):

$$r = \frac{\sqrt{2}}{\sqrt{m}} \times t_{0,05(n-1)}^b \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (3.42)$$

no qual m é o número de réplicas realizadas, $t_{0,05(n-1)}^b$ corresponde ao valor t-student calculado para um nível de confiança de 95% para $n - 1$ graus de liberdade e S_{ri} é o desvio padrão de repetibilidade associado aos resultados em estudo.

A partir do desvio padrão obtido sob condições de reprodutibilidade, S_{ri} , e do valor t-student calculado para um nível de confiança de 95% para $n - 1$ graus de liberdade, $t_{0,05(n-1)}^b$, é possível calcular o limite de reprodutibilidade, o qual permite ao analista decidir se a diferença entre os valores em duplicado das amostras analisadas nas mesmas condições de reprodutibilidade é significativa. Deste modo e para um nível de confiança de 95% foi estipulado que o limite de reprodutibilidade é dado pela equação (3.43).

$$R = \sqrt{2} \times t_{0,05(n-1)}^b \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (3.43)$$

A precisão intermédia refere-se à dispersão de resultados do método sujeito a variações aleatórias dentro do mesmo laboratório (exemplos: dias diferentes, analistas diferentes, equipamentos diferentes, entre outros).

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo o importante é discutir e analisar os resultados obtidos e o tratamento estatístico utilizado como uma ferramenta na interpretação dos resultados. Para tal, encontram-se apresentados os resultados experimentais relativos à determinação de fósforo total, que visam a validação do referido método.

4.1. Verificação dos espectros dos padrões

No início do estudo deste método, e após a análise da respectiva bibliografia, foi concluído que o comprimento de onda adequado para se medir a absorvância de uma amostra que continha fósforo era de 690 nm.

Procedeu-se assim à realização do espectro de três padrões (e branco), figura (4.1), de modo a demonstrar que a esse comprimento de onda a absorvância era máxima e que portanto este seria o comprimento de onda ideal para este método.

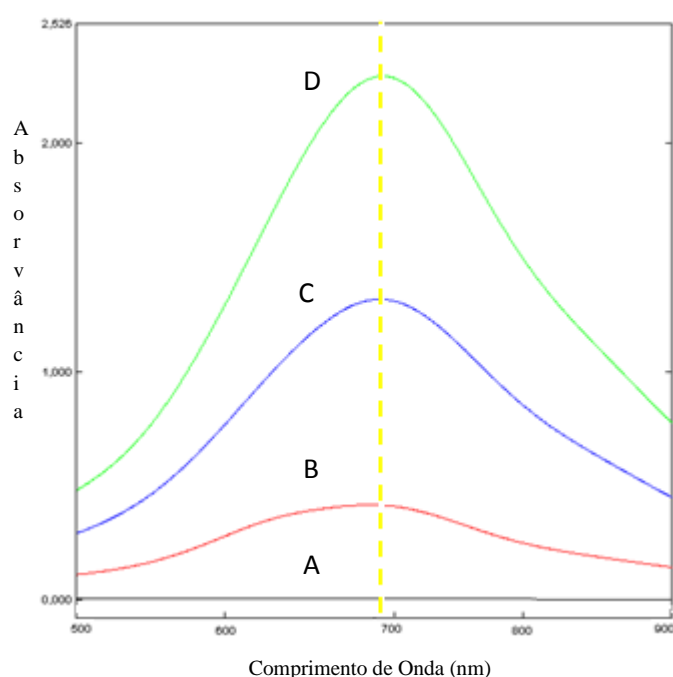


Figura 4.1 – Comparação de espectros: A) branco, B) padrão de 0,326 mg/L P, C) padrão de 1,304 mg/L P e D) padrão de 2,609 mg/L P.

Como se pode observar através dos espectros apresentados anteriormente, a absorvância é máxima para um comprimento de onda, de aproximadamente, 690 nm (linha tracejada a

amarelo). Portanto pode-se concluir que, efectivamente a análise de fósforo total deve ser efectuada neste comprimento de onda máximo, de forma a maximizar a sensibilidade do método o que pode significar melhores limiares analíticos.

4.2. Estudo da estabilidade do sinal analítico

De acordo com a descrição do procedimento experimental do método descrito na secção 3.1, a absorvância dos padrões e amostras só deve ser lida ao fim de 10 minutos sem ultrapassar os 12 minutos, uma vez que, após esse tempo, a absorvância dos diferentes padrões e amostras altera-se de modo significativo.

No sentido de verificar este fenómeno foi realizado um estudo que consiste em analisar três padrões e um branco, sendo a leitura das respectivas absorvâncias lidas durante 40 minutos, com o objectivo de prever o melhor intervalo de tempo para realizar a leitura dos valores experimentais, tabela (4.1).

Tabela 4.1 – Valores obtidos para a leitura de absorvância do branco (P_0) e padrões (P_1 a P_3) em função do tempo decorrido após a adição do último reagente e subsequente homogeneização.

Tempo (min.)	P_0	P_1	P_2	P_3	$P_1 - P_0$	$P_2 - P_0$	$P_3 - P_0$
0	0,111	0,250	0,945	1,686	0,139	0,834	1,575
5	0,099	0,285	1,028	1,855	0,186	0,929	1,756
8	0,096	0,297	1,044	1,892	0,201	0,948	1,796
10	0,090	0,302	1,054	1,904	0,212	0,964	1,814
12	0,089	0,307	1,055	1,906	0,218	0,966	1,817
15	0,086	0,305	1,020	1,858	0,219	0,934	1,772
20	0,082	0,300	1,017	1,813	0,218	0,935	1,731
25	0,080	0,298	1,013	1,810	0,218	0,933	1,730
30	0,078	0,296	1,012	1,808	0,218	0,934	1,730
35	0,075	0,294	0,988	1,802	0,219	0,913	1,727
40	0,071	0,292	0,974	1,800	0,221	0,903	1,729

$P_1 = 0,326$ mg/L P; $P_2 = 1,304$ mg/L P; $P_3 = 2,609$ mg/L P.

Para mais facilmente se perceber a evolução temporal ao longo da escala de concentração convém normalizar os valores, por exemplo em relação ao máximo de absorvância obtido no tempo. No caso de as leituras serem realizadas por diferença sobre o branco ($P_i - P_0$), os valores encontram-se calculados na tabela (4.1). Tendo em conta a referida tabela, no instante $t = 12$ minutos os padrões P_1 , P_2 e P_3 atingem o máximo de absorvância, logo estipula-se o respectivo valor como referência no cálculo da normalização.

A figura (4.2) corresponde à representação gráfica dos resultados obtidos.

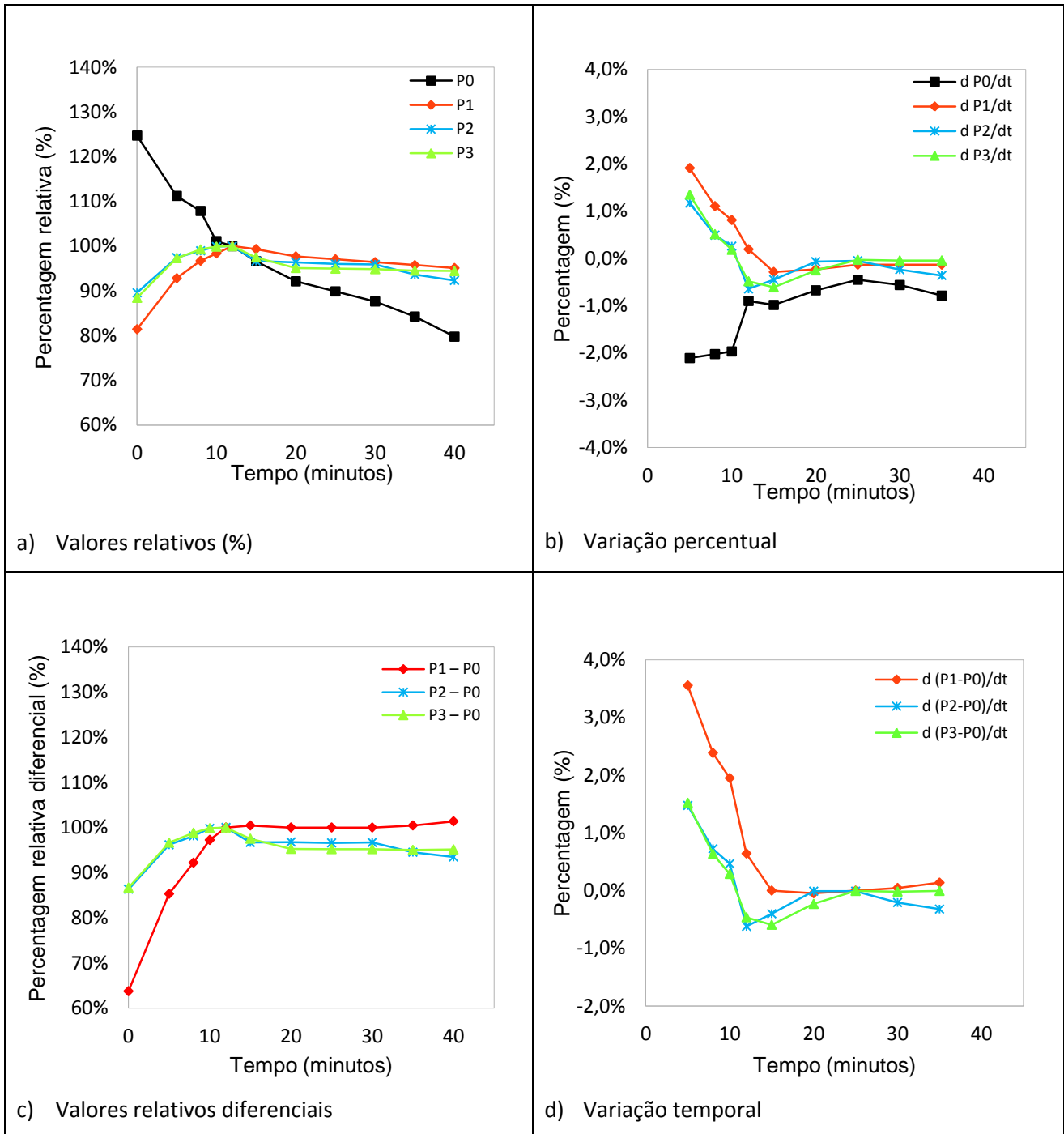


Figura 4.2 – Resultados obtidos: a) valores relativos e b) respectiva variação; c) valores relativos diferenciais e d) respectiva variação temporal.

Genericamente, da figura (4.2) resulta que a variação de absorvância é mínima a partir do instante $t = 12$ minutos até aos 40 minutos. Para tempos superiores a 40 minutos nada se sabe, contudo pelo que se verificou a partir dos 12 minutos, estima-se que as absorvâncias lidas continuariam a diminuir ao longo do tempo.

A partir da figura (4.2) a) e c) pode-se visualizar a estabilidade do sinal ao longo do tempo. Em ambos os casos é possível verificar que entre 10 a 15 minutos é possível proceder à leitura dos padrões e amostras a analisar, pois obteve-se uma estabilidade do sinal de aproximadamente 100%.

Quanto aos gráficos b) e d) é possível visualizar a diferença percentual ao longo do tempo, nas mesmas condições. Para os dois casos verifica-se que após o minuto 10 a diferença é aproximadamente 0,0%, o que significa que após os 10 minutos a diferença na absorvância é mínima.

4.3. Definição da gama de trabalho

A escolha da gama de trabalho é muito importante para que o analista possa saber qual o intervalo de concentrações em que o analito pode ser determinado e quantificado de forma precisa e exacta.

Os padrões devem abranger toda a gama de trabalho e esta deve estar devidamente definida e validada, sendo que esta validação pode ser feita recorrendo ao teste da homogeneidade de variâncias.

O teste de homogeneidade de variâncias, foi realizado com base na ISO 8466-1, e para tal realizaram-se 10 ensaios para o primeiro e último padrão da curva de calibração, 0,326 e 2,609 mg/L P, respectivamente, apresentando a tabela (4.1) os resultados obtidos.

Tabela 4.1 – Resultados das absorvâncias dos 10 ensaios sobre o primeiro e o último padrão da curva de calibração.

Padrão (mg/L P)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀
0,326	0,280	0,294	0,281	0,304	0,286	0,293	0,298	0,296	0,291	0,292
2,609	2,143	2,122	2,145	2,141	2,166	2,168	2,142	2,142	2,150	2,146

Em primeiro lugar procedeu-se à verificação da existência de outliers através do teste de Grubbs, recorrendo à equação (3.3) e à tabela A1.1. Para tal, testou-se o valor máximo e mínimo de absorvâncias obtidas nos 10 ensaios para cada solução padrão, onde se obteve um valor teste de 1,68 e 1,54 respectivamente para o padrão de 0,326 mg/L P, enquanto que para o padrão de 2,609 mg/L P os respectivos valores teste foram de 1,64 e 1,87. Ao se comparar

com o valor crítico de 2,29, para um nível de confiança de 95% e para $n = 10$, pode-se concluir que para ambos os casos não se verifica a presença de outliers, dado que o valor teste é inferior ao valor crítico tabelado para este caso.

De modo a averiguar se existe alguma diferença significativa entre as variâncias para cada padrão, calculou-se as variâncias de acordo com as equações (3.24) e (3.25), obtendo-se uma variância de $5,56 \times 10^{-6}$ para o padrão de 0,326 mg/L P e uma variância de $1,71 \times 10^{-5}$ para o padrão de 2,609 mg/L P. A partir destas variâncias calculou-se o teste de Fisher de acordo com a equação (3.4), obtendo-se um valor teste (TV) de 3,08; como o valor crítico calculado pela distribuição de Fisher bilateral ao nível de confiança de 99% é de 6,54 e sendo este superior ao valor de teste, pode-se dizer que não existe diferença significativa entre as variâncias, indicando por isso que existe homogeneidade de variâncias, e portanto a gama de trabalho é adequada para a quantificação de fósforo.

4.4. Verificação da linearidade

Este método utiliza uma curva de calibração na qual estão representados os vários padrões utilizados, os limites analíticos, e através da qual podemos conhecer a quantidade de fósforo existente numa amostra de água residual.

Os padrões são referenciais de rastreabilidade muito importantes na validação de qualquer método analítico, logo não devem ser removidos de uma curva de calibração sem fundamento estatístico, pois a gama de trabalho do método pode ficar afectada. A Farmacopeia Americana afirma que o número mínimo de padrões é cinco, desde que os outros parâmetros respeitem os critérios estipulados.

Os padrões têm como objectivo o controlo da qualidade e a validação dos métodos analíticos, bem como o controlo do processo realizado. A preparação da curva de calibração envolvia os padrões referidos na tabela (4.4). A verificação da linearidade demonstrada foi apenas realizada sobre uma das diversas curvas de calibração realizadas durante todo o período de estágio.

Tabela 4.3 – Concentração dos padrões e respectivas absorvâncias.

Padrões	Concentração (mg/L P)	Absorvância
P ₁	0,326	0,318
P ₂	0,652	0,653
P ₃	1,000	0,923
P ₄	1,304	1,170
P ₅	1,631	1,442
P ₆	1,956	1,627
P ₇	2,609	2,190

Numa primeira fase para se decidir qual o modelo mais adequado para proceder à calibração da resposta instrumental, recorreu-se ao teste de Mandel. Este teste permitiu proceder à escolha do modelo com base nos polinómios de primeiro e segundo grau. Para tal, representaram-se os valores obtidos e os previstos pelos modelos P₁ ($y = b_0 + b_1x$) e P₂ ($y = b_0 + b_1x + b_2x^2$), bem como os resíduos de cada modelo; deste modo, o teste de Mandel permite a comparação do desempenho do ajuste, que para este caso em particular e recorrendo à comparação do valor de teste *TV* com o valor crítico calculado (1,28 e 21,2 respectivamente), é possível afirmar que o modelo mais adequado, sendo assim o que apresenta melhor desempenho do ajuste é o modelo de polinómio de primeiro grau (função linear), uma vez que se verifica a veracidade da hipótese nula. A existência de um valor prova de 42,1% permite confirmar a aceitação da hipótese nula sem qualquer hesitação.

Recorreu-se também ao teste *F* como meio de verificação da adequabilidade dos valores de absorvância dos padrões em relação ao modelo escolhido (P₁), no sentido de detectar eventuais valores discrepantes. Quando se excluiu o padrão 1 (0,326 mg/L P), obteve-se um valor teste de 5,94, inferior ao valor crítico de 21,2, para um nível de confiança de 99%. Após a análise do respectivo valor prova (10,6%) pode-se concluir que a presença deste ponto na curva de calibração é essencial, não devendo por isso ser excluído.

Ao repetir o processo também para o padrão 6 (1,956 mg/L P), obteve-se um valor teste de 0,39, também ele inferior ao valor crítico de 21,2, para o mesmo intervalo de confiança de 99%. O valor de prova obtido, 76,4%, reforça a decisão de aceitação da hipótese nula, o que faz com que o padrão em questão não possa ser excluído da curva de calibração.

Deste modo, na figura (4.3) é possível visualizar a curva de calibração obtida para este método após a análise com o teste de *F*.

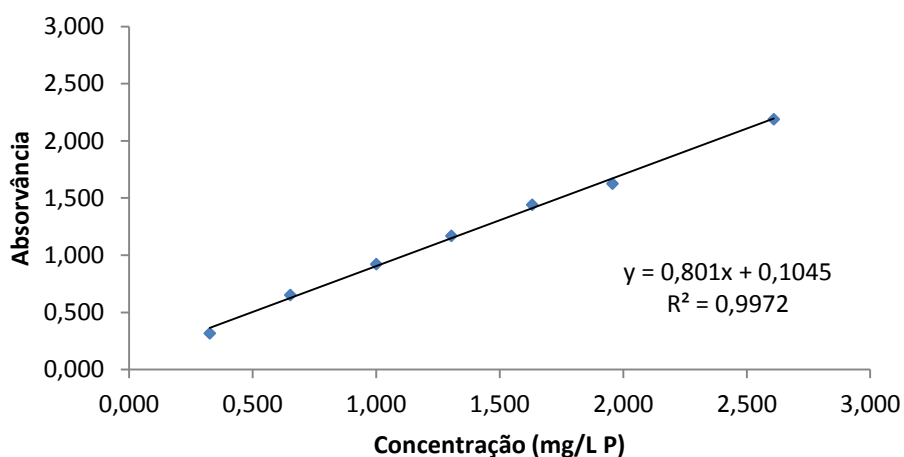


Figura 4.3 – Representação gráfica da curva de calibração com os sete padrões iniciais.

A curva de calibração fornece-nos algumas informações como a equação da recta, o declive, a ordenada na origem e a correlação entre ambas as variáveis (absorvâncias e respectivas concentrações dos padrões).

4.5. Definição da sensibilidade

Uma vez que anteriormente se verificou que se estava perante um modelo de função linear, a sensibilidade pode ser avaliada através do declive da curva de calibração, como foi referido no ponto 2.5.5. Tendo em conta os parâmetros de desempenho do método, obtidos pelo modelo de polinómio de 1º grau, é possível calcular o declive e o respectivo erro, obtendo assim a sensibilidade do método. Seguindo este raciocínio obteve-se uma sensibilidade de $0,773 \pm 0,023$ ($\text{mg}^{-1} \text{L}$).

4.6. Estudo dos limiares analíticos

A determinação do limite de detecção e do limite de quantificação foi realizada recorrendo aos três métodos referidos nos pontos 2.5.6, 3.3.4 e 3.3.5: brancos, ordenada na origem e desvio padrão residual.

A estimativa com base nos brancos, foi realizada segundo os resultados expressos na tabela (4.4), encontrando-se assim na tabela (4.5) e (4.6) os resultados obtidos para cada um dos três modos de estimativa.

Tabela 4.4 – Resultados das absorvâncias obtidas da análise de 5 ensaios em branco para a determinação dos limiares analíticos, relativos à respectiva curva de calibração.

Ensaio	Calib.1	Calib.2	Calib.3	Calib.4
B ₁	0,013	0,013	0,013	0,012
B ₂	0,014	0,015	0,021	0,015
B ₃	0,019	0,014	0,019	0,017
B ₄	0,020	0,018	0,023	0,017
B ₅	0,019	0,016	0,023	0,019

Tabela 4.5 – Resultados obtidos para as absorvâncias dos respectivos limites através dos três modos de estimativa (através de réplicas de brancos, da estimativa da ordenada da origem e do desvio padrão do ajuste).

Procedimento	Branco		Ordenada na Origem		Desvio Padrão Residual	
Calibração	Y_{LD}	Y_{LQ}	Y_{LD}	Y_{LQ}	Y_{LD}	Y_{LQ}
Calib.1	0,02	0,02	0,28	0,57	0,18	0,53
Calib.2	0,02	0,02	0,33	0,61	0,18	0,53
Calib.3	0,02	0,02	0,36	0,69	0,21	0,62
Calib.4	0,02	0,02	0,29	0,56	0,17	0,52

Tabela 4.6 – Resultados obtidos para as concentrações dos respectivos limites através dos referidos três modos de estimativa.

Procedimento	Branco		Ordenada na Origem		Desvio Padrão Residual	
Calibração	X_{LD}	X_{LQ}	X_{LD}	X_{LQ}	X_{LD}	X_{LQ}
Calib.1	0,16	0,16	0,22	0,55	0,04	0,50
Calib.2	0,23	0,23	0,04	0,54	0,03	0,42
Calib.3	0,22	0,22	0,20	0,64	0,01	0,54
Calib.4	0,16	0,16	0,03	0,50	0,03	0,45

Os resultados expressos nas tabelas (4.5) e (4.6) encontram-se correlacionados. Enquanto que a tabela (4.5) expressa os sinais analíticos relativos ao limite de detecção e quantificação para os três métodos diferentes, a tabela (4.6) representa a menor concentração, obtidos

através da conversão do sinal instrumental em concentração, com o recurso às equações (3.37) e (3.41).

Numa primeira fase, recorreu-se a um teste estatístico mais genérico, como teste *t*-emparelhado, com o objectivo de comparar os 3 modos de estimativa utilizados, quer para a determinação do limite de detecção, como para o limite de quantificação. Para o primeiro caso, quando se comparou a estimativa dos brancos com a ordenada na origem (b_1) obteve-se um valor teste $TV = 2,73$ e um valor crítico para um nível de confiança de 95% de 3,18, o que permite dizer que não existe diferença significativa entre os resultados obtidos pelas diferentes estimativas, obtendo-se cerca de 7,2% de probabilidade de concordância entre os resultados obtidos. A comparação da estimativa dos brancos com o desvio padrão residual é significativamente diferente, pois verifica-se que o valor teste de 6,69 é superior ao valor crítico de 5,84 para um nível de confiança de 99%; a hipótese nula (H_0) é completamente rejeitada pois verifica-se apenas 0,7% de concordância entre os resultados obtidos pelas duas estimativas. Por fim, a comparação entre a estimativa da ordenada na origem com o desvio padrão residual resultou num valor teste de 1,85 que ao ser comparado com o valor crítico de 3,18 para um nível e confiança de 95% permite afirmar que não existe diferença significativa em ambas as estimativas, tendo cerca de 16,1% de probabilidade de concordância entre os resultados comparados.

A comparação das estimativas da determinação do limite de quantificação também foi realizada aos pares: brancos e ordenada na origem, brancos e desvio padrão residual e finalmente, ordenada na origem e desvio padrão residual. Em todos os casos verificou-se que existem diferenças significativas entre os resultados obtidos, havendo apenas 0,06%, 0,30% e 1,85%, respectivamente, de probabilidade de concordância entre os resultados comparados.

Numa segunda fase recorreu-se à ferramenta estatística Anova de factor único, também como forma de comparar as 3 estimativas de cálculo. A tabela (4.7) e (4.8) apresentam os resultados relativos ao limite de detecção e de quantificação, respectivamente, após a aplicação da Anova.

Tabela 4.7 – Resultado da análise das estimativas do limite de detecção, após a execução da ferramenta estatística ANOVA de factor único.

Fonte de variação	SS	v	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,055	2	0,027	6,91	0,015	4,26
Dentro de grupos	0,036	9	0,004			8,02
Total	0,090	11				

Tabela 4.8 – Resultado da análise das estimativas do limite de quantificação, após a execução da ferramenta estatística ANOVA de factor único.

Fonte de variação	SS	v	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,290	2	0,145	57,1	7,7E-06	4,26
Dentro de grupos	0,023	9	0,003			8,02
Total	0,312	11				

Em ambos os casos, a variação entre grupos é a variação correspondente ao factor estimativa, e a variação dentro de grupos é a variabilidade interna média dos diferentes níveis do factor (esta variância estima o erro puramente aleatório que existe dentro de todos os N níveis do factor).

Quando se compara as estimativas do limite de detecção, tabela (4.7), verifica-se que o valor experimental (F) excede o valor crítico (F crítico) para um nível de confiança de 95%. Assim sendo e ao determinar o valor crítico para um nível de confiança de 99%, pode-se verificar que a hipótese nula pode ser aceite mas com algumas dúvidas. Contudo quando o valor de prova é analisado, verifica-se que a hipótese nula é rejeitada e que a hipótese alternativa é dúbia. A este nível de confiança verifica-se uma diferença significativa entre níveis do factor em estudo, ou seja, o factor estimativa influi de modo significativo no resultado obtido.

O valor de prova como indica a probabilidade de aceitação da hipótese nula, facilmente se verifica que este é muito baixo, logo a probabilidade (%) de concordância dos resultados obtidos entre estimativas em relação aos ensaios é de apenas 1,5%.

No caso das estimativas para os limites de quantificação, tabela (4.8), verifica-se que o valor teste é bastante superior ao valor crítico para um nível de confiança de 99%. A análise do valor de prova permite concluir que a hipótese nula é rejeitada pois a sua probabilidade de

aceitação é praticamente nula; assim, os três modos de estimativa influem de modo significativo no resultado obtido.

4.7. Avaliação da precisão

Através da análise da repetibilidade do método é possível verificar a precisão do método que se está a validar. Como foi referido nos pontos 2.5.7 e 3.3.6, a repetibilidade é uma das três maneiras possíveis para se averiguar se nas mesmas condições de trabalho se consegue atingir a precisão dos resultados obtidos. Nesta abordagem pretendeu-se avaliar também a influência do factor *dia*, bem como a estimativa da componente puramente aleatória e do limite de repetibilidade. Assim sendo, o estudo foi realizado recorrendo a dois padrões de concentração distinta P_1 e P_7 , durante 4 dias seguidos e com 6 réplicas diárias, como se pode verificar pela tabela (4.9) e (4.10), respectivamente.

Tabela 4.9 – Resultados obtidos após a análise do padrão P_1 , de 0,326 mg/L de fósforo, durante 4 dias sucessivos e com 6 réplicas diárias (estes resultados são expressos em mg/L P).

Dia	Réplicas obtidas com P_1					
D ₁	0,278	0,226	0,259	0,292	0,290	0,303
D ₂	0,321	0,291	0,263	0,270	0,268	0,259
D ₃	0,266	0,268	0,274	0,283	0,270	0,275
D ₄	0,250	0,231	0,248	0,269	0,266	0,262

Tabela 4.10 – Resultados obtidos após a análise do padrão P_7 , de 2,609 mg/L de fósforo, durante 4 dias sucessivos e com 6 réplicas diárias (estes resultados são expressos em mg/L P).

Dia	Réplicas obtidas com P_7					
D ₁	2,205	2,225	2,256	2,236	2,240	2,257
D ₂	2,226	2,182	2,260	2,202	2,182	2,261
D ₃	2,264	2,209	2,208	2,213	2,210	2,219
D ₄	2,279	2,199	2,290	2,253	2,193	2,206

Aos resultados apresentados na tabela (4.9) e (4.10) começou-se por calcular a média diária dos resultados obtidos e sobre essas médias diárias verificou-se a possibilidade de haver valores discrepantes, através do teste de Grubbs. Quando se pôs à prova o valor mínimo e o máximo da série de médias calculadas, verificou-se que para ambos os casos o valor teste

obtido era inferior ao valor crítico de Grubbs para um nível de confiança de 95% e 5 graus de liberdade, dizendo-se assim que não existem outliers, não devendo por isso excluir nenhum valor.

De seguida, com o objectivo de verificar a influência do factor dia nos resultados obtidos, aplicou-se a ferramenta estatística Anova de factor único. Pela análise dos resultados obtidos, verifica-se em ambos os casos, que o valor experimental (F) não excede o valor crítico (F crítico) para um nível de confiança de 95%, dizendo-se assim que o factor dia não influi nos resultados obtidos. Pela análise do valor de prova, confirma-se a aceitação da hipótese nula, uma vez que para P_1 e P_7 , existe cerca de 18,7% e 63,8%, respectivamente, de probabilidade de concordância entre os resultados obtidos entre dias diferentes, o que reforça a ideia de que a este nível de confiança não se verifica diferença significativa entre níveis do factor em estudo, ou seja, o factor dia influi de modo significativo no resultado obtido.

Ao se efectuar o estudo da Anova sobre réplicas da mesma determinação efectuada em dias diferentes, o erro interno, puramente aleatório traduz a repetibilidade de cada caso em particular. O limite de repetibilidade permite comparar valores sucessivos para tentar identificar diferenças significativas que excedem o referido limite. Assim, procedeu-se à determinação da repetibilidade e do limite de repetibilidade, com base nos resultados experimentais obtidos pela execução da ferramenta estatística Anova. A repetibilidade estimada é de 0,020 e 0,032, respectivamente para P_1 e P_7 , enquanto que os respectivos limites de repetibilidade calculados para cada caso é 0,023 e 0,036, sendo este o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para um nível de confiança de 95%.

4.8. Estudo da exactidão

Uma vez que não se dispunha no laboratório de algum material de referência certificado (MCR) ou material de referência interno (MRI), avaliou-se a exactidão do método através de ensaios de recuperação, calculando-se a taxa de recuperação através da expressão (3.21). Neste caso, tem-se uma amostra com um teor médio de 0,120 mg/L de fósforo, onde foi adicionada uma pequena quantidade equivalente a 1,000 mg/L de fósforo. Analisados os 5 ensaios sobre a mesma amostra, calculou-se as respectivas taxas de recuperação, representados na tabela (4.11).

Tabela 4.11 – Cálculo das taxas de recuperação para a mesma amostra.

Ensaio	Concentração inicial (mg/L P)	Concentração final (mg/L P)	%RI
1	0,120	1,221	110,1
2	0,121	1,117	99,6
3	0,119	1,102	98,3
4	0,122	1,249	112,7
5	0,120	1,118	99,8

Em primeiro lugar procedeu-se à verificação da existência de outliers através do teste de Grubbs. Para tal, testou-se o valor máximo e mínimo de %RI obtidos nos 5 ensaios, onde se obteve um valor teste de 1,27 e 0,86. Estes valores ao serem comparados com o valor crítico de 1,71 (tabela A1.1), para um nível de confiança de 95% e para $n = 5$, foi possível concluir que não se verifica a presença de outliers, dado que o valor teste é inferior ao valor crítico tabelado.

Tendo em conta que o valor máximo de exactidão nos ensaios de recuperação é de 100,0%, recorreu-se ao teste *t*-student como forma de comparar a estimativa central e o valor tido como referência. Recorrendo à equação (3.19), obteve-se um valor de teste de 1,36 que será comparado com o valor crítico para um nível de confiança de 95% e 4 graus de liberdade, 2,78. Como se verifica que o valor teste é inferior ao valor crítico calculado, é possível afirmar que não existe diferença significativa entre a estimativa central dos resultados experimentais (104,1%) e o valor de referência (100,0%). Como forma de verificação, determinou-se o respectivo valor prova, o qual resultou em 24,6% de aceitação da hipótese nula, o que permite dizer que o método possui uma grande possibilidade em ser exacto.

4.9. Avaliação da estabilidade das curvas de calibração

Com o intuito de verificar a estabilidade da curva de calibração do método ao longo do tempo, efectuou-se durante um mês a preparação de uma curva por semana. Sobre os resultados obtidos, tabela (4.12), aplicou-se a ferramenta estatística Anova de factor duplo sem repetição, com o objectivo de verificar a influência dos dois factores em estudo nos resultados obtidos.

Tabela 4.12 – Resultados das concentrações (mg/L de fósforo) de cada padrão da curva de calibração durante 4 semanas.

Padrões	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
P1	0,360	0,415	0,343	0,354
P2	0,669	0,723	0,751	0,710
P3	0,972	1,061	0,969	1,027
P4	1,201	1,177	1,195	1,267
P5	1,540	1,434	1,418	1,514
P6	1,820	1,757	1,674	1,721
P7	2,204	2,280	2,234	2,219

Em primeiro lugar aplicou-se o teste de Grubbs para cada nível de concentração, com o objectivo de detectar a presença de valores discrepantes. Tendo em conta que o valor crítico para este caso em específico é de 1,89 (para um nível de confiança de 95% e $n = 7$ – tabela A1.1), verifica-se que a hipótese nula é válida e por isso não existe a presença de outliers nos resultados experimentais analisados.

De seguida e com o objectivo de anular a influência do factor concentração, procedeu-se à determinação do valor médio para cada nível de concentração e posteriormente, a cada valor de absorvância apresentado na tabela (4.12) subtrai-se o valor médio do respectivo nível de concentração.

Deste modo pode-se seguir com o tratamento dos dados e para que o principal objectivo seja cumprido, recorreu-se à ferramenta estatística ANOVA de factor duplo sem réplicas (tal como referido anteriormente), de modo a verificar a influência dos factores concentração e semana, tabela (4.13), nos resultados obtidos.

Tabela 4.13 – Resultados obtidos após a execução da ferramenta estatística ANOVA de factor duplo sem réplicas.

Fonte de variação	SS	v	MQ	F	valor P	F crítico
Linhas	6,94E-18	6	1,16E-18	5,68E-16	1,00	2,66
Colunas	5,86E-03	3	1,95E-03	0,961	0,433	3,16
Erro	3,66E-02	18	2,03E-03			
Total	4,25E-02	27				

A variação nas linhas é a variação correspondente ao factor concentração relativo aos diferentes padrões, enquanto que a variação nas colunas é relativa à variação do factor semanas.

Por comparação do valor de teste (F) com o valor crítico (F crítico) é possível concluir que o factor relacionado com a concentração dos padrões não influencia os resultados obtidos, uma vez que o seu efeito foi anulado. Quanto ao factor relacionado com as diferentes semanas ao longo de um mês, verifica-se que o valor teste é inferior ao valor crítico e sendo assim o referido factor não influencia os resultados obtidos. Esta constatação estatística leva a assumir que a curva de calibração é coerente dentro do período de tempo testado de um mês.

Como o valor de prova indica que a probabilidade de aceitação da hipótese nula é elevada, conclui-se que a probabilidade (%) de a curva de calibração ser estável durante um mês é de 43,3%.

4.10. Coerência da calibração

O controlo da sensibilidade é realizado através da representação de cartas de controlo, construídas a partir dos ajustes das 6 curvas de calibração realizadas, os quais pretendem controlar a aceitação da sensibilidade das futuras curvas realizadas para este método.

Com base nos resultados apresentados na tabela (4.14), procedeu-se à construção da carta de controlo.

Tabela 4.14 – Resultado da sensibilidade e respectivo erro padrão, relativa a cada curva de calibração, após o ajuste do modelo com o polinómio de 1º grau.

Parâmetro	Calib.1	Calib.2	Calib.3	Calib.4	Calib.5	Calib.6
b_1	0,773	0,780	0,779	0,827	0,803	0,807
σ_{b_1}	0,023	0,023	0,027	0,022	0,024	0,030

Na carta de controlo de posição, representada na figura (4.4) encontram-se representadas as linhas central (CL_x), de aviso (WL_x) e de acção (AL_x), determinadas segundo as equações (3.12), (3.13) e (3.14) respectivamente. Obteve-se deste modo uma estimativa central de 0,795

mg/L P, que para os níveis de confiança de 95% e 99% prevê estimativas situadas entre [0,752-0,838] e [0,727-0,862] mg/L P, respectivamente.

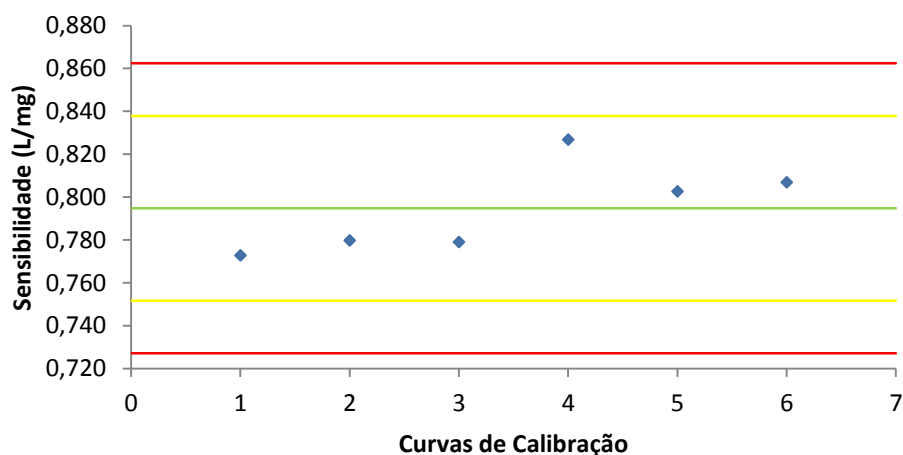


Figura 4.4 – Representação gráfica da carta de controlo de posições, estando representado a azul as sensibilidades de 6 curvas de calibração distintas e independentes, a verde a linha central, a amarelo as linhas de aviso (95%) e a vermelho as linhas de acção (99%).

A partir da figura (4.4) é possível identificar as situações de não conformidade para este tipo de carta de controlo. Segundo estas anomalias referidas no ponto 3.2.8 e tendo em conta a figura (4.4), pode-se dizer que não existe nenhuma não conformidade, estando todos os valores dentro das condições impostas.

A tabela (4.14) representa também, as estimativas de dispersão (erro padrão da sensibilidade), obtidas directamente do modelo de polinómio de primeiro grau, para cada uma das curvas de calibração. Com base nestes valores, obteve-se um erro puramente aleatório de 0,025, associado à sensibilidade do método.

É importante referir que estas são algumas das possíveis abordagens da validação de métodos de ensaio, entre tantas outras que existem dependendo de vários factores que influenciam o tratamento dos dados e o grau de exigência destes, nomeadamente o sector de actuação, o nível de certificação e principalmente as normas a seguir, pelo que, não importa apenas conhecer algumas metodologias de validação de métodos de ensaio, mas sim saber adequa-las devidamente ao nosso objecto de estudo.

Capítulo **5**

Conclusão

Apresentados e discutidos os resultados referentes ao presente projecto, importa agora realizar as considerações finais e conclusivas que os mesmos resultados demonstraram, realçando ainda propostas de estudos futuros no sentido de continuar a desenvolver as presentes temáticas.

Ao longo deste trabalho esteve sempre presente o processo de validação do método de determinação de fósforo total.

Inicialmente foi estudado comprimento de onda mais adequado para a análise dos padrões e amostras, bem como o intervalo de tempo no qual esta devia ser efectuada a leitura das mesmas. Deste modo e tal como vem referenciado na norma, foi possível demonstrar que o melhor comprimento de onda corresponde a 690 nm e em relação ao tempo de análise deve encontrar-se entre os 12 a 40 minutos, após a adição dos reagentes, apesar de se verificar uma pequena diminuição do sinal ao longo do tempo.

Verificou-se que a gama de trabalho escolhida (0,326 a 2,609 mg/L de fósforo) é adequada pois através do teste da homogeneidade de variâncias verificou-se que as variâncias dos limites da gama de trabalho não são significativamente diferentes.

Através da análise da curva de calibração procedeu-se à escolha do modelo de melhor ajuste polinomial (1º grau) e posteriormente verificou-se a inexistência de valores discrepantes (outliers), não sendo por isso necessário remover nenhum padrão da curva de calibração. A escolha do modelo de melhor ajuste polinomial permitiu também definir a sensibilidade do método em estudo, $0,773 \pm 0,023$ (mg⁻¹L).

Os limiares analíticos foram determinados através de três métodos: réplicas do branco, incerteza dos parâmetros da curva de calibração e incerteza na dispersão dos valores em torno da curva de calibração. Os diferentes resultados obtidos foram comparados estatisticamente através do teste *t*-emparelhado (muito generalista) e da ANOVA de factor único (mais específico). Em relação ao limite de detecção, o teste *t*-emparelhado apenas mostrou haver diferença significativa entre as estimativas do branco e do desvio padrão residual; o recurso à ferramenta estatística ANOVA permite concluir que o factor estimativa influi nos resultados obtidos, havendo apenas 1,5% de concordância dos resultados obtidos entre estimativas em relação aos ensaios. Quanto ao limite de quantificação, do teste *t*-emparelhado foi possível concluir a existência de diferença significativa entre todas as estimativas comparadas, bem como a ferramenta ANOVA que através dos resultados obtidos se conclui que o factor estimativa, tal como no caso do limite de detecção, também influi nos resultados obtidos,

havendo uma probabilidade de concordância dos resultados obtidos entre estimativas praticamente nula, $7,7 \times 10^{-4}\%$.

Quando se avaliou a precisão do método, pode-se também verificar a influência do factor dia nos resultados obtidos, bem como determinar a repetibilidade e ainda o limite de repetibilidade do mesmo. Como este estudo foi realizado em diferentes dias, os resultados obtidos da aplicação da ferramenta estatística ANOVA permitem concluir que o factor dia não influi de modo significativo nos resultados obtidos. Posteriormente, obteve-se uma repetibilidade de 0,020 e 0,032 para P_1 e P_7 , respectivamente, e um limite de repetibilidade de 0,023 e 0,036 para P_1 e P_7 , respectivamente, sendo este o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios obtidos em condições de repetibilidade, para um nível de confiança de 95%.

Para o estudo da exactidão procedeu-se à realização de ensaios de recuperação. Da comparação dos resultados obtidos com o valor de referência de 100%, através do teste *t*-student, concluiu-se que não existia diferença significativa entre o valor de referência e a estimativa central obtida experimentalmente, o que permite concluir que o método possui grande probabilidade em ser exacto.

Quanto à estabilidade da curva de calibração conclui-se que esta é estável durante um mês, uma vez que existe cerca de 43,3% de probabilidade de a curva de calibração ser estável durante este período.

A construção da carta de controlo de posições para a sensibilidade do método em estudo permite estabelecer e verificar visualmente as situações de não conformidade do processo. Segundo as situações de não conformidade possíveis para este tipo de carta, verificou-se que o processo se encontra conforme dentro das estimativas determinadas. Com recurso às estimativas de dispersão obtidas directamente do modelo de polinómio de 1º grau para cada uma das curvas, obteve-se um erro puramente aleatório de 0,025 associado à sensibilidade do método.

Futuramente seria necessário averiguar as causas da instabilidade do primeiro padrão da curva de calibração de 0,326 mg/L de fósforo em função de outros factores de modo a permitir uma análise mais correcta e exacta deste mesmo padrão. Seria igualmente interessante analisar outras vertentes da precisão como a reprodutibilidade e a precisão intermédia. O recurso a ensaios interlaboratoriais para complementar o estudo da exactidão seria bastante gratificante em termos de conteúdos, contudo o factor tempo não possibilitou a sua análise. O

estudo da robustez também seria bastante importante pois iria permitir assinalar os principais factores que ao sofrerem alteração iriam afectar de modo significativo o processo não levando à reprodução dos mesmos resultados ou até mesmo com o objectivo em otimizar este processo de análise, caso fosse necessário.

Importa também referir o sucesso do cumprimento dos principais objectivos propostos para este trabalho, resultado da motivação, empenho e dedicação a este projecto, que permitiram como referido nos objectivos adquirir um nível de conhecimento e desenvolvimento pessoal imperativo e indispensável no desenvolvimento de actividades futuras no mercado de trabalho.

Bibliografia

- [1] Juran, J. M., *A Qualidade desde o Projecto: os novos passos para o planeamento da qualidade em produtos e serviços*, Pioneira, 1990;
- [2] Oliveira, O., J., *Gestão da Qualidade: tópicos avançados*, Cengage Learning Editores, 2006;
- [3] NP EN ISO 9001 *Sistemas de Gestão da Qualidade – Requisitos*, 2008;
- [4] Almeida, J., Pires, Â. (Abr/Jun de 2006), *Acreditação: vantagens e dificuldades da implementação de um sistema da qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração*, Boletim SPQ, pp. 34-39;
- [5] NP EN ISO/IEC 17025 *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*, 2005;
- [6] Alley, E., R., *Water Quality Control Handbook*, McGraw-Hill Professional, 2000;
- [7] Smuskiewicz, A., J., *Properties of water*, Paw Prints, 2008;
- [8] Eaton, A., D., Clesceri, L., S., Rice, E., W., *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, Centennial Edition, 21ª Edição, 2005;
- [9] DL 236/98 de 1 de Agosto, Diário da República, I Série-A, Imprensa Nacional Casa da Moeda;
- [10] Skoog, D., A., Holler, F., J., Nieman, T., A., *Princípios de Análise Instrumental*, Bookman, 5ª Edição, 2002;
- [11] Lobinski, R., Marczenko, Z., *Recent Advances in Ultraviolet-Visible Spectrophotometry*, Crit. Rev. Anal. Chem., pp 1992, 23, 55-111;
- [12] Mendham, J., Thomas, M., J., K., Barnes, J., D., Denney, R., C., *Vogel – Análise Química Quantitativa*, Livros Técnicos e Científicos Editora, 2002;
- [13] Perkampus, H.,H., *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*, Springer-Verlag, 1992;
- [14] Harris, D., C., *Análise Química Quantitativa*, LTC, 6ª Edição, 2005;
- [15] Nisbet, R., Fletcher, E., Miner, G., *Handbook of Statistical Analysis and Data Mining Applications*, Elsevier Editora, 2009;

- [16] Samohyl, R., W., *Controle Estatístico de Qualidade*, Elsevier Editora, 2009;
- [17] Davis, M., Chase, R., B., Aquilano, N., J., *Fundamentos da Administração da Produção*, Bookman, 3ª Edição, 1999;
- [18] Montgomery, D., C., *Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade*, LTC, 2009;
- [19] Miller, J., C., Miller, J., N., *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, 1993;
- [20] Miller, J., C., Miller, J., N., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, 2000;
- [21] Costa, N., Oliveira, P., L., *Estatística*, Edgard Blucher Editora, 2ª Edição, 2002;
- [22] Kelly, W., D., *Basis Statistics for Laboratories*, Van Nostrand Reynolds, 1991;
- [23] Swartz, M., E., Krull, I., S., *Analytical Method Development and Validation*, Marcel Dekker, 2000;
- [24] Taylor, J., K., *Quality Assurance of Chemical Measurements*, CRC Press, 1997;
- [25] Relacre, “Guia 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química”, Relacre, 2000;
- [26] Leite, F., *Validação em Análise Química*, Editora Átomo, 1996;
- [27] ISO 8466 – 1, *Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*, 1990;
- [28] ISO 8466 – 2, *Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics, Part 2: Statistical strategy for non-linear second-order calibration functions*, 2001;

ANEXOS

A.1 – Tabelas Estatísticas

Tabela A1.1 – Valores críticos (G_{crit}) para o teste de Grubbs em função da dimensão da amostra (n) referentes ao nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).

n	$G_{critico}$	N	$G_{critico}$	n	$G_{critico}$
3	1,15	15	2,55	35	2,98
4	1,48	16	2,54	40	3,04
5	1,71	17	2,62	50	3,13
6	1,89	18	2,65	60	3,20
7	2,02	19	2,68	70	3,26
8	2,13	20	2,71	80	3,31
9	2,21	21	2,73	90	3,35
10	2,29	22	2,76	100	3,38
11	2,34	23	2,78	110	3,42
12	2,41	24	2,80	120	3,44
13	2,46	25	2,82	130	3,47
14	2,51	30	2,91	140	3,49

Tabela A1.2 – Valores críticos para o teste de Fisher unilateral ($\alpha=0,05$).

ν_1/ν_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	647,8	799,5	864,2	899,6	921,8	937,1	948,2	956,7	963,3	968,6	976,7	984,9	993,1
2	38,51	39,00	39,17	39,25	39,30	39,33	39,36	39,37	39,39	39,40	39,41	39,43	39,45
3	17,44	16,04	15,44	15,10	14,88	14,73	14,62	14,54	14,47	14,42	14,34	14,25	14,17
4	12,22	10,65	9,979	9,605	9,364	9,197	9,074	8,980	8,905	8,844	8,751	8,657	8,560
5	10,01	8,434	7,764	7,388	7,146	6,678	6,853	6,757	6,681	6,619	6,525	6,428	6,329
6	8,813	7,260	6,599	6,227	5,988	5,820	5,695	5,600	5,523	5,461	5,366	5,269	5,168
7	8,073	6,542	5,890	5,523	5,285	5,119	4,995	4,899	4,823	4,761	4,666	4,568	4,467
8	7,571	6,059	5,416	5,053	4,817	4,652	4,529	4,433	4,357	4,295	4,200	4,101	3,999
9	7,209	5,715	5,076	4,718	4,484	4,320	4,197	4,102	4,026	3,964	3,868	3,769	3,667
10	6,937	5,456	4,826	4,468	4,236	4,072	3,950	3,855	3,779	3,717	3,621	3,522	3,419
11	6,724	5,256	4,630	4,275	4,044	3,881	3,759	3,664	3,588	3,526	3,430	3,330	3,226
12	6,554	5,096	4,474	4,121	3,891	3,728	3,607	3,512	3,436	3,374	3,277	3,177	3,073
13	6,414	4,965	4,347	3,996	3,767	3,604	3,483	3,388	3,312	3,250	3,153	3,053	2,948
14	6,298	4,857	4,242	3,892	3,663	3,501	3,380	3,285	3,209	3,147	3,050	2,949	2,844
15	6,200	4,765	4,153	3,804	3,576	3,415	3,293	3,199	3,123	3,060	2,963	2,862	2,756
16	6,115	4,687	4,077	3,729	3,502	3,341	3,219	3,125	3,049	2,986	2,889	2,788	2,681
17	6,042	4,619	4,011	3,665	3,438	3,277	3,156	3,061	2,985	2,922	2,825	2,723	2,616
18	5,978	4,560	3,954	3,608	3,382	3,221	3,100	3,005	2,929	2,866	2,769	2,667	2,559
19	5,922	4,508	3,903	3,559	3,333	3,172	3,051	2,956	2,880	2,817	2,720	2,617	2,509
20	2,571	4,461	3,859	3,515	3,289	3,128	3,007	2,913	2,837	2,774	2,676	2,573	2,464

A.2 – Procedimento para a Determinação de Fósforo Total

i. Objectivo e campo de aplicação

O presente procedimento experimental especifica um método de espectrofotometria de absorção molecular para a determinação de fósforo total, aplicando-se a águas residuais.

ii. Resumo

Todos os tipos de fosfatos são hidrolisados a ortofosfatos através de uma digestão oxidativa com persulfato.

Depois de hidrolisados, determina-se por espectrofotometria de absorção molecular a concentração da amostra através do método de cloreto de estanho (II), onde o ácido molíbdofosfórico formado é reduzido pelo cloreto de estanho (II) presente em solução, dando origem ao complexo azul de molibidénio.

iii. Reagentes

- Solução de ácido sulfúrico: cuidadosamente, adicionar 30 mL de ácido sulfúrico concentrado a aproximadamente 60 mL de água ultra-pura e completar o volume com água ultra-pura;
- Solução aquosa de indicador de fenolftaleína, 10%;
- Persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$);
- Solução de hidróxido de sódio, 5M: dissolver 100 g de hidróxido de sódio em água ultra-pura; transferir para um balão de 500 mL e completar o volume do balão com água ultra-pura;
- Reagente de molibdato de amónio $[(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot H_2O]$: dissolver 12,5 g de molibdato de amónio em 87,5 mL de água ultra-pura; cautelosamente, adicionar 140 mL de ácido sulfúrico concentrado a 200 mL de água; finalmente deixa-se arrefecer e mistura-se as duas soluções anteriores num balão de 500 mL e perfazer o volume com água ultra-pura;
- Reagente de cloreto de estanho (II) ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$): dissolver 2,5 g de cloreto de estanho (II) em 100 mL de glicerol ($C_3H_8O_3$) e perfazer o volume com água ultra-pura;

- Solução comercial de fosfatos, 1000 mg/L.

iv. Material

- Espectrofotómetro UV-Visível (UV-1800 Shimadzu);
- Autoclave (JSM-0932);
- Material de vidro de uso corrente em laboratório.

v. Preparação da curva de calibração

- Solução comercial de fosfatos, 1000 mg/L;
- Solução intermédia A de fosfatos, 100 mg/L PO_4^{3-} (32,6 mg/L P): pipetar 5 mL da solução comercial de fosfatos para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada;
- Soluções-Padrão de calibração: a partir da solução intermédia A de fosfatos, pipetar os volumes definidos na tabela (A.2.1) para balões volumétricos de 50 mL e completar o volume com água ultra-pura;

Tabela A.2.1 – Tabela de preparação dos padrões da curva de calibração do método de fósforo total.

Padrões PO_4^{3-} (mg/L)	Padrões P (mg/L)	Volume de Solução-Padrão (mL)
1,000	0,326	1,000
2,000	0,652	2,000
3,100	1,000	3,100
4,000	1,304	4,000
5,000	1,631	5,000
6,000	1,956	6,000
8,000	2,609	8,000

iv. Preparação dos padrões de calibração

- Solução comercial de fosfatos, 1000 mg/L;
- Solução intermédia B de fosfatos, 100 mg/L PO_4^{3-} (32,6 mg/L P): pipetar 5 mL da solução comercial de fosfatos para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada;

- c) Soluções-Padrão de calibração: a partir da solução intermédia A de fosfatos, pipetar os volumes definidos na tabela (A.2.2) para balões volumétricos de 50 mL e completar o volume com água ultra-pura;

Tabela A.2.2 – Tabela de preparação dos padrões de controlo do método de fósforo total.

Padrões PO₄³⁻ (mg/L)	Padrões P (mg/L)	Volume de Solução-Padrão (mL)
3,100	1,000	3,100
8,000	2,609	8,000

v. Preparação das amostras, branco e padrões

1. Transferir o volume dos padrões para os frascos de shott de 250 mL;
2. Pipetar 50 mL de água destilada para a preparação do ensaio em branco e 50 mL de amostra a analisar, também para frascos de shott;
3. Adicionar uma gota da solução aquosa de fenolftaleína e caso a solução fique vermelha, deve-se adicionar algumas gotas da solução de ácido sulfúrico até ao seu desaparecimento;
4. Adicionar 1 mL da solução de ácido sulfúrico, 0,5 g de persulfato de potássio e levar ao autoclave durante 60 minutos a 120°C;
5. Deixar arrefecer lentamente à temperatura ambiente, adicionar uma ou duas gotas da solução aquosa de fenolftaleína e neutralizar com a solução de hidróxido de sódio, até ao aparecimento de uma cor rosada permanente;
6. Transferir para balões volumétricos de 100 mL e perfazer o volume com água destilada;

vi. Preparação da amostra reforçada

1. Para um balão volumétrico de 50 mL pipetar 3,100 mL da solução do padrão de controlo de 32,6 mg/L P e completar o volume do balão com a amostra;
2. Proceder de igual modo como para a preparação das amostras, branco e padrões (ponto v).

vii. Determinação espectrofotométrica

1. Adicionar 4 mL do reagente de molibdato de amônio e 0,5 mL de cloreto de estanho (II);
2. Agitar imediatamente e ler após 10 minutos e antes de 12 minutos;
3. Fazer auto-zero com água ultra-pura;
4. Medir a absorvância das soluções a 690 nm utilizando uma célula de quartzo.