



Vânia Cristina Maia Ribeiro

CONTROLO DA QUALIDADE E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS – DA TEORIA À PRÁTICA

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Vânia Cristina Maia Ribeiro

CONTROLO DA QUALIDADE E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS – DA TEORIA À PRÁTICA

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química, Área de
especialização em Controlo de Qualidade e Ambiente**

Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro

Engenheiro Alain Lopes da Costa

Junho de 2015

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Este relatório de estágio não poderia ter sido efetuado sem a ajuda e apoio de algumas pessoas a quem quero agradecer.

À minha orientadora de estágio do Departamento de Química, Doutora Ana Cristina Ribeiro por ter aceite este desafio, pela amizade e compreensão que sempre demonstrou, por todos os conhecimentos e orientação científica e por todo o apoio e disponibilidade demonstrada o longo destes três anos como minha orientadora.

À Direção da ÆMITEQ pela autorização concedida para poder efetuar o estágio curricular.

Ao meu orientador da ÆMITEQ Alain Costa queria agradecer pela paciência, pela disponibilidade, por todos os ensinamentos, pelo acompanhamento e interesse no meu trabalho, por tudo o que me ensinou, pelo companheirismo, por todos os momentos passados no laboratório e por toda a amizade. Queria também agradecer à Clarisse Araújo, que também me acompanhou durante um período do estágio, por tudo o que me ensinou, pela paciência e disponibilidade e pela sua amizade.

A todos os colaboradores da ÆMITEQ um enorme obrigado por todos os ensinamentos, paciência, apoio, pela amizade e por todos os momentos de descontração e diversão que foram proporcionados.

Ao Dr. Luís Veríssimo pela amizade, por todo o apoio, disponibilidade e força que sempre me transmitiu.

Queria agradecer a todas as pessoas e a todos os meus amigos que, de algum modo, me ajudaram ao longo do meu percurso académico, pela amizade e companheirismo.

Nestes seis anos que passaram de vida académica, todos passámos por mil e uma histórias, desde praxe, serenatas, brincadeiras, festas, jantares, aulas, exames, desilusões, tristezas e alegrias. Consequência de todos os momentos de companheirismo, todas as vivências, todas as dificuldades, académicas ou pessoais, vencidas em conjunto posso afirmar que chego ao fim com uma enorme alegria. Acima de tudo todos nós crescemos, tanto ao nível académico como pessoal e tenho a certeza que “segredos desta cidade, levo comigo prá vida”. E, por isso, tenho de fazer um agradecimento muito especial a todos os meus amigos de curso, que partilharam estes momentos comigo todos estes anos e aos quais eu garanto que nunca esquecerei.

Por último, não sendo menos importante, queria agradecer aos meus pais e irmão, bem como ao resto da minha família, que sempre me apoiaram e incentivaram ao longo destes anos, por sempre acreditarem em mim, pelas palavras nos momentos mais difíceis, pela confiança que em mim depositaram, bem como pelo esforço que fizeram para me fazer chegar até aqui.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Índice.....	iv
Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	xii
Abstract	xiii
1. Introdução.....	1
1.1 Contextualização e enquadramento histórico.....	1
1.2 Legislação/Regime jurídico	2
1.3 Acreditação/Documentos normativos.....	4
2. Fundamentação	6
2.1 Tratamento de resultados	6
2.1.1 Testes estatísticos	6
2.1.2 Nível de confiança e nível de significância	6
2.1.3 Procedimento	7
2.1.4 Testes baseados nas distribuições estatísticas.....	8
2.1.5 Outros testes.....	10
2.1.6 Curva de calibração	12
2.1.7 Escolha do modelo	13
2.1.8 Verificação de valores discrepantes do modelo	13
2.2 Validação de métodos analíticos	14
2.2.1 Identificação.....	15
2.2.2 Especificidade e Seletividade.....	16
2.2.3 Sensibilidade	16
2.2.4 Limiares analíticos	16
2.2.5 Linearidade e gama analítica	18
2.2.5.1 Linearidade.....	19
2.2.5.2 Gama de trabalho	20
2.2.6 Precisão	21
2.2.6.1 Repetibilidade.....	22
2.2.6.2 Reprodutibilidade.....	23
2.2.6.3 Precisão intermédia.....	24
2.2.7 Exatidão	24
2.2.7.1 Material de Referência Certificado.....	25
2.2.7.2 Ensaio interlaboratoriais.....	26
2.2.7.3 Testes Comparativos	27
2.2.8 Robustez.....	28
2.2.9 Coerência.....	28
2.3 Estimativa da incerteza	28
2.4 Controlo da qualidade em análises químicas	33
2.4.1 Controlo da qualidade interno.....	34

2.4.1.1	Calibração analítica.....	34
2.4.1.2	Branco.....	35
2.4.1.3	Limiar analítico.....	35
2.4.1.4	Padrões de controlo.....	35
2.4.1.5	Duplicados.....	35
2.4.1.6	Ensaio de recuperação.....	36
2.4.1.7	Cartas de controlo.....	37
2.4.2	Controlo da qualidade externo.....	38
3.	Experimental.....	40
3.1	Cromatografia.....	40
3.1.1	Cromatografia Gasosa.....	42
3.1.1.1	Cromatografia Gasosa associada a detetor MS/MS.....	44
3.1.1.1.1	Análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) por GC-MS.....	45
3.1.1.1.1.1	Interferências.....	47
3.1.1.1.2	Análise de pesticidas por GC-MS/MS.....	47
3.1.1.1.2.1	Interferências.....	49
3.1.1.2	Cromatografia Gasosa associada a detetor de captura de eletrões.....	50
3.1.1.2.1	Análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) por GC-ECD.....	50
3.1.1.2.1.1	Interferências.....	51
3.1.1.3	Cromatografia Gasosa associada ao detetor de ionização por chama (FID).....	52
3.1.1.3.1	Análise elementar - carbono orgânico total (TOC).....	52
3.1.1.3.1.1	Interferências.....	53
3.1.2.	Cromatografia Líquida.....	53
3.1.2.1	Cromatografia líquida de elevada eficiência com detetor DAD.....	54
3.1.2.1.1	Análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) por HPLC-DAD.....	56
3.1.2.1.1.1	Interferências.....	57
3.1.2.1.2	Análise de pesticidas derivados de ureias por HPLC-DAD.....	57
3.1.2.1.2.1	Interferências.....	58
3.1.2.1.3	Análise de herbicidas ácidos por HPLC-DAD.....	59
3.1.2.1.3.1	Interferências.....	59
3.1.2.2	Cromatografia Iónica.....	60
3.1.2.2.1	Análise de aniões por cromatografia iónica.....	60
3.1.2.2.1.1	Interferências.....	61
3.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	61
4.	Resultados e Discussão.....	66
4.1	Revalidação do método analítico de determinação de PAH em águas por HPLC-DAD.....	66
4.1.1	Identificação.....	67
4.1.2	Repetibilidade do sistema cromatográfico.....	67
4.1.3	Especificidade e Seletividade.....	70
4.1.4	Sensibilidade.....	72
4.1.5	Limites analíticos.....	74
4.1.5.1	Limite de quantificação.....	74

4.1.5.1 Limite de detecção.....	77
4.1.6 Linearidade e gama analítica	77
4.1.6.1 Linearidade – Teste de Mandel	77
4.1.6.2 Teste da homogeneidade das variâncias	79
4.1.7 Precisão	81
4.1.7.1 Repetibilidade.....	82
4.1.7.2 Reprodutibilidade.....	82
4.1.8 Exatidão	83
4.1.8.1 Testes de recuperação.....	83
4.1.8.2 Ensaio interlaboratoriais.....	84
4.1.9 Robustez.....	85
4.1.10 Coerência	85
4.2 Revalidação do método analítico de análise de compostos orgânicos voláteis em águas por GC-MS.....	86
4.2.1 Identificação.....	86
4.2.2 Repetibilidade do sistema cromatográfico	88
4.2.3 Especificidade e Seletividade.....	89
4.2.4 Sensibilidade	90
4.2.5 Limiares analíticos	91
4.2.5.1 Limite de quantificação.....	91
4.2.5.2 Limite de detecção	93
4.2.6 Linearidade e gama analítica	93
4.2.6.1 Linearidade – Teste de Mandel.....	93
4.2.6.2 Teste da homogeneidade das variâncias.....	94
4.2.7 Precisão	95
4.2.7.1 Repetibilidade.....	96
4.2.7.2 Reprodutibilidade.....	98
4.2.8 Exatidão	99
4.2.8.1 Testes de recuperação	99
4.2.8.2 Ensaio interlaboratoriais.....	100
4.2.9 Robustez.....	100
4.2.10 Coerência	101
4.3 Implementação do método analítico de análise de trihalometanos em águas por GC-MS	101
4.3.1 Identificação.....	102
4.3.1 Linearidade – Teste de Mandel.....	104
Conclusão	106
Bibliografia.....	107
Apêndice A	110

Abreviaturas

% - percentagem

% RE - erro relativo expresso em percentage (do Inglês, *relative error*)

% Rec - taxa de recuperação

\bar{R}_m - recuperação média do método

\bar{c}_{obs} - concentração média das análises do MRC

\bar{x}_{pc} - média experimental dos ensaios do padrão de controlo

$\Delta\sigma_{fit}^2$ (ou Varfit) - variância do ajuste

$F_{0,01(1;\nu_2)}^u$ - valor teste F unilateral com um nível de confiança de 0,01 para 1 e ν_2 graus de liberdade

\bar{R} - amplitude média relativa

$S_{y^2}^2$ - desvio padrão residual da curva de calibração não linear

S_{Li}^2 - variância interlaboratorial

S_{Ri}^2 - variância da reprodutibilidade

S_{ri}^2 - variância da repetibilidade

$S_{y/x}^2$ - desvio padrão residual da curva de calibração linear

$S_{máx}^2$ - variância máxima

$t_{(n-1,1-\alpha)}^u$ - valor de teste *t-student* unilateral, para n-1 graus de liberdade ao nível de confiança 1- α

$t_{0,05(m-1)}^u$ - valor teste *t-Student* com um nível de confiança de 0,05 e com (m-1) graus de liberdade

$t_{\alpha(n-1)}^b$ - teste *t-student* bilateral ao nível de confiança α com n-1 graus de liberdade

σ_T^2 - variância total

σ_o^2 - contribuição puramente aleatória da variabilidade total

μ - valor obtido pelo método de análise

1,2-DCE - 1,2-Dicloroetano

1- α - nível de confiança

2,4-D - ácido diclorofenoxiacético

ADN - ácido desoxirribonucleico

BaP - benzo(a)pireno

Bbf - benzo(b)fluoranteno

BDCM - bromodiclorometano

BghiP - benzo(g,h,i)perileno

Bkf - benzo(k)fluoranteno

CE - Comissão Europeia

C_i - ionização química (do Inglês, *chemical ionization*)

c_{MRC} - valor certificado do MRC

CO₂ - dióxido de carbon

CQ - controlo de qualidade
CQE - controlo de qualidade externo
CQI - controlo de qualidade interno
CV- coeficiente de variação
CV_r - coeficiente de variação de repetibilidade
CV_R - coeficiente de variação de reprodutibilidade
d.d.p. - diferença de potencial
D.L. - Decreto-Lei
DAD - detetor de fotodíodos (do Inglês, *Diode-Array Detection*)
DBCM - dibromoclorometano
DEA - desetilatrizona
DET - desetilterbutilazina
DR - diferença relativa
DRC001 - Regulamento geral de acreditação
DS² - diferença das variâncias
EA - Cooperação europeia para acreditação (do Inglês, *European Co-operation for Accreditation*)
ECD - detetor de captura eletrónica (do Inglês, *electron capture detector*)
E_i - impacto eletrónico (do Inglês, *electron ionization*)
EIL - ensaios interlaboratoriais
EM - radiação eletromagnética (do Inglês, *electromagnetic radiation*)
E_n - erro normalizado
EPA - *Environmental Protection Agency*
ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
ETA - Estação de tratamento de águas
ETAR - Estação de tratamento de águas residuais
eV- eletrão volt
F - teste de *Fischer*
F_{crít} - valor tabelado (crítico) da distribuição *F* de *Snedecor / Fisher*
FID - detetor de ionização por chama (do Inglês, *flame ionization detector*)
FTIR - espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (do Inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*)
GC - cromatografia gasosa (do Inglês, *gas chromatography*)
GC-ECD - cromatografia gasosa associada a detetor de captura eletrónica (do Inglês, *gas chromatography—electron capture detector*)
GC-MS - cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (do Inglês, *gas chromatography—mass spectrometry*)
GC-MS/MS - cromatografia gasosa com tandem de espectrometria de massa (do Inglês, *gas chromatography—mass spectrometry/mass spectrometry*)

GQ - garantia da qualidade
H₀ - hipótese nula
H₁ - hipótese alternativa
HCB - hexaclorobenzeno
HCl - ácido clorídrico
HPLC - cromatografia líquida de elevada eficiência (do Inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)
HT - hidrocarbonetos totais
IAF - Fórum internacional de acreditação (do Inglês, *International Accreditation Forum*)
IcdP - indeno(1,2,3-cd)pireno
ICH - Conferência Internacional sobre Harmonização (do Inglês, *International Conference of Harmonization*)
ILAC - Cooperação internacional de acreditação de laboratórios (do Inglês, *International Laboratory Accreditation Cooperation*)
IPAC - Instituto Português de Acreditação
IRAR - Instituto Regulador de Águas e Resíduos
IRMM – *Institute for Reference Materials and Measurements*
ISO – *International Standard Organization*
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do Inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*)
IV - infravermelho
K – fator de expansão
KBr - brometo de potássio
LC - cromatografia líquida (do Inglês, *liquid chromatography*)
LD - limite de detecção
LGC – *Laboratory of the Government Chemist*
LQ - limite de quantificação
m - sensibilidade ou declive da reta
m/z - razão massa carga
MCPA - ácido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético
MRC- material de referência certificado
MRI - materiais de referência internos
MS - espectrometria de massa (do Inglês, *mass spectrometry*)
Ndf (ou v) - graus de liberdade
NiO - óxido de níquel
NIST - *National Institute of Standards and Technology*
Norma ISO 5725-2 - *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*
Norma ISO 5725-3 - *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results -- Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method*

Norma ISO 5725-6 - *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values*

Norma 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*

Norma 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*

Norma ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais de competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração
OG - óleos e gorduras

OGC010 – Avaliação da incerteza de medição em calibração

ONA - Organização Nacional de Acreditação

$p[H_0]$ - valor prova da hipótese nula

$p[H_1]$ - valor prova da hipótese alternativa

P01 - polinómio de primeiro grau

P012 - polinómio de segundo grau

PAH - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (do Inglês, *Polycyclic aromatic hydrocarbon*)

PCIE - perfil de corrente iónica extraída

PDMS - polidimetilsiloxano

r - coeficiente de correlação

r^2 - coeficiente de determinação

RMS_{justeza/medição} – valor médio quadrático da componente da justeza da medição na incerteza (do Inglês, *root mean square*)

RSD - desvio padrão relativo (do Inglês, *Relative Standard Deviation*)

s - desvio padrão

SG - sistema de gestão da qualidade

s_I - precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial

SIM - monitorização seletiva de iões (do Inglês, *selective ion monitoring*)

s_{obs} - desvio padrão das análises do MRC

$s_{padrão\ controlo}$ - desvio padrão dos ensaios do padrão de controlo

SPME - microextração em fase sólida (do Inglês, *solid phase microextraction*)

$s_{precisão}$ - desvio padrão relativo da precisão intermédia

s_r - repetibilidade

s_R - reprodutibilidade

s_{ri} - desvio padrão da repetibilidade

s_{RI} – desvio padrão da reprodutibilidade

SS - soma de quadrados

SS - soma dos quadrados

SS_A - dispersão resultante do efeito em causa

SS_T - dispersão interna ou puramente aleatória

$S_{y/x}$ - desvio padrão residual da curva de calibração linear
TetraCE - tetracloroetileno
THM - trihalometanos
TIC - corrente iônica total (do Inglês, *total ion current*)
TOC - carbono orgânico total (do Inglês, *total organic carbon*)
TOF - analisador do tempo de voo (do Inglês, *time-of-flight*)
 t_r - tempo de retenção
TriCE - tricloroetileno
TV – valor teste (do Inglês, *test value*)
 $u_{(c2MRC)}$ - incerteza padrão associada à quantidade certificada de MRC
 $u(x)$ - incerteza (do Inglês, *uncertainty*)
U.E. - União Europeia
 U_c -incerteza combinada
 $U_{\text{fidelidade}}$ - componente da fidelidade na incerteza
 U -incerteza expandida
 $U_{\text{justeza/medição}}$ – componente da justeza da medição na incerteza
 U_{lab} - incerteza do resultado obtido pelo laboratório
 U_{ref} - incerteza associada ao valor de referência
USP - *United States Pharmacopeia*
UV/VIS - ultravioleta/visível
VMA - valor máximo admissível
VMR - valor máximo recomendado
VOC – compostos orgânicos voláteis (do Inglês, *volatile organic compounds*)
VP - valor paramétrico
 X_{lab} - valor obtido pelo Laboratório (ensaio interlaboratorial)
 X_v - valor aceite como verdadeiro (ensaio interlaboratorial)
 α - nível de significância
 Δ - erro absoluto
 Δr - limite de repetibilidade
 ΔR - limite de reprodutibilidade
 ΔSS - diferença entre a soma de quadrados
 Δv - diferença entre os graus de liberdade
 ζ - valor de referência convencionalmente aceite como verdadeiro
 χ^2 – teste qui-quadrado

Resumo

O presente relatório de estágio foi realizado no âmbito da unidade curricular “Projeto Científico ou Projeto Industrial” do Mestrado em Química, especialização em Controlo da Qualidade e Ambiente. Este estágio realizou-se na ÆMITEQ - Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, uma Instituição privada de utilidade pública, cujo objetivo consiste no apoio à indústria e à comunidade no domínio da química, especializada em controlo químico da qualidade.

O estágio consistiu fundamentalmente na aquisição de conhecimentos relativos à validação de métodos cromatográficos, no contexto das atividades do Laboratório de Cromatografia da ÆMITEQ.

Numa primeira fase foi feito o enquadramento nas atividades do laboratório relacionadas e necessárias à realização de ensaios, nomeadamente: documentação, gestão de amostras, gestão de equipamento, entre outras.

Seguidamente, foi efetuada a familiarização com as técnicas analíticas, através da realização de ensaios fora do âmbito da acreditação com o equipamento de análise FTIR.

No âmbito da acreditação do laboratório, realizaram-se os seguintes ensaios: determinação de trihalometanos e de solventes clorados em águas por GC-ECD, determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em águas por HPLC-DAD, determinação de pesticidas derivados de ureia em águas por HPLC-DAD, determinação de herbicidas ácidos em águas por HPLC-DAD, determinação de aniões em águas e efluentes líquidos por cromatografia iónica, determinação de pesticidas em águas por GC-MS/MS, determinação de compostos orgânicos voláteis em águas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa GC-MS e análise de carbono orgânico total e carbono dissolvido em águas.

Efetuiu-se, ainda, a revalidação de alguns métodos acreditados, de acordo com as metodologias de validação do laboratório de cromatografia e a sistematização de dados de validação e controlo da qualidade.

Abstract

This internship report was carried out within the course "Scientific Design or Industrial Design" of the Chemistry Master, specialization in Quality and Environmental Control. This stage was held in ÆMITEQ - Association for Technological Innovation and Quality, a private institution of public utility, whose aim is to support the industry and the community in the field of chemistry, specializing in chemical quality control.

The stage consisted mainly in acquiring knowledge concerning the validation of chromatographic methods in the context of Chromatography Lab activities ÆMITEQ.

In the first phase was done in the framework laboratory activities related and necessary to carry out tests, such as: documentation, sample management, equipment management, among others.

It was then carried familiarity with the analytical techniques, by conducting tests outside the scope of accreditation with the FTIR analysis equipment.

Under the laboratory accreditation were conducted the following tests: determination of trihalomethanes and chlorinated solvents in water by GC-ECD, determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in water by HPLC-DAD, determination of urea derivatives pesticides in water by HPLC-DAD, determination of acid herbicides in waters HPLC-DAD, determination of anions in liquid water and effluent by ion chromatography, determination of pesticides in water by GC-MS/MS, determination of volatile organic compounds in water by gas chromatography coupled mass spectrometry GC-MS analysis of mass and total organic carbon and carbon dissolved in water.

Held also the revalidation of some accredited methods, according to chromatography laboratory validation methodologies and systematization of validation and quality control data.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Contextualização e enquadramento histórico

A água, substância essencial à vida, trata-se de um recurso precioso que a Terra fornece ao Homem. Encontra-se, maioritariamente, nos oceanos e sob a forma de gelo nos glaciares polares. Por isso, apenas uma fração muito pequena de água está diretamente disponível para a humanidade. Sendo o corpo humano essencialmente constituído por água (75% - 80%) e, tendo em conta os diversos processos metabólicos em que a água participa, é recomendada a ingestão de cerca de dois litros de água por dia a cada pessoa [1].

No início do século XX, após ter sido descoberta a natureza das doenças infecciosas, assim como a capacidade da água para transmitir doenças (cólera e febre tifóide), desenvolveram-se meios técnicos e legais para a desinfeção da água em sistemas públicos de abastecimento. Até então, a qualidade da água para consumo humano era avaliada através das suas características organoléticas, baseada no senso comum de que esta se apresentasse límpida, inodora e agradável ao paladar. Contudo, esta avaliação foi-se tornando inviável para a proteção da saúde pública contra microrganismos patogénicos e contra substâncias químicas perigosas presentes na água. Tornou-se, então, necessário estabelecer normas paramétricas que exprimissem, de modo objetivo, as características a que deve obedecer uma água destinada ao consumo humano [2, 3].

Desde a revolução industrial, com as constantes agressões ao planeta Terra, o ecossistema aquático acaba por ser o que suporta maior pressão, uma vez que se trata de um recetor de poluentes. Os meios hídricos naturais, principalmente rios, são constantemente utilizados como meio recetor e como agente de transporte de efluentes domésticos e industriais, bem como de escorrências de terrenos agrícolas e de estradas. O consumo excessivo de água, a sua contaminação e ainda alguma negligência e carência de planeamento da mesma, pode ter inúmeras consequências para a saúde das populações e para o equilíbrio dos ecossistemas, podendo levar à sua escassez. Deste modo, é importante garantir a qualidade da água para consumo humano, gerir de modo adequado os recursos hídricos terrestres, manter os reservatórios naturais de água e salvaguardar a sua pureza [2].

De modo a controlar a qualidade da água, existe um quadro legal que estabelece os parâmetros e respetivas análises a efetuar para avaliar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, assim como os respetivos valores paramétricos. O controlo da qualidade da água destinada ao consumo humano implica que exista um controlo contínuo da qualidade através de análises de rotina que verificam se o tratamento e distribuição estão em conformidade com os objetivos e regulamentos propostos, bem como uma monitorização periódica dos parâmetros

microbiológicos em todo o sistema de abastecimento da água. Estas análises devem ser realizadas periodicamente em laboratórios especializados e acreditados com profissionais habilitados na área. Devem, também, incluir vários parâmetros selecionados de acordo com o objetivo do estudo, do fim a que se destina a água e da legislação em vigor, de modo a prevenir danos para o Homem e para o ambiente [4].

A Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, ÆMITEQ, desenvolve atividades de apoio técnico no domínio da química desde 1991, especializando-se em controlo químico da qualidade, sediado em Coimbra, onde exerce as suas atividades desde 1994. A ÆMITEQ é um laboratório acreditado de análises de águas tendo como missão contribuir para a melhoria da qualidade da água nos sistemas de abastecimento público e privado, sendo os seus resultados avaliados pela participação contínua em diversos programas de ensaios interlaboratoriais, nacionais e internacionais. Acresce, ainda, o apoio às autarquias e empresas municipais nas áreas do controlo da qualidade de águas de consumo, águas residuais, águas para recreio e suporte ao funcionamento das estações de tratamento de água (ETA) e de estações de tratamento de águas residuais (ETAR).

1.2 Legislação/Regime jurídico

Dada a importância da água e, não sendo esta um recurso inesgotável, é necessário fazer um esforço para que a sua qualidade esteja isenta de riscos. Como tal, existem várias diretivas alusivas à análise e proteção dos recursos hídricos [5].

Os estados membros da União Europeia (U.E.) estabeleceram programas de controlo de modo a averiguar se a água para consumo humano cumpre os requisitos da lei em vigor. Esses programas de controlo devem ser adequados às necessidades locais e cumprir os requisitos mínimos de controlo estabelecidos.

Na comunidade europeia destaca-se a Diretiva nº 98/83/CE de 3 de Novembro, que revogou a primeira diretiva europeia referente à qualidade da água publicada em 1980 (Diretiva 80/778/CE) e encontra-se, atualmente, em vigor. Foi transposta para direito interno pelo Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto e estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas em função dos seus principais usos e estabelece os valores máximos recomendados (VMR) e os valores máximos admissíveis (VMA) para cada parâmetro nos diferentes tipos de água. Este Decreto-Lei foi revogado pelo D.L. nº 243/2001 de 5 de Setembro em muitos aspetos de qualidade [6].

O documento jurídico que atualmente legisla a qualidade da água para consumo humano, a nível nacional, é o D.L. nº 306/2007 de 27 de Agosto, que resultou da revisão do D.L. nº 243/2001 de 5 de Setembro. Este define os requisitos legais da qualidade da água destinada ao consumo humano, visando proteger a saúde humana dos efeitos nocivos provenientes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal da sua

composição, bem como as obrigações relativas à garantia dos parâmetros da qualidade da água disponibilizada. Estabelece, ainda, os critérios de repartição de responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, quando a mesma seja partilhada por duas ou mais entidades gestoras [5].

Com o intuito de regular a qualidade da água foi criada uma autoridade competente, o Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), atualmente designado por Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR). Trata-se de uma entidade reguladora dos serviços de abastecimento público de água, saneamento de águas residuais e de gestão de resíduos urbanos. Este D.L. introduziu também o valor paramétrico (VP), designação que substitui o VMA e o VMR que constavam como o valor máximo ou mínimo fixado para cada um dos parâmetros a controlar [5-7].

Os valores paramétricos são classificados como parâmetros obrigatórios ou como parâmetros indicadores. Dentro dos VP obrigatórios incluem-se os parâmetros químicos e microbiológicos, para os quais os valores dos resultados das análises não podem ultrapassar os valores indicados no D.L. em vigor. No caso dos parâmetros indicadores, o VP pode ser considerado apenas como um valor de referência. A amostra satisfaz os requisitos de qualidade quando o resultado da análise se enquadra nos valores paramétricos fixados para o tipo de água em causa. Sempre que os resultados não sejam conformes, são tomadas medidas e informa-se a autoridade competente (ERSAR), tendo esta de definir um plano com o objetivo de ultrapassar o incumprimento.

O controlo da qualidade da água da rede de abastecimento, efetua-se de acordo com o mencionado no anexo II do D.L. n.º 306/2007, tendo como objetivo definir os controlos de rotina e de inspeção, assim como a frequência mínima de amostragem para a análise de água destinada ao consumo humano fornecida por sistemas de abastecimento público, redes de distribuição, fontanários, camiões ou navios-cisterna, utilizada em empresas de indústria alimentar e à venda em garrafas e outros recipientes [5].

Na prática, a garantia da qualidade da água para abastecimento público baseia-se na deteção de constituintes microbiológicos, físicos, químicos e radiológicos, potencialmente perigosos para a saúde humana, através da análise de conformidade dos resultados obtidos na monitorização da qualidade da água fornecida aos consumidores com os valores paramétricos estipulados nas normas legalmente estabelecidas.

De modo a reduzir e prevenir a poluição deve haver proteção da origem, manutenção e conservação da rede de distribuição, controlo sanitário, tratamento de forma a adaptar às características da água na origem e vigilância permanente da exploração do sistema [7].

Os ensaios conducentes à verificação do cumprimento da legislação devem ser preferencialmente realizados por laboratórios acreditados para o efeito, devendo nos restantes casos ser realizados por laboratórios que mantenham um sistema de controlo de qualidade analítica devidamente documentado e atualizado.

1.3 Acreditação/Documentos normativos

A certificação é o processo através do qual uma entidade certificadora concede um certificado de que um produto, um processo e/ou um serviço está em conformidade com as respetivas exigências específicas. A certificação obriga a empresa a organizar-se, tem maior eficiência, respeita regras internacionais sobre a garantia da qualidade, garante qualidade (satisfação) ao cliente, permite selecionar fornecedores, evidencia qualidade perante a concorrência, é auditada por entidades especializadas, promove a satisfação dos empregados, reduz as auditorias dos clientes, reduz os custos da não qualidade, reduz desperdícios, entre outros [8].

A acreditação trata-se do reconhecimento formal, por parte de um organismo de acreditação, de que um laboratório, um organismo de certificação e/ou organismo de inspeção cumpre os requisitos previamente definidos e demonstra ser competente para realizar as suas atividades com confiança. Um laboratório acreditado possui recursos humanos, instalações, equipamentos, métodos, procedimentos laboratoriais necessários para proporcionar resultados que cumprem os requisitos dos clientes e os requisitos de boas práticas aplicáveis. A acreditação apresenta algumas dificuldades, tais como: imensa documentação a tratar, ocupação elevada de recursos, requer pessoal qualificado, tem custos elevados e necessita de auditorias. Contudo, apresenta uma maior organização, menor desperdício, melhor conhecimento das falhas e constrangimentos, estratégia e ferramentas para a melhoria contínua e garante a qualidade [9, 10].

O IPAC é o organismo que em Portugal responde ao Regulamento (CE) nº 765/2008, o qual contém diversas disposições quer para o país, quer para o IPAC, tendo sido notificado em conformidade pelo Governo à Comissão Europeia e à Cooperação europeia para acreditação (EA).

Uma vez que a acreditação é feita segundo metodologias harmonizadas em todo o mundo, existem Acordos de Reconhecimento Mútuo (EA & IAF & ILAC) entre os organismos de acreditação, facilitando a livre circulação de bens e serviços abrangidos pelas acreditações. A acreditação é uma ferramenta de globalização e internacionalização da economia, promovendo as exportações nacionais. O IPAC atua sob a supervisão do Ministro responsável pela Economia, embora a sua área de intervenção abranja praticamente todos os sectores de governmentação. Serve para ganhar e transmitir confiança na execução de determinadas atividades técnicas, ao confirmar a existência de um nível de competência técnica mínima, reconhecida internacionalmente [10].

O processo de acreditação é descrito no Regulamento Geral de Acreditação (DRC001) e divide-se em 3 fases: a fase de registo, a fase contratual/preliminar e a fase de avaliação. Na fase de registo é atribuído um número de registo a um laboratório que pretende ser acreditado. O laboratório deve apresentar uma candidatura completa, devidamente preenchida e enviar ao IPAC os formulários correspondentes à atividade técnica que pretende desempenhar. Na fase contratual/preliminar, a candidatura é analisada pelo IPAC para verificar se está completa e se pode ser dada sequência ao processo. Durante a fase de avaliação o IPAC nomeia a equipa avaliadora, a qual estuda a documentação e procede à avaliação, informando o laboratório da data da auditoria e dos membros

da equipa auditora. As decisões tomadas pela Comissão de Decisão baseiam-se no estudo dos relatórios, nas opiniões da equipa auditora e na análise das ações corretivas. Seguidamente, é emitido um relatório que identifica as não conformidades a serem corrigidas para demonstrar o cumprimento das normas de acreditação, ao qual a entidade tem de responder. A equipa avaliadora estuda e emite um parecer, a que se segue uma análise de todo o processo pelo IPAC – se aplicável, é solicitado um parecer às entidades regulamentares. É, então, tomada uma decisão pelo IPAC que, sendo favorável, irá desencadear o ciclo anual seguinte.

O certificado de acreditação é emitido pela organização nacional de acreditação (ONA) e é concedido quando a decisão da acreditação é positiva, depois da entidade auditada ter pago os custos relacionados com o processo. Este documento contém a data de início da acreditação, o número de certificado, a especificação da entidade acreditada, a norma de referência de acreditação, a descrição do âmbito de acreditação, o endereço do laboratório e a seguinte informação:

- Laboratórios de ensaio – descrição dos produtos, materiais, métodos e documentos utilizados nos ensaios;
- Laboratórios de calibração – descrição das gamas de medição, grandezas e equipamentos utilizados na calibração.

Um laboratório permanece acreditado até que cumpra os requisitos estabelecidos. Contudo, deixa de estar acreditado sempre que o solicite, sempre que deixe de estar ativo ou sempre que for aplicada uma suspensão ou anulação. Cada laboratório tem um número de acreditação associado, sendo o número L0271 correspondente ao número de acreditação da ÆMITEQ.

De modo a manter a acreditação são realizadas auditorias. Estas têm como objetivo averiguar se as atividades desenvolvidas estão de acordo com as disposições planificadas e/ou estabelecidas previamente, se foram implementadas ações com eficácia, se estão em conformidade com os requisitos especificados, promover melhorias no sistema, avaliar a eficácia do sistema de gestão empresarial, verificar se o sistema de gestão cumpre eficazmente a política, objetivos e metas definidos pela organização e permitir o reconhecimento de um sistema. O processo de acreditação é regido por normas internacionais, de modo a permitir a existência de Acordos de Reconhecimento Internacionais e o cumprimento do Regulamento (CE) 765/2008. As auditorias são realizadas anualmente, exceto em casos extraordinários, como por exemplo mudanças significativas na organização e no sistema de gestão da empresa (pessoas chave, procedimentos de avaliação da conformidade, equipamentos ou instalações) [10].

A lei em vigor recomenda que os métodos utilizados para a análise da qualidade da água destinada ao consumo humano garantam que os resultados obtidos sejam fiáveis e comparáveis. De modo a garantir esses pressupostos, ou têm o método acreditado ou têm de demonstrar que o método e o controlo de qualidade aplicados são eficientes. Para garantir que um método é adequado podem utilizar-se métodos ou normas internacionais. O laboratório que pratica métodos internos de ensaio terá que instruir um processo de avaliação desses métodos, que inclua todos os registos obtidos [11].

Capítulo 2

Fundamentação

2.1 Tratamento de resultados

Seguidamente, resumem-se alguns conteúdos fundamentais relativamente ao tratamento de resultados e suporte estatístico para a tomada de decisão.

Os testes estatísticos auxiliam, com critérios estatísticos, a tomada de decisão na análise dos resultados obtidos num ensaio e permitem garantir que os resultados foram ou não bem estimados e que as conclusões foram ou não bem estabelecidas. Estes dependem do nível de confiança ao qual se pretende obter conclusões e do número de graus de liberdade desse ensaio.

2.1.1 Testes estatísticos

A interpretação estatística de resultados parte de um certo conjunto de pressupostos fundamentais, que condicionam fortemente os resultados. Como tal, é importante salientar: a) ausência de erro sistemático, b) erro aleatório com distribuição normal e c) erro não correlacionado [12].

2.1.2 Nível de confiança e nível de significância

Mesmo que a estimativa central esteja correta, devido à componente aleatória intrinsecamente envolvida na quantificação, há sempre probabilidade de se cometer um erro de juízo na avaliação estatística de hipóteses. Tal, deve-se ao facto de este ser um evento binomial onde existe uma hipótese inicial (H_0) e uma hipótese alternativa (H_1) que lhe é complementar:

$$p[H_0] + p[H_1] = 1 \quad (2.1)$$

Uma vez que a hipótese nula (H_0) é formulada no sentido da igualdade, esta será aceite por defeito, se não for demonstrada a sua falsidade. Deste modo, podem suceder três situações distintas no que diz respeito à decisão estatística sobre a validade das hipóteses em estudo (tabela 2.1) [12].

Tabela 2.1. Teste estatístico de hipóteses: tipos de erros que podem ocorrer na tomada de decisão.

Decisão tomada	H_0 =Verdadeira (H_1 =Falsa)	H_0 =Falsa (H_1 =Verdadeira)
Aceitar H_0	✓ $(1-\alpha)$	Erro do tipo II (β) (aceitação abusiva)
Aceitar H_1	Erro do tipo I (α) (rejeição abusiva)	✓ $(1-\beta)$

Desta tabela conclui-se que existem duas situações corretas e duas anómalas. Enquanto nas situações corretas a decisão tomada é conforme com a realidade, nas situações anómalas a decisão tomada é antagónica. Assim, os erros estatísticos cometidos podem ser de dois tipos:

- erro por excesso - refere-se a uma falsa rejeição. Este erro denomina-se por erro do tipo I (α) - a hipótese nula está correta e é rejeitada por ter sido considerada falsa.
- erro por defeito - refere-se a uma falsa aceitação (aceitação abusiva da hipótese que estava incorreta). Este erro designa-se por erro do tipo II (β) - a hipótese nula está errada e foi aceite como verdadeira.

Por uma questão de segurança estatística, é preferível cometer um erro por rejeição abusiva (erro do tipo I) do que um erro devido a uma aceitação abusiva (erro do tipo II).

A probabilidade máxima com que se pretende proceder à rejeição abusiva designa-se por nível de significância (α) do teste. O nível de significância é, geralmente, indicado em termos percentuais. A probabilidade de aceitação da hipótese correta designa-se de nível de confiança e corresponde a $(1-\alpha)$.

Denomina-se por valor de prova ($p[H_0]$) a probabilidade de aceitação da hipótese nula.

2.1.3 Procedimento

Os testes estatísticos devem ser realizados numa sequência lógica: 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 [13].

A formulação do problema consiste em analisar o que se pretende provar estatisticamente.

A escolha do teste é feita com base no que se pretende verificar e é efetuada tendo em conta a distribuição estatística que melhor se adequa ao teste escolhido. As distribuições estatísticas mais comuns para efetuar testes estatísticos são a normal, *t-student*, *F-Fisher* e χ^2 .

O estabelecimento do nível de significância é indispensável para que se possa tirar as conclusões adequadas. É inicialmente estipulado um certo nível de significância para a conclusão estatística a tomar, o que corresponde a ter um determinado nível de confiança para que a decisão

tomada esteja correta. Normalmente, o nível de significância refere-se a $\alpha=0,05$. Porém, pode também diminuir para $\alpha=0,01$, para que sejam obtidas as conclusões finais. Sempre que os testes envolvam 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 $\alpha=0,01$.

As hipóteses de trabalho servem para explicar o caso em estudo. Como tal, não devem ser sobreponíveis mas devem abranger todo o universo do evento: enquanto a hipótese nula, H_0 , deve ser formulada no sentido de não haver diferença, isto é, no sentido da igualdade, a hipótese alternativa, H_1 , incide sobre a diferença significativa 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 desigualdade ($H_1: x_i > x_j$) apenas interessa comparar a sobreposição unilateral das caudas (valores extremos) das duas distribuições, o que corresponde a um teste unilateral. Caso se pretenda um teste de igualdade ($H_0: x_i \cong x_j$), o interesse é comparar a sobreposição central das distribuições (valores interiores, intervalo de confiança), o que corresponde a um teste bilateral [14].

O valor de teste é calculado com base na expressão da distribuição estatística subjacente. Baseia-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. Estes valores permitem definir as regiões de aceitação e de rejeição das hipóteses anteriormente formuladas. Sempre que seja possível, deve-se estimar o respetivo valor de prova, $p[H_0]$, com o objetivo de confirmar a conclusão anteriormente assumida.

No caso do valor experimental exceder os limites tabelados, diz-se que ao nível de confiança $(1-\alpha)$ há diferença significativa. Deste modo, a hipótese inicial deve ser rejeitada em detrimento da hipótese alternativa. Caso contrário, não há evidência estatística significativa para rejeitar a hipótese nula. No caso do valor 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. Caso se assuma o valor intermédio (0,03) como critério de desempate, valores entre 0,03 e 0,05 são favoráveis à aceitação da hipótese nula, sob restrições, e valores entre 0,01 e 0,03 são dúbios mas favoráveis à rejeição da hipótese nula, sob restrições.

2.1.4 Testes baseados nas distribuições estatísticas

As distribuições estatísticas (*t-student*, *F* e χ^2) estão relacionadas com o teste de hipóteses, uma vez que podem ser utilizadas como termo de comparação em diversas situações reais, providenciando os valores críticos necessários [15].

➤ Distribuição *t-student*

Quando está em causa a comparação de estimativas de posição, assumindo que se trata de distribuições normais e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma_{\bar{x}}} \leq t_{\alpha(n-1)} \quad (2.2)$$

e compara-se este resultado com o valor crítico da distribuição *t-student* ao nível de confiança $(1-\alpha)$. Se a hipótese nula assumir a igualdade de valores a hipótese alternativa assume a desigualdade

$$\begin{cases} H_0: \bar{x} = \mu \\ H_1: \bar{x} \neq \mu \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} H_0: \bar{x} = \mu \\ H_1: \bar{x} < \mu \vee H_1: \bar{x} > \mu \end{cases} \quad (2.3)$$

e, conseqüentemente, o valor crítico refere-se à distribuição cumulativa bilateral. Caso se procure demonstrar que o valor estimado é superior ao valor correto, a hipótese nula assume a situação de igualdade enquanto a hipótese alternativa dá conta desta diferença e os valores críticos correspondem à distribuição cumulativa unilateral:

$$\begin{cases} H_0: \bar{x} \leq \mu \\ H_1: \bar{x} > \mu \end{cases} \quad \begin{matrix} p[H_0] \cong (1 - \alpha) \\ p[H_1] \cong (\alpha) \end{matrix} \quad (2.4)$$

➤ Distribuição *F-Fischer*

Quando se pretende comparar variâncias de distribuições normais aleatórias e independentes, calcula-se o valor teste

$$TV = \frac{\sigma_i^2}{\sigma_j^2} \quad (2.5)$$

que, no caso de distribuições normais e independentes, deve seguir uma distribuição de *Fischer*. Em numerador fica a variância maior e em denominador a menor.

Assume-se como hipótese inicial que não há diferença significativa entre as variâncias (diferença puramente aleatória),

$$\begin{cases} H_0: \sigma_i^2 = \sigma_j^2 \\ H_1: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \end{cases} \Leftrightarrow \begin{cases} H_0: \sigma_i^2 = \sigma_j^2 \\ H_1: \sigma_i^2 < \sigma_j^2 \vee H_1: \sigma_i^2 > \sigma_j^2 \end{cases} \quad (2.6)$$

o que corresponde a efetuar um teste bilateral para o quociente de variâncias e a hipótese alternativa assume que se houver diferença significativa entre as variâncias, a variância do numerador excede a do denominador.

2.1.5 Outros testes

Há diversos testes que não se baseiam nas distribuições estatísticas anteriores mas nem por isso deixam de ser relevantes para a avaliação estatística e tomada de decisão ao nível do controlo da qualidade.

➤ Teste de *Grubbs*

Por vezes, deparamo-nos com resultados que são significativamente diferentes dos restantes ou do que seria esperado. A esses resultados atribui-se o nome de valores discrepantes (*outliers*) [15].

O teste de *Grubbs* pressupõe *à priori* que a distribuição em causa é normal e um determinado valor pode ser considerado discrepante se a sua distância à estimativa central exceder um valor múltiplo do desvio padrão global.

Como a hipótese nula assume que o valor em causa (x_i) não difere significativamente da estimativa central, o valor a calcular é

$$TV(G) = \frac{\max |x_i - \bar{x}|}{s_x} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.7)$$

em que \bar{x} representa a média e s_x o desvio padrão dos valores experimentais, incluindo o valor em causa. Este valor só é excluído caso exceda o valor crítico tabelado referente a um grau de 95% de confiança, para o número total de valores experimentais.

➤ Teste de *Cochran*

Este teste permite verificar se uma determinada variância máxima ($s_{máx}^2$), eventual *outlier* de dispersão, excede estatisticamente os valores de um conjunto de variâncias populacionais. Como hipótese inicial assume-se que não existe diferença significativa entre variâncias

$$\begin{cases} H_0: s_{máx}^2 \leq s_i^2 \\ H_1: s_{máx}^2 > s_i^2 \end{cases} \quad (2.8)$$

e calcula-se o valor experimental

$$TV(G) = \frac{s_{máx}^2}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (2.9)$$

que não deve exceder o valor crítico tabelado a 95% de confiança referente a n variâncias calculadas com base em m réplicas.

➤ ANOVA

A análise de variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística importante para distinguir as várias contribuições sobre a variância total observada (σ_T^2). Permite identificar, dentro da

variabilidade total de diferentes conjuntos de valores experimentais, as contribuições puramente aleatória (σ_0^2) e contribuições sistemáticas entre amostras. Deste modo, permite verificar se as amostras (ou fatores) exercem um efeito significativo fazendo com que se sobreponham à componente aleatória, contribuindo para diferenças significativas entre si [15].

A componente puramente aleatória refere-se à dispersão dos valores experimentais, enquanto o efeito do fator se faz sentir a partir da componente sistemática. Assim, a dispersão total pode ser decomposta em duas parcelas: a dispersão interna ou puramente aleatória (SS_T) e a dispersão resultante do efeito em causa (SS_A)

$$SS_T = SS_0 + SS_A \quad (2.10)$$

em que SS representa a soma de quadrados.

Tabela 2.2. Construção da tabela de resultados da ANOVA de fator único.

Fonte de variação	SS	ν	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	$SS_T = SS_0 + SS_A$	$\sum_{i=1}^n m_i - n$	$s_0^2 = \frac{SS_0}{\sum_{i=1}^n m_i - n}$
Total	$SS_T = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{m_i} x_{ij}^2 - \frac{(S_x)^2}{\sum_{i=1}^n m_i}$	$\sum_{i=1}^n m_i - n$	$s_T^2 = \frac{SS_T}{\sum_{i=1}^n m_i - 1}$

Na tabela anterior, S_x representa o somatório de todos os valores, S_x^2 o somatório do quadrado dos valores, m o número de réplicas, n o número de níveis do fator e x_{ij} o valor médio referente à réplica do nível do fator em estudo.

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

O valor de teste é obtido pela equação

$$TV(F) = \frac{s_A^2}{s_0^2} \leq F_{\alpha(n-1;n(m-1))}^u \quad (2.11)$$

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

O valor teste é posteriormente comparado com o respetivo 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.

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

No caso do valor calculado na equação (2.11) exceder o valor crítico diz-se que, ao nível de confiança $(1-\alpha)$ existe diferença significativa entre níveis do fator em estudo e a hipótese nula deve ser excluída em detrimento da hipótese alternativa: a dispersão originada pelo fator é estatisticamente superior à estimada para o erro aleatório.

2.1.6 Curva de calibração

A forma mais comum de efetuar a calibração de um instrumento é através da curva de calibração, também denominada por curva analítica. Este processo consiste em preparar padrões com concentrações bem conhecidas do analito e matriz (veículo de suporte onde coexiste o analito), o mais próximo da realidade da amostra em estudo. As soluções são colocadas no equipamento e o respetivo sinal instrumental é registado.

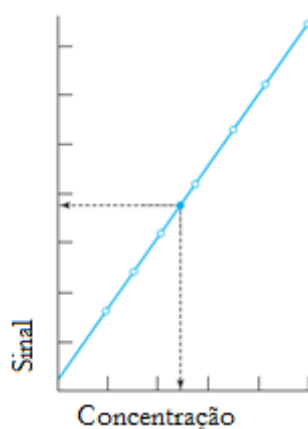


Figura 2.1. Exemplo de uma curva de calibração (Adaptado de [15]).

Caso se trate de uma calibração linear, pode-se quantificar o analito utilizando a função inversa da calibração – com base no sinal instrumental obtido (\bar{Y}_A) da amostra estima-se o teor de analito (X_A) presente:

$$X_A = \frac{(\bar{Y}_A - b_0)}{b_1} \quad (2.12)$$

e a respetiva incerteza

$$\sigma(X_A) = \frac{\sigma_{fit}}{b_1} \times \sqrt{\frac{1}{M} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{Y}_A - \bar{y}_c)^2}{b_1^2 \sum (x_i - \bar{x}_c)^2}} \quad (2.13)$$

onde \bar{Y}_A é o valor médio do sinal da amostra, obtido através de M réplicas, e (\bar{x}_c, \bar{y}_c) representam as coordenadas do centróide da curva de calibração [13].

2.1.7 Escolha do modelo

Na escolha do melhor modelo para descrever a curva de calibração, ajusta-se um polinómio de primeiro grau e um polinómio de segundo grau, estimam-se as respetivas somas de resíduos quadrados e compara-se o aumento da variância do ajuste ao baixar o grau do polinómio [13].

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.

A escolha do modelo é feita através do teste de *Mandel* e consiste em comparar a alteração da variabilidade ($\Delta\sigma^2 = \Delta SS / \Delta v$) resultante da diminuição do número de graus de liberdade [$(v_1 - v_2) > 0$], com uma estimativa puramente aleatória da dispersão ($\sigma_{pe}^2 = \sigma_j^2$)

$$TV = \frac{\Delta\sigma^2}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta SS / \Delta v}{\sigma_{pe}^2} \quad (2.14)$$

onde ΔSS representa a diferença entre a soma dos quadrados dos resíduos do polinómio de primeiro grau e Δv corresponde à diferença entre os graus dos dois polinómios.

Como hipótese nula considera-se que os objetos/parâmetros removidos não afetam significativamente a variância da população. Como hipótese alternativa considera-se que os objetos/parâmetros removidos afetam significativamente a variabilidade final.

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 calculado não exceder o valor crítico $F_{0,01}^u(1, v_2)$ a hipótese nula deve ser aceite, o que indica que o polinómio de primeiro grau é adequado à curva de calibração em estudo.

2.1.8 Verificação de valores discrepantes do modelo

Os eventuais valores discrepantes da curva de calibração podem ser testados através de um teste F , idêntico 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 do erro puramente aleatório. 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 ($\Delta\sigma_{fit(n-p-1)}^2$):

$$TV = \frac{(SS_n - SS_{(n-1)}) / ((n-p) - (n-p-1))}{\sigma_{pe}^2} = \frac{\Delta\sigma_{pe}^2}{\Delta\sigma_{fit(n-p-1)}^2} \leq F_{\alpha(1,n-p-1)}^u \quad (2.15)$$

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

Se este valor exceder o valor crítico indica que o valor em questão não pertence à curva de calibração, ou seja, afeta significativamente a qualidade do ajuste e, por isso, a hipótese nula não é 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 afetar todas as estimativas subsequentes, deve-se recorrer a um nível de confiança de 99% [13].

2.2 Validação de métodos analíticos

A norma ISO/IEC 17025 - Requerimentos gerais de competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração, define validação de um método analítico como a “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”. O principal objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que todo o método é adequado para quantificar um analito numa determinada matriz com um certo nível de concentração, originando resultados fiáveis com precisão e exatidão adequadas. O processo de validação deve estar descrito num procedimento laboratorial e a determinação dos parâmetros de validação deve ser efetuada em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente e adequadamente calibrados [9, 16,17].

Os técnicos de laboratório efetuam uma nova validação sempre que exista alguma modificação suscetível nas características do método e na implementação de novos métodos de ensaio.

Um método analítico é um processo que envolve manipulações suscetíveis de acumular erros (sistemáticos e aleatórios) podendo, em algumas situações, alterar de modo significativo o resultado final. Quando o laboratório pretende elaborar métodos internos de ensaio capazes de produzir resultados fiáveis, é imprescindível que estes disponham de meios e critérios objetivos, de modo a

demonstrar, através da validação, que os métodos internos de ensaio que exercem originam resultados adequados à qualidade pretendida. Desta forma, a validação dos métodos internos deve ser adaptada a cada caso, sendo requisito mínimo para a validação de métodos internos o estudo e conhecimento dos seguintes parâmetros: gama de trabalho e linearidade da curva de calibração, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exatidão. Para análises qualitativas não faz sentido determinar o limite de quantificação, a precisão, a exatidão e a linearidade/gama de trabalho. Em análises qualitativas, o limite de detecção, a seletividade/especificidade e a robustez são os pontos mais relevantes no processo de validação. Em análise quantitativa, e caso o método seja aplicado em gamas vestigiais, todos os requisitos acima citados são importantes. Assim, cabe ao Laboratório analisar quais os parâmetros a incluir no seu plano de validação, perante o tipo de metodologia em questão [18].

De acordo com as últimas diretivas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a Conferência Internacional sobre Harmonização (*International Conference on Harmonization*), para validar completamente um método analítico tem que se avaliar nove parâmetros: identificação, especificidade e seletividade, sensibilidade, limiares analíticos, linearidade e gama analítica, precisão, exatidão, robustez e coerência [19].

O processo de validação do método pode ser decomposto por dois grupos de avaliação: a avaliação indireta e a avaliação direta. A avaliação indireta corresponde à determinação e evidência dos parâmetros característicos do método: seletividade, limiares analíticos, precisão e exatidão. A avaliação direta tem como objetivo conhecer a exatidão dos métodos de ensaio, ou seja, analisar a concordância entre o resultado fornecido pelo método de análise e o valor de referência aceite como verdadeiro [11].

2.2.1 Identificação

O ensaio de identificação pretende demonstrar que o método é capaz de identificar inequivocamente a presença do analito na amostra bem como a sua ausência, evidenciando que a propriedade físico-química em que o método analítico se baseia está diretamente relacionada com a presença do analito. A identificação é feita através da comparação de uma propriedade da amostra com a mesma propriedade de um padrão de referência [espectro de massa, reação específica, perfil cromatográfico, modificação do analito (ex: metilação, silanização, etc.)] [20-22].

Após a escolha do melhor método para determinar e detetar o analito em estudo é necessário garantir que o sinal instrumental proporcionado pelo equipamento corresponde realmente ao analito em questão. Geralmente, as condições de análise são referidas na literatura, embora haja necessidade de as verificar experimentalmente, devido, por exemplo, à possibilidade de interferências de matriz.

2.2.2 Especificidade e Seletividade

A seletividade é a capacidade de um método responder ao analito e a um número restrito de interferentes numa mistura complexa. Entende-se por interferente todas as substâncias que, estando presentes na amostra, são suscetíveis de causar um desvio na quantificação do analito. Esta característica é função do princípio de medida utilizado, mas depende do tipo de compostos a analisar [11].

Diz-se que um método é específico quando responde apenas ao analito presente numa mistura complexa, não havendo interferentes no método. Assim sendo, é necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias presentes na amostra. Para averiguar o efeito de possíveis interferentes pode-se efetuar 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. As amostras devem ser analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade [11, 22].

2.2.3 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método ou equipamento distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Para métodos que envolvam uma curva de calibração, a sensibilidade é definida como a derivada de primeira ordem da curva de calibração numa determinada zona de concentração. 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 (m) dessa reta de calibração. Num modelo linear, a sensibilidade pode ser definida pela seguinte equação:

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (2.16)$$

onde a sensibilidade (m) é definida como o menor incremento da concentração de analito (Δx) necessário para dar origem a uma variação detetável no valor do sinal lido (Δy) [11].

2.2.4 Limiares analíticos

O termo limiares analíticos refere-se ao limite de deteção e ao limite de quantificação. Os conceitos de limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) têm grande importância em química analítica, uma vez que é a partir deles que o analista traça os limiares analíticos alcançáveis para o método que vai utilizar [11, 22, 23].

O limite de deteção corresponde à menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser fiavelmente distinguida do zero ou branco. Corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir, com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), o sinal do branco do sinal da amostra e, desta forma, indicar se o analito em questão está presente ou ausente. Uma leitura inferior ao limite de deteção não significa que o analito está ausente, apenas indica, com uma probabilidade definida, que a concentração do composto em causa é inferior a um certo valor.

O limite de deteção pode ser determinado através de réplicas de brancos ou de padrões vestígio e através da calibração linear. No primeiro caso, o LD pode ser determinado pela seguinte equação:

$$LD = x_0 + ks_0 \quad (2.17)$$

onde x_0 representa a média aritmética do teor de uma série de brancos ou padrões vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, e s_0 corresponde ao desvio padrão associado a x_0 . Se a lei de probabilidade de x_0 for suficientemente conhecida e, partindo do princípio que é uma distribuição normal de erros (gaussiana), então o valor de k é 3,3 para um nível de confiança de cerca de 99,7%. k é a constante da distribuição normal ao nível de confiança de 99,7%.

No segundo caso, o LD pode ser calculado através da seguinte equação:

$$LD = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b} \quad (2.18)$$

onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e b representa o declive da reta de calibração [11].

Podem ainda acontecer que a concentração correspondente ao sinal do branco não tenha significado. Neste caso particular, o LD é calculado do seguinte modo:

$$LD = t_{(n-1,1-\alpha)}^u \times s_0 \quad (2.19)$$

onde $t_{(n-1,1-\alpha)}^u$ corresponde ao valor do teste *t-student* unilateral, para um nível de confiança de 95% e para $n-1$ graus de liberdade, sendo n o número de ensaios. s_0 corresponde ao desvio padrão associado à média de várias réplicas de um padrão ou branco fortificado [17].

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma determinada exatidão e precisão. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Após a sua determinação, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória. Este teste pode ser realizado através da passagem, em condições de precisão intermédia, de uma série de

padrões, cuja concentração é próxima ou igual ao limite de quantificação, sendo que o coeficiente de variação (CV) associado, também designado por desvio padrão relativo, não deve ser superior a 10%.

O limite de quantificação pode ser determinado por:

a) Caso geral

$$LQ = x_0 + 10s_0 \quad (2.20)$$

em que x_0 representa a média aritmética do teor de uma série de brancos, preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e s_0 corresponde ao desvio padrão associado a x_0 .

b) Caso do padrão vestígio ou branco fortificado

O LQ determina-se com base num conjunto de padrões vestígio ou brancos fortificados, independentes, testados em condições de precisão intermédia, sobre os quais são feitos estudos de exatidão e precisão. No caso de o LQ ser estimado deste modo, o limite de deteção é calculado com base no LQ, tendo em conta a relação entre os dois limiares analíticos ($LD=LQ/3,3$).

c) Caso em que o método envolve a utilização de uma calibração linear

$$LQ = \frac{[10 \times S_{y/x}]}{m} \quad (2.21)$$

onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da curva de calibração e m representa o declive da reta de calibração [11].

O intervalo compreendido entre o LD e o LQ deve ser entendido como uma zona de deteção semi-quantitativa. Deste modo, não devem ser reportados valores numéricos neste intervalo.

2.2.5 Linearidade e gama analítica

A curva de calibração relaciona a resposta do sistema de medição com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Esta deve ser efetuada em cada dia de análise, devendo existir critérios de aceitação das curvas de calibração, definidos internamente. É recomendado o uso da norma ISO 8466-1 como referência para calibrações analíticas, nomeadamente para efetuar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados. Os padrões de calibração devem distribuir-se equitativamente pela gama de trabalho e o valor das amostras não deve ultrapassar o valor do último padrão de calibração [11, 24].

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do método facultar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, dentro de uma determinada gama

de aplicação. Embora somente dois pontos definam uma reta, na prática devem ser definidas por, no mínimo, cinco pontos que não incluam o ponto zero da curva, devido aos possíveis erros associados.

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão. Regra geral, para se definir a gama de trabalho é necessário que a resposta instrumental seja linear e que exista homogeneidade de variâncias na variável dependente. Para tal, recomenda-se o uso da norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau [11, 24, 25]

2.2.5.1 Linearidade

Na verificação da linearidade de uma curva de calibração pode partir-se da análise da correlação linear. O coeficiente de correlação (r) traduz a interdependência entre sequências de dados entre o sinal medido e a concentração do padrão correspondente, enquanto o coeficiente de determinação (r^2) indica a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais (traduz a variabilidade explicada pelo modelo). Esta reta é formada por um conjunto de pares ordenados e independentes $(x_1, y_1); (x_2, y_2); \dots; (x_i, y_i); \dots; (x_N, y_N)$, que corresponde a N pontos da reta. A média de valores da concentração dos padrões utilizados representa-se por \bar{x} e a média dos valores do sinal instrumental representa-se por \bar{y} . O coeficiente de correlação pode ser calculado pela expressão:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2\]}} \quad (2.22)$$

O valor do coeficiente de correlação, pode tomar valores entre -1 e 1 ($-1 \leq r \leq 1$). Um valor de $r = 1$ representa uma correlação positiva (reta de declive positivo) e um valor de $r = -1$ representa uma correlação negativa (reta de declive negativo). Mesmo que se obtenha um bom valor do coeficiente de correlação (o mais próximo de 1 possível), não significa que a correlação linear seja a correlação que mais se ajusta. O uso deste parâmetro deve ser sujeito à visualização da curva de calibração, através da elaboração de um gráfico do sinal obtido em função da concentração dos padrões, com o intuito de detetar tendências não lineares dos resultados [11, 20, 24].

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1. A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, bem como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}^2$ e $S_{y^2}^2$. A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela seguinte equação:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y^2}^2 \quad (2.23)$$

onde N corresponde ao número de padrões de calibração. Seguidamente, calcula-se o valor teste (TV):

$$TV = \frac{DS^2}{S_y^2} \quad (2.24)$$

O valor obtido é comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*:

- Se $TV \leq F_{\text{crít}}$: a função de calibração é linear.
- Se $TV > F_{\text{crít}}$: a função de calibração é não linear.

No caso de $TV > F_{\text{crít}}$, deve-se averiguar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

A análise da gama de trabalho e da linearidade, deve ser efetuada ao longo da fase de validação/implementação do método de ensaio ou sempre que se justifique. No caso da gama de trabalho estar definida em referência bibliográfica reconhecida, pode não ser necessário analisá-la. Isto é, em análises de rotina, a linearidade da curva de calibração utilizada num determinado método analítico deve ser avaliada através da sua representação gráfica juntamente com a análise do coeficiente de correlação [11].

2.2.5.2 Gama de trabalho

Quando se utiliza um método que envolve a representação gráfica de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Para métodos que não envolvam o traçado de curvas de calibração, a gama de trabalho deve ser definida previamente e pode ser função de alguns fatores, tais como a quantidade de amostra disponível ou a boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos no caso de volumetrias [11, 20, 24].

A norma ISO 8466-1 recomenda o uso de dez pontos de calibração. Não se efetuando 10 padrões de calibração ou existindo rejeição de algum valor, a reta de calibração deve ter no mínimo 5 pontos, que devem estar distribuídos equitativamente ao longo da gama de trabalho. O primeiro e o último padrão são analisados através de 10 réplicas independentes, sendo o teste de homogeneidade de variâncias efetuado do seguinte modo:

- Determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S_1 e S_N), do seguinte modo:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (2.25)$$

sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (2.26)$$

para $i=1$ e $i=10$.

i representa o número do padrão (neste caso i vai de 1 a 10) e j representa o número de repetições efetuadas para cada padrão.

As variâncias são testadas para averiguar se existe diferença significativa entre elas, nos limites da gama de trabalho, efetuando o cálculo do valor teste:

$$\text{a) } TV = \frac{S_N^2}{S_1^2} \quad (2.27)$$

$$\text{b) } TV = \frac{S_1^2}{S_N^2} \quad (2.28)$$

a) quando $S_N^2 > S_1^2$

b) quando $S_1^2 > S_N^2$

Compara-se o TV com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor/Fisher*, para $n-1$ graus de liberdade:

- Se $TV \leq F_{\text{crít}}$: a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada.
- Se $TV > F_{\text{crít}}$: a diferença de variâncias é significativa e deve-se reduzir a gama de trabalho até que a diferença entre as variâncias reentre o primeiro e o último padrão permita obter $TV \leq F_{\text{crít}}$.

2.2.6 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados obtidos em ensaios independentes, repetidos sobre a mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões em condições definidas. Deste modo, é possível averiguar se o método é capaz de repetir e reproduzir os resultados obtidos em análises sobre a mesma amostra/padrão. Todavia, é aconselhado o uso de amostras reais, de modo a minimizar o efeito matriz que pode influenciar os resultados obtidos bem como a avaliação da precisão.

De acordo com as diretivas da Relacre e da ICH, a precisão pode ser avaliada por três modos: repetibilidade (s_r), reprodutibilidade (s_R) e uma medida intermediária designada por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial (s_I) [11, 26-28].

A precisão é, normalmente, expressa sob a forma de desvio padrão (s)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n - 1)}} \quad (2.29)$$

ou pelo coeficiente de variação (CV)

$$\%CV = 100 * \frac{S}{\bar{X}} \quad (2.30)$$

Tanto a repetibilidade como a reprodutibilidade dependem, normalmente, da concentração de analito e, como tal, devem ser determinadas para um diferente número de concentrações.

2.2.6.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições análogas. Ou seja, os ensaios efetuados sobre uma amostra devem ser realizados em condições tão estáveis quanto possível, tais como: mesmo analista, mesmo laboratório, mesmo equipamento, mesmos reagentes e um curto intervalo de tempo. A repetibilidade expressa-se pela dispersão dos resultados e pode ser determinada a partir de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios intralaboratoriais em amostras de diferentes concentrações, englobando toda a gama de trabalho, em materiais de referência internos ou em soluções padrão. Para determinar a repetibilidade são necessários, no mínimo, 10 ensaios [11, 27, 29].

O limite de repetibilidade (Δr) é o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre dois ensaios em condições de repetibilidade, calculada para o nível de confiança de 95%:

$$\Delta r = t_{0,05(m-1)}^u \times \sqrt{2} \times S_{ri} \quad (2.31)$$

onde m representa o número de réplicas que servem de base para determinar o desvio padrão, S_{ri} , referente à repetibilidade estimada e $t_{0,05(m-1)}^u$ é o valor crítico da distribuição *t-Student* com um nível de significância de 0,05 e com $m-1$ graus de liberdade. Isto é

$$\Delta r = 2,8 \times S_{ri} \quad (2.32)$$

Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite, deve-se fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas, nomeadamente a Norma ISO 5725-2 e ISO 5725-6 [27, 29].

Outro fator a ter em conta no estudo da repetibilidade é o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r), que é numericamente igual à razão entre o desvio padrão da repetibilidade (S_{ri}) e a média dos resultados obtidos segundo a expressão:

$$\%CV_r = 100 * \frac{S_{ri}}{\bar{X}} \quad (2.33)$$

2.2.6.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade traduz a precisão de um método realizado em condições de trabalho diferentes (operadores, equipamentos, laboratórios e intervalo temporal diferente), utilizando o mesmo método de ensaio. Traduz a amplitude de erros aleatórios de quantificação a uma escala transnacional e só pode ser estimado através de ensaios interlaboratoriais. Assim, é enviada uma série de amostras aos laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra. O valor da variância associada à reprodutibilidade é calculado do seguinte modo:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (2.34)$$

onde S_{Ri}^2 representa a variância da reprodutibilidade, S_{Li}^2 corresponde à variância interlaboratorial e S_{ri}^2 é a variância da repetibilidade [11, 20, 29].

O estudo da reprodutibilidade de um método é fundamental quando se pretende implementar um novo método de análise na comunidade científica, uma vez que é necessário averiguar se este é preciso sobre diferentes condições de trabalho. Não tem tanta importância na validação de um método num laboratório de análises, uma vez que se pretende que o método seja executado dentro desse mesmo laboratório, utilizando o mesmo equipamento e em condições de trabalho que variam pouco ao longo do tempo.

O limite de reprodutibilidade (ΔR) é o valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios em condições de reprodutibilidade, calculada para o nível de confiança de 95%:

$$\Delta R = t_{0,05(m-1)}^u \times \sqrt{2} \times S_{Ri} \quad (2.35)$$

isto é:

$$\Delta r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (2.36)$$

Outro fator a ter em conta no estudo da reprodutibilidade é o coeficiente de variação de reprodutibilidade (CV_R), que é numericamente igual à razão entre o desvio padrão da reprodutibilidade (S_{Ri}) e a média dos resultados obtidos segundo a expressão:

$$\%CV_R = 100 * \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \quad (2.37)$$

2.2.6.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia, também denominada por variabilidade intralaboratorial, refere-se à precisão estimada sobre a mesma amostra ou padrão, utilizando o mesmo método, dentro do mesmo laboratório, definindo exatamente quais as condições a variar, tais como: operadores diferentes, equipamentos diferentes e intervalo temporal diferente [11, 28].

A quantificação da precisão intermédia consiste em efetuar várias medições sobre uma amostra ou um padrão, variando os parâmetros experimentais em cada análise. A determinação da precisão intermédia é realizada através das cartas de controlo de amplitudes, admitindo que ao efetuar ensaios em dias diferentes varia aleatoriamente grande parte dos parâmetros experimentais não controlados, que afetam o desempenho do método.

A precisão intermédia é calculada com base nos resultados de t padrões, em que os t padrões têm de ser analisados em replicado, as mesmas n vezes segundo a equação:

$$S_{\text{precisão}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}} \quad (2.38)$$

onde $S_{\text{precisão}}$ corresponde ao desvio padrão relativo da precisão intermédia, n representa o número de réplicas, y_{jk} é o resultado replicado k (variando k entre 1 e n) do padrão j (variando j entre 1 e t) e \bar{y}_j representa a média aritmética dos resultados de n ensaios realizados sobre o padrão j . O uso desta equação na determinação da precisão intermédia exige que o termo $t(n-1)$ seja superior a 15 [11].

2.2.7 Exatidão

A exatidão de um método analítico permite avaliar a proximidade entre o valor obtido (μ) pelo método de análise e o valor de referência (τ) convencionalmente aceite como verdadeiro. Este parâmetro, que corresponde ao erro sistemático do método analítico, pode ser estimado com base em análise de materiais de referência certificados (MRC), participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) e realização de ensaios de recuperação. Pode ser expresso através do erro absoluto (Δ), do erro relativo (%RE), do fator de desempenho (z-score), do erro normalizado (E_n), ou da taxa de recuperação (%Rec) [11].

O erro absoluto expressa-se através da diferença entre o valor obtido e o valor convencionalmente aceite como verdadeiro:

$$\Delta = |\mu - \tau| \quad (2.39)$$

O erro relativo expressa-se através do quociente entre o valor observado e o valor de referência aceite como verdadeiro:

$$\%RE = 100 \times \left(\frac{|\mu - \tau|}{\tau} \right) = 100 \times \frac{\Delta}{\tau} \quad (2.40)$$

O método considera-se exato se a estimativa do erro relativo for inferior à imprecisão estimada (% CV).

2.2.7.1 Material de Referência Certificado

Os materiais de referência certificados têm uma concentração conhecida para um determinado parâmetro, com uma incerteza associada a esse valor e, por isso, devem ser utilizados no processo de validação de um método de ensaio. Além disso, estes materiais constituem uma excelente ferramenta no controlo externo da qualidade de uma análise química [11].

A aquisição de um MRC deve ser feita a um organismo fornecedor reconhecido e credível, tal como:

- IRMM - *Institute for Reference Materials and Measurements*
- NIST - *National Institute of Standards and Technology*, dos Estados Unidos da América
- EPA - *US Environmental Protection Agency*, dos Estados Unidos da América
- LGC – *Standards Proficiency Testing*, no Reino Unido

O uso correto dos MRC baseia-se na sua análise, de modo a avaliar o desempenho do método usado pelo laboratório. O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, com o intuito de determinar o erro e a exatidão da análise. Quando o valor obtido na análise do MRC não estiver dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve analisar as causas desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las. A avaliação dos resultados obtidos na análise de um MRC pode ser avaliada através:

- Erro relativo;
- Teste de hipóteses (teste t);
- Fator de desempenho Z (“Z-score”);
- Erro normalizado.

2.2.7.2 Ensaios interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais têm como objetivo comparar os resultados obtidos pelo laboratório com o valor aceite como verdadeiro. Existem diversos tipos de ensaio interlaboratorial consoante os objetivos a que se destinam, destacando-se:

- Ensaios interlaboratoriais de aptidão, cujo objetivo é avaliar o desempenho dos laboratórios participantes funcionando, em alguns países, como condição para acreditação do laboratório. Geralmente, os participantes podem usar os métodos que entenderem.
- Ensaios interlaboratoriais de normalização, que tem como objetivo estudar as características de um determinado método de análise, analisando a reprodutibilidade e repetibilidade. Este exige a utilização exclusiva de um método em causa.

Assim sendo, se o objetivo de um laboratório for demonstrar a repetibilidade e a reprodutibilidade de um método evidenciando, em simultâneo, que tem uma precisão compatível com a de outros laboratórios, pode recorrer a ensaios interlaboratoriais de normalização. Se o seu objetivo for evidenciar a exatidão dos seus resultados, pode participar em ensaios interlaboratoriais de aptidão. Os ensaios interlaboratoriais são também uma ferramenta de grande importância no controlo de qualidade externa uma vez que asseguram a qualidade do resultado obtido pelo método [11, 30].

A avaliação do desempenho obtido pelo laboratório pode ser quantificada através da utilização do fator de desempenho “Z-score”. Este engloba o resultado obtido pelo método de análise em estudo, o resultado aceite como verdadeiro e o desvio entre os resultados obtidos por todos os laboratórios presentes no ensaio interlaboratorial, segundo a equação seguinte:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (2.41)$$

onde X_{lab} representa o valor obtido pelo Laboratório, X_v corresponde ao valor aceite como verdadeiro (estabelecido no ensaio interlaboratorial) e s é a unidade de desvio (pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios presentes no ensaio interlaboratorial, a incerteza de X_v ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora).

A avaliação do fator de desempenho pode ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação:

$|Z| \leq 2$: Satisfatório ou Aceitável

$2 < |Z| \leq 3$: Questionável

$|Z| > 3$: Incorreto

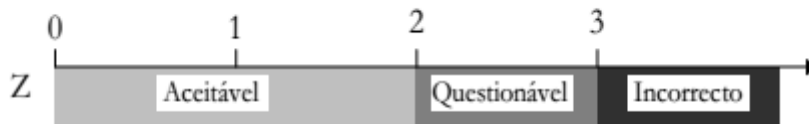


Figura 2.2. Esquema da avaliação do fator de desempenho [30].

Através dos ensaios interlaboratoriais é também possível averiguar se a incerteza do resultado obtido (U_{lab}) está bem estimada, ou seja, se o valor X_p está dentro do intervalo de incerteza de X_{lab} . Se tal não suceder, o intervalo relativo à incerteza pode estar subestimado e é necessário recorrer ao conceito de erro normalizado (E_n) para avaliar o desempenho. O erro normalizado é definido matematicamente como:

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (2.42)$$

onde U_{ref} representa a incerteza associada ao valor X_p . Se $|E_n| \leq 1$, significa que U_{lab} está bem estimado [11].

2.2.7.3 Testes Comparativos

Os testes comparativos são outro contributo importante na validação de um método interno de ensaio. Consistem na comparação dos resultados obtidos a partir desse método com os resultados obtidos através de um método aceite como referência. O objetivo de um ensaio comparativo é analisar a proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, isto é, avaliar a exatidão do método interno relativamente ao de referência. Tratando-se de um modo mais barato de avaliar a exatidão do método para a realização dos testes comparativos, efetuam-se análises em replicado, utilizando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras [11].

Existem várias formas de comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio diferentes, nomeadamente: teste t das médias, teste das diferenças e teste da regressão linear entre dois métodos de ensaio.

2.2.8 Robustez

A robustez de um método analítico é a capacidade do método produzir o mesmo resultado, não sendo afetado por alteração das condições de operacionalização (ex: variação de temperatura, pH, força iônica, composição de uma mistura de solventes).

O teste de *Youden* é utilizado para avaliar a robustez e verificar a influência de cada uma das variações nos resultados obtidos. Este teste baseia-se na realização de um determinado número de ensaios sobre uma amostra, efetuados segundo um plano de controlo de fatores (até um máximo de sete), suscetíveis de influenciar o processo. Denominam-se por fatores todos os parâmetros cujos efeitos se pretendem quantificar, através dos resultados dos ensaios.

Uma maior robustez de um método revela maior insensibilidade de fatores experimentais deliberadamente alterados, o que é vantajoso, pois o método continua a conduzir a valores concordantes apesar das alterações efetuadas. Quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse método quanto à sua precisão.

Um método alternativo ao teste de *Youden* é testar o método em condições de precisão intermédia, ao longo de um elevado número de dias, obtendo um número significativo de resultados. De seguida, deve ser analisada detalhadamente os resultados em termos de precisão do método. Este método alternativo não oferece as vantagens do teste de *Youden*, embora forneça informação preciosa acerca do comportamento da metodologia em condições de trabalho diferentes [11].

2.2.9 Coerência

A coerência de um método analítico avalia a aptidão do método conduzir sempre ao mesmo resultado, ou seja, traduz a capacidade de reproduzir os mesmos valores entre ensaios em instantes diferentes. Segundo a USP, a coerência pode ser quantificada através da variabilidade dos resultados obtidos sob a variação de diversas condições (ex: no mesmo laboratório, diferentes analistas, instrumentos, reagentes, períodos de tempo, etc.) e pode ser expressa sob a forma de % CV [31].

2.3 Estimativa da incerteza

A validação de um método analítico não pode ser concluída sem avaliar a incerteza global do método, com o intuito de demonstrar que o método é fiável e cumpre os seus objetivos. A incerteza da medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda. Denomina-se por mensuranda a grandeza que se pretende medir [32-34].

Para quantificar a incerteza da medida efetuada assumem-se os seguintes pressupostos:

- i) cada componente de incerteza é traduzido e quantificado através do respetivo erro padrão;
- ii) todos os desvios estão corrigidos (no bias, $\Delta \approx 0$), de modo a que todas as incertezas coincidam com a incerteza da correção;
- iii) todos os intervalos de incerteza são simétricos;
- iv) os componentes da incerteza são classificados consoante a sua origem. Há dois tipos de incertezas:
 - incerteza do Tipo A - diagnóstico de uma componente da incerteza através de uma análise estatística dos valores obtidos, sob condições definidas de medição
 - incerteza do Tipo B - componentes da incerteza determinados por outros meios (outros laboratórios, entidades, etc.);
- v) a incerteza combinada (u_c) representa o erro padrão global do valor a reportar e provém da combinação de todas as incertezas (A e B) sob a forma da adição de variâncias;
- vi) a incerteza expandida (U) resulta do produto da incerteza combinada pelo respetivo valor de *t-student* para um certo nível de confiança referente a um determinado número de graus de liberdade:

$$U = k \times u_c = t_{\alpha(n-1)}^b \times u_c \quad (2.43)$$

Em geral, a incerteza é reportada ao nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Para um grande número de graus de liberdade ($n > 15$), pode ser utilizado o valor $k = 2$ para abranger o nível de confiança de 95% do valor estimado. k representa o fator de expansão, b indica que o teste é bilateral, e $n-1$ representa o número de graus de liberdade.

De acordo com a OGC010, para estimar a incerteza total na quantificação do analito é necessário especificar a mensuranda, identificar as diversas fontes de incerteza, quantificar cada uma das componentes da incerteza, estimar a incerteza combinada e calcular a incerteza expandida. Este modo de quantificar a incerteza é denominado por abordagem passo-a-passo. Permite estimar a contribuição de cada uma das fontes de incerteza permitindo otimizar o método analítico. A abordagem passo-a-passo resume-se nas seguintes etapas:

- Especificação da mensuranda e identificação das fontes de incerteza

Define-se a expressão utilizada na quantificação evidenciando os termos que contêm incertezas associadas. Pode considerar-se como fontes de incerteza todas as etapas ou características do procedimento analítico que contribuem para a incerteza do resultado, como amostragem, efeitos de matriz e interferentes, condições de operação, diferentes operadores, entre outras. Se o valor a reportar não pode ser avaliado diretamente mas é estimado por comparação a valores da substância de referência, deve-se definir a equação que combina as várias quantidades.

➤ Quantificação das fontes de incerteza

O erro do tipo A contém duas componentes: uma aleatória, que não pode ser corrigida, e uma sistemática que, teoricamente, pode ser corrigida. A incerteza do tipo A é expressa sob a forma de desvio padrão da média.

O erro do tipo B, geralmente, é expresso sob a forma de intervalo de confiança ($\pm a$). Regra geral, podem ocorrer duas situações:

- 1) o intervalo de confiança indicado é estimado para um certo nível de confiança. Neste caso, assume-se que se trata de uma distribuição normal e estima-se a incerteza ($u(x)$) com base nos respetivos valores da distribuição bilateral do teste *t-student*. Caso o número de réplicas em que o cálculo se baseou não seja conhecido, considera-se um número infinito de réplicas.
- 2) o intervalo de confiança especificado não tem nível de confiança associado. Neste caso, assume-se que o nível de confiança é de 99% e estima-se a respetiva imprecisão de acordo com o tipo de distribuição prevista para a variável em causa.

➤ Estimativa da incerteza combinada

Regra geral, a incerteza é combinada sob a forma de estimativa de erro indeterminado e independente. Caso se assuma que o determinando é representado pela seguinte expressão

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_p) \quad (2.44)$$

a incerteza combinada referente ao determinando é dada através da expressão de propagação de erro indeterminado

$$u_c = u(f(x_1, x_2, \dots, x_p)) \rightarrow u_c^2 = \sum_{i=1}^p \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \times u(x_i) \right)^2 \quad (2.45)$$

onde $\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)$ representa o coeficiente de sensibilidade da função determinado em relação à variável x_i .

No caso de existir erro indeterminado correlacionado, a expressão anterior é

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^p \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \times u(x_i) \right)^2 + \sum_{i=1}^p \sum_{j>1}^p \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right) \times u(x_i) \right) \left(\left(\frac{\partial f}{\partial x_j} \right) \times u(x_j) \right) \times r_{ij} \quad (2.46)$$

em que r_{ij} representa o coeficiente de correlação dos erros indeterminados entre as variáveis i e j .

➤ Estimativa da incerteza expandida

A incerteza expandida (U) calcula-se através da multiplicação da incerteza combinada pelo fator de expansão desejado

$$U = k \times u_c \quad (2.47)$$

O fator de expansão (k) permite expandir a incerteza combinada (u_c) de modo a definir um intervalo de confiança ao qual está associada uma dada probabilidade. A taxa de expansão é, geralmente, calculada para o nível de confiança de 95% ($\alpha=0,05$). Se o número de graus de liberdade for baixo ($\nu < 15$) deve utilizar-se a distribuição bilateral do teste *t-student* como fator de expansão, caso contrário, assume-se $k=2$. A expressão do resultado analítico deve ser sob a forma de intervalo de confiança

$$\mu_x = \bar{X} \pm U \quad (2.48)$$

A estimativa da incerteza também se pode basear em dados de validação e/ou controlo da qualidade do método. Consiste no uso de parâmetros de desempenho global do método e na combinação das incertezas associadas à precisão e à exatidão. Deste modo, a incerteza pode ser calculada associada à variabilidade/fidelidade do método de ensaio e à justeza da medição.

➤ Incerteza associada à variabilidade/fidelidade do método de ensaio

A precisão deve ser avaliada em condições de precisão intermédia, uma vez que existem maiores variações do desempenho, consequência das alterações experimentais que, habitualmente, se mantêm no mesmo dia de trabalho. Pode ser determinada através do desvio dos resultados de uma amostra ou padrão de controlo obtidos em condições de precisão intermédia ou através da amplitude média dos duplicados de várias amostras. É aconselhável realizar pelo menos 15 medições.

Através dos padrões de controlo, pode-se calcular a componente da fidelidade do seguinte modo:

$$u_{fidelidade} = \frac{S_{padrão\ controlo}}{\frac{\sqrt{n}}{\bar{x}_{pc}}} \quad (2.49)$$

onde $S_{padrão\ controlo}$ é o desvio padrão dos ensaios do padrão de controlo, em condições de precisão intermédia, n corresponde à dimensão do subgrupo da amostragem considerada (para valores individuais $n=1$) e em condições de repetibilidade corresponde ao número de ensaios realizados e \bar{x}_{pc} representa a média experimental dos ensaios do padrão de controlo.

Para o nível de concentração correspondente ao limite de quantificação:

$$u_{fidelidade} = \frac{c.a.}{\sqrt{3}} \quad (2.50)$$

em que *c.a.* corresponde ao critério de aceitação do limiar analítico.

A componente da variabilidade/fidelidade calculada através dos duplicados pode ser determinada pela seguinte expressão:

$$u_{var} = \frac{\bar{R}}{d_2} \quad (2.51)$$

onde \bar{R} representa a amplitude média relativa e d_2 é igual a 1,128 para duplicados.

➤ Incerteza associada à justeza da medição

A contribuição da incerteza associada à justeza da medição pode ser determinada através de ensaios em condições de precisão intermédia, ensaios de recuperação, materiais de referência certificados e padrões de controlo.

Através dos ensaios de recuperação, a incerteza pode ser calculada do seguinte modo:

$$u_{justezamedição} = \frac{s}{\bar{R} \times \sqrt{n}} \quad (2.52)$$

onde n corresponde ao número de ensaios de recuperação, s representa o desvio padrão dos ensaios de recuperação e \bar{R} representa a média dos ensaios.

Quando a justeza da medição é calculada através da análise de MRC's a recuperação média do método, \bar{R}_m , é dada por

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{c}_{obs}}{c_{MRC}} \quad (2.53)$$

em que \bar{c}_{obs} representa a concentração média das análises do MRC e c_{MRC} é o valor certificado do MRC.

A incerteza padrão associada a \bar{R}_m é estimada a partir da seguinte expressão:

$$u(\bar{R}_m) = \bar{R}_m \times \sqrt{\frac{s_{obs}^2}{n\bar{c}_{obs}^2} + \frac{u(c_{MRC})^2}{c_{MRC}^2}} \quad (2.54)$$

onde s_{obs}^2 representa o desvio padrão das análises do MRC, n corresponde ao números de análises efetuadas e $u(c_{MRC})^2$ é a incerteza padrão associada à quantidade certificada de MRC.

A incerteza pode, ainda, ser calculada através de ensaios interlaboratoriais. Pode ser calculada através de uma avaliação do tipo B ou combinando os dados de controlo interno da qualidade com os resultados dos ensaios interlaboratoriais.

A componente da justeza da medição pode ser calculada do seguinte modo:

$$u_{justezamedição} = \sqrt{RMS^2 + u_{c_{ref}}^2} \quad (2.55)$$

onde

$$RMS_{justezamedição} = \sqrt{\frac{\sum \text{ErroRelativo}^2}{n}} \quad (2.56)$$

$$RSD_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times RSD_1^2 + (n_2 - 1) \times RSD_2^2 + \dots + (n_N - 1) \times RSD_N^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_N - 1)}} \quad (2.57)$$

em que n corresponde ao número de participações consideradas nos ensaios interlaboratoriais (mínimo de 3), RSD_i representa o desvio padrão relativo e N a média dos participantes.

A componente de fidelidade, $u_{fidelidade}$, pode ser determinada através de duplicados ou padrões de controlo. Pode calcular-se das duas formas e considerar a pior estimativa. Através de duplicados:

$$u_{fidelidade} = \frac{\bar{R}}{d_2} \quad (2.58)$$

onde \bar{R} representa a amplitude média relativa e d_2 é igual a 1,128. Através de padrões de controlo:

$$u_{fidelidade} = RSD \quad (2.59)$$

onde RSD corresponde ao desvio padrão relativo, expresso em percentagem.

A incerteza deve ser expressa no máximo com dois algarismos significativos e o resultado da medição não deve ser expresso com menos algarismos nem com mais casas decimais que a incerteza.

2.4 Controlo da qualidade em análises químicas

A primeira razão da existência de um laboratório químico é a necessidade de obter resultados de análises químicas. No entanto, esta missão só é cumprida se os resultados produzidos tiverem a qualidade adequada ao uso que lhes vai ser dado [11].

Após validar o método analítico, o laboratório deve exercer um controlo da sua execução, de modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm. Durante o procedimento de um método de ensaio ocorrem manipulações suscetíveis de acumular erros, tanto sistemáticos como aleatórios, que podem afetar significativamente o valor do resultado final. Assim sendo, é necessário minimizar as fontes de erro (garantia da qualidade - GQ) e controlar a sua ocorrência (controlo de qualidade - CQ) de modo a garantir e melhorar a eficácia do sistema de gestão da qualidade (SG) adotado. Sendo a garantia e o controlo da qualidade dos resultados diários um dos objetivos do SG, é necessário avaliar periodicamente a exatidão dos resultados, recorrendo ao controlo de qualidade interno (CQI) e ao controlo de qualidade externo (CQE). O controlo de qualidade interno depende

dos meios utilizados pelo próprio laboratório e o controlo de qualidade externo corresponde às ações realizadas pelo laboratório que dependem de intervenções externas ao mesmo [11, 23].

2.4.1 Controlo da qualidade interno

O controlo da qualidade interno dos métodos de ensaio corresponde ao conjunto de procedimentos realizados no Laboratório em análises de rotina, com o objetivo de permitir o controlo da qualidade dos resultados obtidos à medida que estas são executadas. O controlo da qualidade interno deve recorrer às seguintes ferramentas [23, 30]:

- Materiais de referência internos (MRI)
- Técnicas complementares de CQ de resultados
- Tratamento estatístico de dados (cartas de controlo ou outros).

A título de exemplo de técnicas complementares de CQ, tem-se:

- Análise de brancos em paralelo com amostras
- Uso de análises em replicado
- Repetição de análises anteriormente efetuadas
- Ensaio de recuperação e fortificação de amostras
- Uso do método de adição de padrão
- Comparação de resultados obtidos por diferentes técnicas analíticas.

2.4.1.1 Calibração analítica

A calibração é efetuada com o número mínimo de pontos definidos pelo fabricante, com a periodicidade definida ou sempre que considerado necessário. Os critérios de aceitação podem ser estabelecidos com base em critérios de aceitação fixos ou por uma metodologia de controlo estabelecida pelo próprio Laboratório [23].

Caso não se efetue curva de calibração na sessão de trabalho, a verificação da calibração é feita, no mínimo, com os padrões correspondentes ao limite inferior e superior da gama de trabalho.

O controlo da curva de calibração é efetuado com base nos seguintes parâmetros:

- Coeficiente de correlação da curva de calibração, de modo a avaliar a linearidade
- Declive da reta para controlo da estabilidade/sensibilidade da curva.

2.4.1.2 Brancos

O controlo dos brancos é fundamental em análises suscetíveis a contaminações. Esta técnica deve ser reforçada caso o laboratório altere os reagentes, o material de lavagem, ou outros propícios a introduzir contaminações [23, 30].

Nos ensaios em que seja aplicável a realização de um branco analítico, o resultado obtido na análise deve ser inferior ao limite de deteção do método.

2.4.1.3 Limiar analítico

A verificação periódica do limite de quantificação está associada ao controlo dos brancos analíticos. A frequência com que se controla o limiar analítico deve aumentar com a proximidade da gama baixa e a probabilidade de ocorrer contaminações, bem como com a instabilidade do sinal de fundo [23, 30].

2.4.1.4 Padrões de controlo

Os padrões de controlo são independentes dos padrões de calibração. Os reagentes, solventes e soluções utilizados para controlo da curva de calibração devem ter uma pureza e estabilidade compatíveis com a qualidade exigida pelos resultados, quer sejam preparados pelo próprio laboratório ou adquiridos comercialmente. Nas sessões de trabalho onde seja efetuada calibração deve-se analisar no mínimo um padrão, de acordo com a concentração das amostras e com a frequência definida consoante o método de ensaio [23, 30].

Os critérios de aceitação podem ser definidos com base em critérios de aceitação fixos, de acordo com o desempenho do método na fase de validação, em condições de precisão intermédia.

2.4.1.5 Duplicados

Duplicados são ensaios realizados sobre duas tomas de amostra submetidas em separado a todo o processo analítico.

A análise da amostra em duplicado não garante que o resultado final tenha um erro menor, pois caso ocorram erros sistemáticos ambos os duplicados são afetados. Porém, se ocorrer um erro acidental num dos duplicados e no outro não, então o valor médio terá um erro menor [23, 30].

A análise de duplicados deve ser considerada como uma ferramenta de detecção de erros acidentais e de controlo da repetibilidade e, por isso, recomenda-se que a frequência da sua realização não seja inferior a 5%.

O uso de duplicados é particularmente recomendado para análises com vários passos e fontes de erro, bem como para novas amostras ou amostras de difícil homogeneização e/ou estabilidade. Também deve ser usado para treino de novos analistas ou domínio e aprendizagem de novos ensaios.

O resultado dos duplicados é avaliado através da diferença relativa (DR), expressa em percentagem, para resultados quantificáveis:

$$DR = \frac{|A - D|}{\bar{X}} * 100 \quad (2.60)$$

onde A corresponde ao resultado da amostra, D ao resultado do duplicado e \bar{X} é a média aritmética dos resultados da amostra e do duplicado.

O resultado final da amostra é dado pela média aritmética dos dois resultados obtidos, desde que a diferença relativa entre eles cumpra o critério de aceitação definido.

2.4.1.6 Ensaios de recuperação

A taxa de recuperação tem com objetivo verificar se existem efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas (efeitos de matriz). Consiste na adição de uma quantidade controlada de padrão a uma amostra, para verificar a quantidade de analito que se consegue obter. A taxa de recuperação pode ser calculada do seguinte modo:

$$\%Rec = 100 \times \frac{|c_f - c_i|}{c_a} \quad (2.61)$$

onde c_f corresponde à concentração obtida após fortificar a amostra, c_i é a concentração da amostra e c_a corresponde à quantidade de fortificação da amostra [23, 30].

A “recuperação” relaciona-se com a quantidade de analito recuperada no processo relativamente à quantidade real presente na amostra.

Os ensaios de recuperação devem ser realizados ao longo de toda a gama de trabalho e deve-se efetuar uma fortificação em cada dia de trabalho. No caso de métodos instrumentais que possam induzir perdas ou contaminações, a realização de ensaios de recuperação na matriz a analisar junto do LQ deve ser feita mais regularmente.

O critério de aceitação para a recuperação é normalmente 80-120%. Todavia, o laboratório pode definir outro critério, de acordo com o desempenho e/ou a complexidade do método.

2.4.1.7 Cartas de controlo

As cartas de controlo fazem parte integrante do controlo da qualidade interno dos resultados, sendo aceites internacionalmente como um dos meios mais eficientes para visualizar um controlo contínuo de resultados e detetar erros. São fáceis de usar e permitem detetar anomalias repentinas nos resultados e variações lentas de resultados, indicativas de problemas. A intervenção imediata, em caso de anomalias, reduz os riscos de rejeição de produtos e erros nos resultados [23, 30, 35].

Embora existam vários tipos de cartas de controlo, utilizam-se as cartas de controlo de indivíduos e amplitudes móveis para resultados individuais e as cartas de controlo da média e de amplitudes para resultados médios. Ambas podem ser aplicadas em diversos parâmetros, tais como: brancos, padrões de controlo, ensaios de recuperação, entre outros. As cartas de médias ou de indivíduos representam, ao longo do tempo, um determinado parâmetro ou uma média em função do teor. As cartas de amplitude ou de amplitudes móveis representam, ao longo do tempo, a diferença de valores entre vários ensaios repetidos do mesmo material ou de materiais diferentes dentro de uma determinada gama de trabalho.

De modo a elaborar qualquer uma das cartas de controlo acima mencionadas, é necessário:

- Definir o que se pretende controlar
- Caracterizar o processo referido
- Definir a periodicidade de análise
- Definir o momento da análise do processo durante o ensaio
- Recolher, no mínimo, cerca de 20 a 25 observações do processo nas condições pré-estabelecidas.

As cartas de controlo contêm um conjunto de linhas que permitem saber se o processo está ou não sob controlo:

- Linha central - é uma linha que pode corresponder à média das leituras efetuadas ou à média dos desvios verificados - \bar{X} .
- Limite superior de controlo - é uma linha que pode corresponder ao valor da linha central acrescida de $3s$ (situação mais comum), onde s representa o desvio padrão da grandeza a ser controlada - $\bar{X} + 3s$.
- Limite inferior de controlo - é uma linha que pode corresponder ao valor da linha central subtraída de uma grandeza definida por $3s$ - $\bar{X} - 3s$.
- Limite Superior de Alerta - linha que alerta o analista de que está a entrar numa zona de perigo. Corresponde ao valor da linha central acrescida de $2s$ - $\bar{X} + 2s$.
- Limite Inferior de Alerta - linha que alerta o analista que pode estar a entrar numa zona de perigo. Corresponde ao valor da linha central subtraída de $2s$ - $\bar{X} - 2s$.

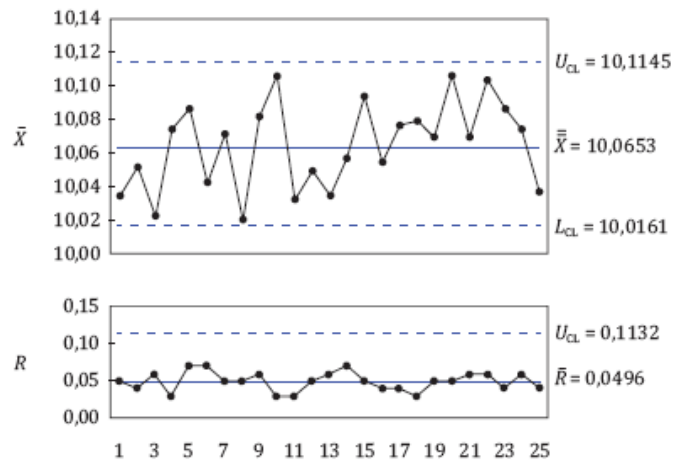


Figura 2.3. Exemplo de uma carta de amplitudes e de indivíduos [36].

Devem ser efetuadas ações corretivas no caso das seguintes situações anômalas:

- Sempre que o ponto obtido experimentalmente esteja fora da linha superior ou inferior de controlo.
- Sempre que se verifiquem 9 pontos registados sistematicamente acima ou abaixo da linha central.
- Sempre que forem registados 6 pontos a subir ou a descer, mesmo que intercetem a linha central.
- Sempre que forem registados 14 pontos em torno e próximos da linha central.
- Sempre que forem observados 2 ou 3 pontos entre as linhas de aviso e as linhas de controlo.
- Sempre que se verifiquem 8 pontos registados em ambos os lados da linha central com o nono ponto na linha central, com uma função quase sinusoidal.

Depois de confirmada a estabilidade da carta de controlo, deve-se comparar os limites da carta com os critérios de aceitação definidos no método e decidir se a carta deve ser colocada em rotina. Se os limites forem concordantes com os critérios de aceitação, deve-se manter os critérios fixos definidos. Caso contrário, deve-se avaliar se se justifica efetuar um ajuste nos critérios de aceitação estabelecidos, de modo a aproximarem-se aos limites da carta, tendo em conta as exigências legais ou normativas para o ensaio em causa, ou ponderar a construção de outro tipo de carta de controlo que se ajuste melhor à realidade do método.

2.4.2 Controlo da qualidade externo

O controlo da qualidade externo tem como objetivo avaliar a exatidão dos resultados obtidos num determinado método de ensaio. Este pode ser avaliado através da participação em ensaios interlaboratoriais ou de materiais de referência certificados. Caso não existam MRC ou EIL, o

laboratório pode utilizar como métodos alternativos de avaliação da exatidão ou evidência da comparabilidade dos resultados com outros laboratórios, os seguintes métodos:

- Padrões nacionais ou internacionais, devidamente reconhecidos pelo setor técnico
- Comparação com métodos de referência
- Ensaios em paralelo com outro laboratório acreditado

A aceitação dos resultados é feita com base no erro percentual relativo [23, 30].

Capítulo 3

Experimental

3.1 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica analítica utilizada na separação, identificação e quantificação de componentes químicos presentes numa mistura, com base na diferença dos seus coeficientes de partição entre duas fases. Esta técnica de separação pode ser líquida ou gasosa, de acordo com o estado físico da fase móvel utilizada. Num processo cromatográfico, a mistura que se pretende analisar é introduzida num sistema constituído por um fluido (fase móvel) que circula numa fase estacionária (sólida ou líquida, aderente a um suporte sólido poroso) com grande área superficial e que permanece imóvel ao longo de todo o processo. Estas fases são escolhidas de modo a que os componentes da amostra tenham diferente solubilidade em cada fase. Isto é, um componente que seja completamente solúvel na fase estacionária demora mais tempo a percorrê-la do que um componente que não o seja. As substâncias que têm maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, portanto, separadas daquelas de menor interação. Deste modo, a mistura é separada tendo em conta o tempo de retenção (t_r) dos compostos na coluna cromatográfica, sendo os tempos de retenção característicos de cada composto. Podemos, então, definir o tempo de retenção como o tempo decorrido desde a injeção de um componente na coluna até à sua deteção à saída do sistema. Gráficamente, o tempo de retenção corresponde ao tempo medido desde o instante de injeção da amostra até ao máximo do pico do componente, traduzindo o tempo de permanência do composto na coluna. As condições cromatográficas utilizadas devem ser constantes e bem definidas, pois os t_r dependem do comprimento da coluna, da fase estacionária usada, da temperatura do forno da coluna, do fluxo de gás transportador e do tipo de gás utilizado [37-42].

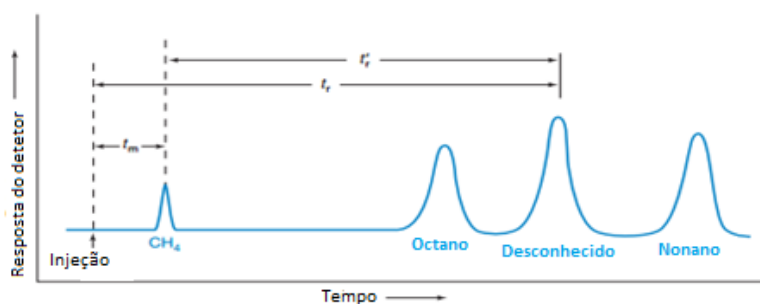


Figura 3.1. Esquema representativo de um cromatograma (Adaptado [42]).

O processo de passagem de líquidos ou gases através de uma coluna cromatográfica é designado por eluição. O fluido que entra na coluna é denominado por eluente e o que emerge a partir da extremidade da coluna é designado por eluato.

Os dados obtidos da análise cromatográfica são adquiridos por um computador, originando um cromatograma, que é um gráfico que mostra a resposta do detetor em função do tempo de eluição. Cada pico representa um componente da mistura separada e o t_r identifica o analito. Trata-se de uma propriedade física da substância a analisar e depende das condições de separação, tais como temperatura, taxa de fluxo e composição química da fase estacionária. A solubilidade da substância a analisar na fase estacionária baseia-se na energia das interações intermoleculares entre o analito e a fase estacionária e é o fator mais importante na determinação do tempo de retenção. Após a execução da calibração analítica com vários padrões para cada componente, determina-se a quantidade de analito presente na amostra com base na área do pico obtida e na quantidade de amostra injetada.

A cromatografia divide-se em categorias consoante o mecanismo de interação do soluto com a fase estacionária: cromatografia de adsorção, cromatografia de partição, cromatografia de troca iónica, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia por afinidade. Na cromatografia de adsorção, utiliza-se uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida ou gasosa. O soluto é adsorvido sobre a superfície das partículas sólidas e a separação depende da diferente afinidade dos componentes da amostra à superfície de um sólido ativo. Quanto maior for a adsorção do soluto, maior é o seu t_r na coluna. Na cromatografia de partição, a separação deve-se às diferenças de solubilidade dos componentes da amostra na fase estacionária, no caso da cromatografia gasosa, ou das diferenças de solubilidade nas fases móvel e estacionária, na cromatografia líquida. Na cromatografia de troca iónica a separação baseia-se na diferente capacidade dos compostos iónicos ou ionizados permutarem com iões da fase estacionária. A coluna tem uma fase estacionária ionicamente carregada com carga oposta aos iões da amostra. Esta técnica é usada quase exclusivamente com compostos iónicos ou ionizáveis. Quanto mais forte for a carga sobre o composto, mais forte é a atração para a superfície iónica e, portanto, mais tempo vai demorar a eluir. A fase móvel é um tampão aquoso onde o pH e a força iónica são utilizados para controlar a eluição. Na cromatografia de exclusão molecular, também designada de filtração em gel ou cromatografia de permeação em gel, a separação é feita de acordo com o tamanho dos solventes moleculares. A fase móvel líquida ou gasosa passa através de um gel poroso, onde os poros são pequenos o suficiente para excluir grandes moléculas de soluto, mas não os pequenos. As moléculas pequenas levam mais tempo para passar através da coluna porque entram no gel e, por conseguinte, têm que fluir através de um maior volume antes de deixar a coluna. A cromatografia de afinidade emprega interações específicas entre um tipo de molécula de soluto e uma segunda molécula que está ligada de forma covalente (imobilizada) para a fase estacionária. Por exemplo, a molécula imobilizada pode ser um anticorpo para uma proteína particular. Quando uma mistura que contém mil proteínas passa através da coluna, apenas a proteína que reage com o anticorpo se liga à coluna. Depois de todos os outros

solutos atravessarem a coluna, a proteína desejada é desalojada por alteração do pH ou da força iónica.

Os métodos cromatográficos são demorados, uma vez que envolvem longos períodos de tempo no tratamento das amostras e no traçado da curva de calibração. São dispendiosos, devido à pureza elevada dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da manutenção associada, e tóxicos para o meio ambiente, uma vez que as fases móveis são, geralmente, solventes orgânicos. Contudo, fornecem resultados analíticos de boa precisão e exatidão.

3.1.1 Cromatografia Gasosa

O termo cromatografia gasosa (GC) refere-se a uma técnica de separação que envolve duas fases distintas: uma fase estacionária, a qual pode ser sólida ou líquida, e uma fase móvel, um gás que passa sobre a fase estacionária e que transporta a amostra. Este deve ser um gás inerte relativamente à amostra e à fase estacionária, muitas vezes designado por gás de arraste. Uma vez que o gás de arraste transporta o analito na fase de vapor ao longo da coluna, deve ser inerte, não tóxico, de baixo custo, de elevada pureza e com uma grande eficiência de transporte com o mínimo alargamento dos picos. No caso da coluna empacotada o nitrogénio é o gás de arraste mais utilizado, seguido pelo hélio. No caso da coluna capilar ou tubular aberta, o gás de arraste mais usado é o hélio, seguido por hidrogénio e nitrogénio. A fase estacionária é uma película fina de líquido que pode revestir a superfície de partículas inertes sólidas contidas numa coluna de aço inoxidável ou vidro (coluna de enchimento), ou que pode constituir um filme líquido que reveste as paredes interiores de uma coluna capilar de sílica fundida [37-42].

O tipo de entrada e a técnica de injeção estão relacionados e são determinados pelo tipo de coluna, propriedades da amostra e sensibilidade analítica necessária. As amostras são, geralmente, injetadas diretamente na extremidade da coluna. No caso de colunas capilares, as amostras são, geralmente, injetadas numa câmara separada da coluna, vaporizadas e transferidas para a coluna na fase de vapor.

A injeção *split* baseia-se na ideia de que a amostra injetada é rapidamente vaporizada, mistura-se homogeneamente com o gás de transporte e separa-se, de tal modo que uma fração conhecida da mistura seja transferida rapidamente para a coluna e a restante vai para o lixo. Tudo isto é realizado rapidamente, gerando picos cromatográficos muito definidos. A amostra injetada é vaporizada no interior de um *liner*, que é usado para proporcionar um espaço inerte. A injeção *splitless* é realizada fechando a separação de ventilação antes e durante a injeção, deixando-a fechada por um tempo após a injeção. Isto permite que quase toda a amostra injetada vaporize e entre na coluna. A separação de ventilação é aberta para remover qualquer amostra restante à entrada. Na injeção na coluna a amostra líquida é injetada diretamente na coluna, sem passar por um injetor quente. A temperatura inicial da coluna é suficientemente baixa para condensar os solutos. As amostras são

submetidas a uma temperatura que seja o mais baixa possível, para que ocorra pouca perda de soluto. Os componentes da amostra concentram-se e separam-se da matriz por condensação numa câmara de arrefecimento, antes da separação cromatográfica. A injeção na coluna é utilizada para as amostras que se decompõe acima dos seus pontos de ebulição.

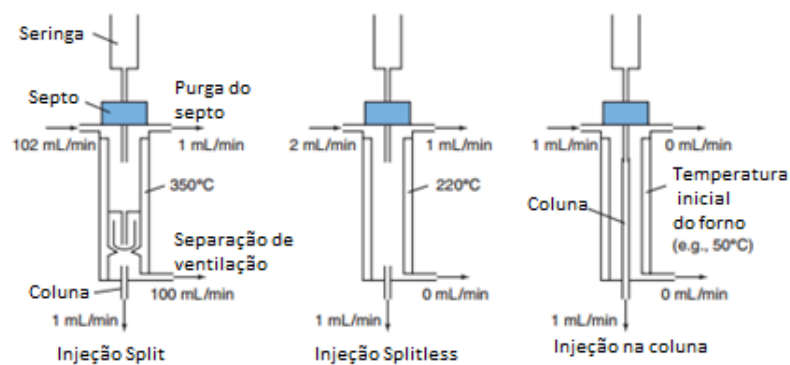


Figura 3.2. Esquema das condições de injeção split, slitless e injeção na coluna [42].

Uma vez que a temperatura é a variável controlada pelo utilizador mais importante em GC, a coluna encontra-se dentro de um forno de temperatura programada. O forno e a coluna devem ser de massa térmica baixa, de modo a permitir o rápido aquecimento e arrefecimento. Durante a análise, o forno pode operar em dois modos: isotérmico e de temperatura programada, isto é com um aumento linear da temperatura.

A amostra a analisar pode ser um líquido ou um gás. No primeiro caso injetam-se alguns microlitros de amostra na câmara de injeção e, devido à temperatura a que esta se encontra, passam para a fase gasosa. Caso a amostra seja um gás, pode ser introduzido um volume maior de amostra na câmara de injeção. A amostra vaporizada é transportada por uma corrente de gás através de uma coluna empacotada. Este gás que contém a amostra vaporizada passa pela coluna capilar, onde se encontra a fase estacionária, também designada por coluna cromatográfica, através da qual os componentes da amostra se deslocam a velocidades influenciadas pelo grau de interação de cada componente com a fase estacionária não volátil. Estes são eluídos da coluna consoante a solubilidade relativa de cada um na fase estacionária, as respetivas pressões parciais de vapor e o fluxo de gás transportador. As substâncias que têm maior interação com a fase estacionária são retidas por mais tempo e, portanto, separadas daquelas de menor interação.

A seleção da coluna cromatográfica deve ser baseada na eficiência da coluna. Esta deve ser adequada à complexidade da amostra que se pretende analisar e na afinidade entre a fase estacionária e as substâncias a separar.

Normalmente, o GC possui acoplado um instrumento com a capacidade de quantificar os compostos que foram previamente separados, denominado por detetor. O detetor deve ser altamente sensível e ter um tempo de resposta rápido.

3.1.1.1 Cromatografia Gasosa associada a detetor MS/MS

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é um processo analítico muito poderoso, uma vez que permite analisar qualitativa e quantitativamente a amostra num único instrumento. Ou seja, o GC-MS não só separa os componentes de uma mistura complexa, como também recolhe o espectro de massa de cada componente, conseguindo expressar dois tipos de informação de dimensões separáveis sobre os componentes da amostra: t_r obtido por GC e MS obtido por ionização de eletrões. O t_r obtido através do GC está relacionado com propriedades químicas específicas das moléculas presentes na amostra (volatilidade, polaridade, presença de grupos funcionais específicos), enquanto o peso molecular é indicador da composição atómica [37-42].

Num sistema GC-MS, as amostras provenientes do cromatógrafo a gás entram no espectrómetro de massa, para a fonte de iões ou interface.

Os dois métodos de ionização empregues em GC-MS são: ionização por impacto eletrónico (Ei) e ionização química (Ci). Na ionização por impacto eletrónico o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com eletrões de alta energia. As moléculas do analito absorvem esta energia e ocorre a remoção de um eletrão por parte das moléculas que não recebem energia suficiente para fragmentar, formando iões positivos com a mesma massa nominal da molécula neutra. Este processo requer tipicamente 10 eV e a restante energia gera fragmentação dos analitos. No aparelho são detetados apenas os fragmentos catiónicos e os iões moleculares de carga unitária. Na ionização química as moléculas de analito em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrómetro de massa que contem um gás reagente. Esta mistura é bombardeada com eletrões, tal como na ionização por impacto eletrónico. Como o gás reagente está em excesso relativamente ao analito, é ionizado quase exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os iões em fase gasosa e as moléculas neutras de analito. Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observada fragmentação.

De seguida, os iões são encaminhados para o analisador, que é a parte do espectrómetro na qual são definidas as características da determinação. Os analisadores de massa mais usados em GC-MS são: analisador de massa de setor magnético, quadrúpolos, aprisionamento de iões (Ion Trap) e analisador do tempo de voo (TOF).

Para o trabalho em questão, é utilizado um espectrómetro de massa com ionização por impacto eletrónico e analisador Ion Trap com possibilidade de MS/MS. Na fonte iónica são produzidos iões a partir da amostra, os quais são separados no analisador de acordo com a razão massa/carga, sendo determinada a sua massa e abundância no detetor. Os iões originados são injetados por um sistema de lentes no interior do analisador de aprisionamento de iões que é constituído por três eléctrodos. Os iões ficam aprisionados na cavidade da armadilha iónica por ação de campos eléctricos e gera-se uma rampa de radiofrequência aplicada ao eléctrodo que rodeia a câmara. À medida que aumenta a voltagem da radiofrequência, aumenta a amplitude do movimento oscilatório induzido dos iões até ao momento em que saem da câmara, sendo detetados por um

sistema de dínodos e multiplicador eletrónico. Aumentando a voltagem da radiofrequência aplicada, vão-se destabilizando os iões de massa crescente, pelo que as diferentes massas presentes são detetadas de forma sequencial no tempo, existindo uma correlação entre voltagem aplicada e massa detetada. O espectro de massa obtido tem origem na mudança rápida dos parâmetros operacionais do analisador no tempo. Se a fonte de ionização for externa ao analisador, permite a separação entre a ionização e a análise, ou seja, enquanto os iões são pulsados para a armadilha para análise, a maior parte das moléculas neutras são retiradas através do vácuo. Deste modo, garante-se a integridade dos iões evitando possíveis interações ião-molécula durante o tempo de permanência na câmara, mantém-se o analisador limpo e obtêm-se espetros comparáveis com as bibliotecas de MS reconhecidas.

O sistema de deteção usado deve permitir alcançar o nível de deteção mínimo necessário para a determinação que se pretende realizar. A deteção pode ser efetuada através de espectro de massa total, isto é, varrimento total (Full Scan) ou monitorização seletiva de iões (SIM), bem como por técnicas MS-MS no modo de varrimento total.

Em resumo, cada componente da amostra, ao chegar ao detetor, origina um sinal elétrico proporcional à quantidade de iões originados pelo composto. O registo é feito sob a forma de um cromatograma ou perfil de corrente iónica total (TIC) em que se tem a representação dos picos correspondentes à abundância de todos os iões no detetor em função do tempo. O *software* utilizado deve permitir obter, a partir do TIC, o registo da abundância dos iões de uma massa específica *versus* tempo, o qual se designa por perfil de corrente iónica extraída (PCIE). Da análise do TIC obtém-se informação sobre o tempo de retenção e a área de cada pico. A identificação dos vários componentes da amostra é efetuada com base nos tempos de retenção e na análise dos espectros de massa correspondentes a cada pico. O *software* do equipamento processa o sinal obtido através da análise. Este possui uma livreria que identifica os iões e os associa aos respetivos compostos. Os compostos são identificados e quantificados por dois iões específicos denominados por iões de quantificação.

No contexto do estágio, esta metodologia é utilizada para analisar compostos orgânicos voláteis (VOC) e pesticidas.

3.1.1.1.1 Análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) por GC-MS

A designação de VOC está associada a compostos orgânicos que possuam baixo ponto de ebulição. Os compostos orgânicos voláteis pesquisados são clorofórmio, bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM), bromofórmio, tricloroetileno (TriCE) e tetracloroetileno (TetraCE), 1,2-Dicloroetano (1,2-DCE) e benzeno. Destes, os últimos dois são analisados quantitativamente e os restantes qualitativamente, em águas naturais destinadas ao consumo humano e águas naturais superficiais ou subterrâneas por GC-MS.

A amostra é colocada num frasco de vidro fechado com uma cápsula de alumínio e um septo de silicone com face de teflon. Durante um certo intervalo de tempo e a uma certa temperatura estabelece-se, no forno do autoamostrador, o equilíbrio entre a fase de vapor e a amostra, o chamado período de incubação. A injeção da fase de vapor é realizada através de uma seringa de micro-extração em fase sólida (SPME) que adsorve os analitos numa fibra de polidimetilsiloxano (PDMS). Esta é introduzida no injetor do GC-MS onde os compostos são extraídos diretamente para a coluna capilar, sendo separados e medidos num detetor de massas após a eluição da coluna. A exposição da fibra no injetor *split/splitless* do cromatógrafo vai permitir a dessorção térmica dos compostos retidos no revestimento da fibra.

A concentração dos compostos voláteis na fase de vapor depende da pressão parcial de vapor de cada componente nas condições de incubação. A lei de Henry, para uma mistura binária de um soluto i é:

$$P_i = X_i \gamma_i P_i^0 \quad (3.1)$$

onde P_i corresponde à pressão parcial de vapor do soluto, x_i corresponde à fração molar do soluto i , γ_i é o coeficiente de atividade do soluto na solução e P_i^0 é a pressão de vapor do soluto a uma dada temperatura. Quanto maior for a pressão parcial do composto, maior é a quantidade de composto injetada e maior é a sua resposta no detetor, ou seja, maior é a área do pico correspondente.

A quantificação de cada composto é efetuada por comparação com o sinal medido para padrões puros. A identificação dos compostos detetados é efetuada por comparação dos tempos de retenção e pela análise dos dados dos espectros de massa.

Na tabela abaixo encontra-se representado o tempo de retenção e os iões de quantificação dos VOC analisados no decorrer do estágio.

Tabela 3.1. Representação do tempo de retenção e dos iões de quantificação dos VOC's analisados no decorrer do estágio.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo)

Composto	t_r / (min)	Ião quantificação (m/z)	Ião 1 Qualificação (m/z)	Ião 2 Qualificação (m/z)	Ião 3 Qualificação (m/z)	Ião 4 Qualificação (m/z)
1,2-DCE	3,06	62	64	---	---	---
Benzeno	3,16	78	77	---	---	---
Fluorobenzeno	3,44	96	---	---	---	---
Clorofórmio	2,69	---	83	85	47	---
TriCE	4,14	---	130	132	95	60
BDCM	4,51	---	83	85	129	47
DBCM	7,42	---	127	129	48	131
TetraCE	7,52	---	166	164	129	131
Bromofórmio	10,70	---	173	175	91	92

O *software* estabelece uma curva de calibração para cada analito efetuando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, entre as razões das áreas (Área/Área PI) e as concentrações padrão (*c*). A forma algébrica da equação da reta é dada por:

$$\frac{\text{Área}}{\text{Área PI}} = ord + m \times c \quad (3.2)$$

onde *ord* é a ordenada na origem, *PI* é o padrão interno e *m* é o declive da reta.

A concentração de cada analito na amostra é dada pela expressão:

$$c = \frac{\left(\frac{\text{Área}}{\text{Área PI}}\right) - ord}{m} \quad (3.3)$$

Se a amostra tiver sido diluída, multiplica-se o valor obtido pelo fator de diluição.

3.1.1.1.1 Interferências

As interferências na determinação de VOC por GC-MS podem ser produzidas por contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Pode ser devido, também, a contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem como na análise, pois normalmente estes contêm compostos voláteis que podem contaminar as amostras com os próprios analitos ou com outros compostos interferentes. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes.

O ambiente do laboratório onde se preparam as amostras e os padrões também pode constituir uma fonte de contaminação. Deve garantir-se, que a seringa e o sistema cromatográfico são devidamente descontaminados de modo a minimizar as interferências.

3.1.1.1.2 Análise de pesticidas por GC-MS/MS

Os pesticidas analisados no decorrer do estágio foram os seguintes: diclorvos, molinato, desetilatrizona (DEA), desetilterbutilazina (DET), atrazina, terbutilazina, alacloro, S-metolacloro, clorfenvinfos, hexaclorobenzeno (HCB), lindano, heptacloro, aldrina, heptacloro epóxido, endossulfão I, dieldrina, endossulfão II. Estes são determinados por GC-MS e quando quantificam é realizada uma nova sessão por GC-MS/MS, em águas destinadas ao consumo humano e águas

naturais superficiais ou subterrâneas, onde se prepara um padrão de concentração semelhante à da amostra e são lidos um a seguir ao outro.

Todos os anos é publicada uma lista dos pesticidas a analisar em cada região. Essa lista pode ser consultada no *site* ERSAR. Os pesticidas a analisar na região de Coimbra, mencionados na Zona do Baixo Vouga e Litoral, no ano de 2015 são alacloro, atrazina, bentazona, diurão, linurão, tebuconazol, e terbutilazina. No caso de captações de águas subterrâneas devem ser pesquisados apenas alacloro, atrazina, diurão, linurão e terbutilazina, devido às suas características de persistência e mobilidade.

Os pesticidas são removidos da matriz por extração líquido-líquido. O extrato é concentrado por evaporação e o resíduo é recuperado no solvente usado na extração. Uma parte do extrato é diretamente injetado no sistema de GC-MS, onde os analitos presentes na amostra são separados, através de uma coluna capilar, e medidos pelo sinal originado no detetor de massa. A quantificação de cada composto é efetuada por comparação com o sinal medido para os padrões puros. A identificação dos compostos detetados é efetuada por comparação dos t_r e pela análise dos dados dos espetros de massa.

Nas tabelas abaixo encontram-se representados, respetivamente, o tempo de retenção e número de massa dos iões de diagnóstico utilizados na deteção por monitorização seletiva de iões (SIM) para a quantificação de pesticidas analisados no decorrer do estágio e o número de massa dos iões percursores utilizados na deteção por MS/MS dos mesmos.

Tabela 3.2. Representação do tempo de retenção e número de massa dos iões de diagnóstico utilizados na deteção por SIM para a quantificação de pesticidas.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo.)

Composto	t_r / (min)	Ião quantificação (m/z)	Ião 1 Qualificação (m/z)	Ião 2 Qualificação (m/z)
Nitrobenzeno-d5	10,65	128	---	---
Diclorvos	13,02	109	185	79
Molinato	17,23	126	98	55
Desetilatrazina	18,69	172	174	187
Desetilterbutilazina	18,87	186	145	188
Atrazina	19,95	200	215	173
Terbutilazina	20,35	214	173	216
Alacloro	22,42	160	188	146
S-metolacloro	23,57	162	238	163
Clorfenvinfos	24,84	267	269	323
HCB	15,95	284	142	286
Lindano	16,90	181	219	109
Heptacloro	19,06	272	100	65
Aldrina	20,28	263	293	66
Heptacloro epóxido	21,68	353	263	81
Endossulfão I	23,09	241	159	339
Dieldrina	24,28	79	263	277
Endossulfão II	26,13	241	159	339

Tabela 3.3. Representação do número de massa dos íons precursores utilizados na detecção por MS/MS para a quantificação de pesticidas analisados no decorrer do estágio.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo.)

Composto	Íon precursor (m/z)	Íon produto 1 (m/z)	Íon produto 2 (m/z)
Diclorvos	109	79	93
Molinato	126	98	83
Desetilatrizona	172	130	105
Desetilterbutilazina	186	145	169
Atrazina	215	200	173
Terbutilazina	214	216	173
Alacloro	188	160	132
S-metolacloro	238	162	132
Clorfenvinfos	267	269	203
HCB	284	249	214
Lindano	181	145	109
Heptacloro	272	237	235
Aldrina	263	193	227
Heptacloro epóxido	353	317	263
Endossulfão I	241	206	170
Dieldrina	263	227	193
Endossulfão II	241	205	170

O *software* estabelece uma curva de calibração para cada analito efetuando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, entre as razões das áreas (Área/Área PI) e as concentrações padrão (c). A forma algébrica da equação da reta é dada pela equação 3.3.

A concentração de cada analito na amostra obtém-se a partir da concentração medida para o extrato corrigida com o fator de concentração da amostra:

$$FC = \frac{V_{amostra}}{V_{extrato}} \quad (3.4)$$

onde

$$c_{amostra} = \frac{c}{FC} \quad (3.5)$$

Se a amostra tiver sido diluída, multiplica-se o valor obtido pelo fator de diluição.

3.1.1.1.2.1 Interferências

As interferências na determinação de pesticidas por GC-MS podem ocorrer por contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha

de base nos cromatogramas. Podem ocorrer, também, devido a contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem e na análise, como também no processo de extração. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes.

Deve-se garantir, também, que a seringa e o sistema cromatográfico são devidamente descontaminados de modo a minimizar as interferências.

3.1.1.2 Cromatografia Gasosa associada a detetor de captura de eletrões

A cromatografia gasosa associada a detetor de captura de eletrões (GC-ECD) é empregue na deteção de compostos altamente eletronegativos, tais como compostos halogenados.

A célula do ECD é revestida, internamente, por uma lâmina do isótopo radioativo de níquel-63. As partículas β emitidas pelo isótopo colidem com as moléculas do gás transportador e ionizam o gás azoto que entra no detetor. Os eletrões resultantes migram para o ânodo coletor, produzindo uma corrente elétrica. Esta reação forma uma nuvem de eletrões estáveis e livres na célula detetora do ECD. O sistema elétrico do ECD trabalha no sentido de manter a corrente elétrica constante, através de pulsos periódicos.

Após a separação na coluna cromatográfica do GC os compostos entram no detetor, que os mede quantitativamente através da queda de corrente que se verifica na nuvem eletrônica. A resposta do detetor surge sob a forma de um cromatograma em forma de picos ou bandas cujas intensidades dependem da concentração da substância e da sensibilidade do detetor.

Trata-se de um detetor não destrutivo e altamente sensível, ideal para a análise de pesticidas e agrotóxicos clorados [37-40, 42].

3.1.1.2.1 Análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) por GC-ECD

Os VOC clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano, bromofórmio, tricloroetileno e tetracloroetileno são analisados por GC-ECD em águas destinadas ao consumo humano e águas naturais superficiais ou subterrâneas. Estes são designados por trihalometanos (THM) e por solventes clorados, no caso do tricloroetileno e do tetracloroetileno.

Os analitos existentes na amostra são removidos da matriz, por aquecimento da amostra num vial fechado hermeticamente, libertando-se para o espaço vazio situado acima do nível de água (espaço de cabeça ou “headspace”). Uma parte desse espaço é diretamente injetado com seringa num cromatógrafo a gás, onde os analitos presentes são separados através de uma coluna capilar e medidos pelo sinal que originam num detetor de captura de eletrões.

A concentração dos compostos voláteis na fase vapor depende da pressão parcial de vapor de cada componente nas condições de incubação, já referido anteriormente.

A identificação e quantificação de cada composto é efetuada por comparação com o sinal medido para padrões puros.

Na tabela abaixo encontra-se representado o tempo de retenção dos VOC analisados no decorrer do estágio.

Tabela 3.4. Exemplo da sequência de eluição.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo)

Composto	Tempo de Retenção / (min)
Clorofórmio	10,19
TriCE	12,46
BDCM	13,53
DBCM	16,37
TetraCE	17,05
1,2-Dibromopropano	19,13
Bromofórmio	21,01

A concentração de cada analito na amostra é dada pelo *software*, sendo calculada a partir da equação da curva de calibração. Se a amostra tiver sido diluída, multiplica-se o valor obtido pelo fator de diluição.

3.1.1.2.1.1 Interferências

As interferências na determinação de VOC por GC-ECD podem ocorrer por contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subida da linha de base nos cromatogramas. Podem ocorrer, também, devido a contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem como na análise, uma vez que contêm compostos voláteis que podem contaminar as amostras com os próprios analitos ou com outros compostos interferentes. Deste modo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes.

O ambiente do laboratório onde se preparam as amostras e os padrões também pode constituir uma fonte de contaminação. Deve-se garantir, também, que a seringa e o sistema cromatográfico foram devidamente descontaminados de modo a minimizar as interferências.

3.1.1.3 Cromatografia Gasosa associada ao detetor de ionização por chama (FID)

O eluente à saída da coluna é misturado com hidrogénio que atravessa uma chama alimentada por ar. Existe uma diferença de potencial (d.d.p.) entre a saída da coluna e o eléctrodo coletor. O analito, depois de queimado na chama, gera uma nova corrente de iões que vai ser recolhida no eléctrodo coletor e a corrente de ionização resultante é amplificada e enviada para o sistema de aquisição de dados [37-42].

O detetor é aquecido a uma temperatura um pouco superior à do injetor e é independente do valor da temperatura do forno, sendo que este já deve estar a uma temperatura elevada antes da ignição. O aquecimento evita a condensação da água a partir da chama.

A amostra é injetada em fluxo contínuo, misturando-se com uma solução aquosa de ácido clorídrico (HCl) e com uma corrente de azoto. O carbono inorgânico contido na amostra, na forma de carbonatos e de hidrogenocarbonatos, reage com o ácido dando origem a dióxido de carbono (CO₂) que é arrastado pela corrente de azoto para a atmosfera.

A fase líquida que contém o carbono orgânico solúvel é introduzida num reator de oxidação, formado por óxido de níquel (NiO), onde o carbono orgânico é convertido a CO₂ por combustão. A corrente de azoto transporta os produtos da combustão ao longo do sistema e a água formada neste processo é eliminada ao passar na coluna cromatográfica.

Uma nova corrente de azoto possibilita a dessorção de CO₂ da coluna cromatográfica, misturando-o com hidrogénio e arrastando ambos para o reator de redução. Aqui, o CO₂ é reduzido a metano por reação catalisada por Ni. O metano formado nesta reação segue para o detetor de ionização de chama, dando origem a um sinal elétrico proporcional à quantidade de carbono orgânico existente na amostra no início do processo. O sinal do detetor é registado pelo computador sob a forma de um cromatograma representativo do teor de carbono orgânico.

A identificação do carbono presente na amostra baseia-se no tempo de retenção, em condições cromatográficas constantes e bem definidas. A área do pico traduz a quantidade de carbono na amostra.

3.1.1.3.1 Análise elementar - carbono orgânico total (TOC)

No âmbito do estágio, foi determinado o teor de carbono orgânico total em águas naturais e águas de consumo humano e de processo.

Antes da determinação do TOC, o carbono inorgânico é eliminado da amostra de água acidificada. O carbono orgânico presente na amostra é oxidado a dióxido de carbono através da combustão num reator de NiO. Por reação catalisada com Ni, o dióxido de carbono formado é

reduzido a metano, o qual vai ser determinado num detetor de ionização de chama. A quantificação do TOC é efetuada por comparação com o sinal medido para padrões puros de hidrogenoftalato ácido de potássio.

A concentração de TOC na amostra é obtida pelo *software* e calculada a partir da reta de calibração. Sempre que a amostra tiver sido diluída, o valor obtido para a concentração tem de ter em conta o fator de diluição.

3.1.1.3.1.1 Interferências

As interferências na determinação de carbono orgânico total podem ocorrer por contaminação de reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Podem ocorrer, também, devido a contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem como na análise. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes.

Deve-se garantir, ainda, que o sistema cromatográfico seja devidamente descontaminado de modo a minimizar as interferências.

3.1.2. Cromatografia Líquida

O termo cromatografia líquida (LC) é aplicado a qualquer procedimento cromatográfico em que a fase móvel seja um líquido. Trata-se de uma técnica de separação de vários componentes de uma mistura que se distribuem entre duas fases: a fase estacionária, um líquido de elevado peso molecular que retarda seletivamente os componentes, e a fase móvel, um líquido que passa sobre a fase estacionária e que transporta a amostra. A fase estacionária é uma película fina de líquido que reveste a superfície de partículas inertes sólidas contidas numa coluna de aço inoxidável.

A amostra é introduzida na válvula de injeção (*loop*) e é transportada pela fase móvel ao longo da coluna cromatográfica, onde ocorre a separação dos vários componentes. Estes são eluídos da coluna consoante a diferença de solubilidade de cada um na fase estacionária e na fase móvel [37-42].

A escolha da coluna cromatográfica deve basear-se na afinidade entre a fase estacionária e as substâncias a separar e na eficiência da coluna, que deve ser adequada à complexidade da amostra a analisar.

Em cromatografia líquida de elevada eficiência (HPLC) aplica-se pressão de modo a acionar a passagem da fase móvel através da coluna.

A cromatografia divide-se em categorias com base no mecanismo de interação do soluto com a fase estacionária: cromatografia de adsorção, cromatografia de partição, cromatografia de troca

iônica, cromatografia de exclusão molecular e cromatografia por afinidade, já mencionadas anteriormente, e ainda cromatografia de fase normal, cromatografia de fase reversa e cromatografia iônica. Na cromatografia de fase normal o alquil-nitrilo e a alquilamina, substituintes da fase estacionária, quando utilizados com uma fase móvel de baixa polaridade, comportam-se de um modo semelhante aos adsorventes sólidos, ou seja, a retenção da amostra aumenta com a polaridade do soluto, e aumentando a polaridade da fase móvel reduz a retenção dos solutos. A retenção baseia-se na transferência de carga entre os elétrons π dos aromáticos e os grupos amino polares da fase estacionária. As amostras são separadas em picos contendo compostos com o mesmo número de anéis. Na cromatografia de fase reversa utiliza-se colunas onde a superfície de fase estacionária é menos polar do que a fase móvel. As colunas mais usadas em fase reversa têm um ligando, tal como octadecil (C-18) ou octil (C-8), ligado a partículas de sílica microporosos. Uma vez que a fase móvel em cromatografia de fase reversa é polar e, geralmente, contém água, o método é ideal para a separação de moléculas polares que são insolúveis em solventes orgânicos ou que se ligam fortemente aos adsorventes sólidos para a eluição normal. Na fase reversa os solutos são eluídos por ordem de polaridade decrescente.

O HPLC possui acoplado um detetor com a capacidade de quantificar os compostos previamente separados. Este deve ser altamente sensível e ter um tempo de resposta rápido. É importante que o detetor seja seletivo e capaz de obter uma boa resposta para os compostos que se pretendem analisar. Os detetores podem agrupar-se de acordo com o método de detecção: espectroscópicos, eletroquímicos, espectrômetros de massa, entre outros. Os detetores espectroscópicos podem dividir-se em ultravioleta/visível (UV/VIS), fluorescência e absorção atômica. Todos têm como característica comum uma fonte emissora de luz que é absorvida de modo diferente por cada substância. O de UV/VIS é de aplicação geral e é um dos detetores mais utilizados em HPLC, permitindo a absorção de todas as substâncias que absorvam no visível ou no ultravioleta. Estes detetores utilizam como fonte de radiação no visível uma lâmpada de tungstênio e no UV uma lâmpada de deutério.

O detetor utilizado no âmbito do estágio foi o detetor de absorção de ultravioleta/visível com fotodíodos (DAD). Este permite medir a resposta para um comprimento de onda particular, registando o espectro total de absorção de UV/VIS para cada analito existente na amostra.

3.1.2.1 Cromatografia líquida de elevada eficiência com detetor DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma técnica de separação em que uma amostra líquida é transportada através de uma coluna cromatográfica por uma fase móvel líquida (eluente). O tipo de HPLC é, geralmente, definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Estes incluem partição ou cromatografia líquido-líquido, adsorção ou cromatografia líquido-sólido,

troca iónica ou cromatografia de iões, cromatografia por exclusão, cromatografia por afinidade e cromatografia quirál [37,41].

Nesta técnica, os eluentes sofrem tratamento para remoção dos gases dissolvidos e das partículas eventualmente presentes, uma vez que as bolhas de ar provocam um alargamento dos picos e as partículas podem afetar o desempenho dos detetores. A degaseificação pode ser efetuada através de um sistema de vácuo, de um sistema de destilação ou por agitação (utilizando um banho de ultrassons ou através de purga de hélio).

A eluição pode ser isocrática ou por gradiente. Enquanto na eluição isocrática a composição da fase móvel é constante, na eluição por gradiente a composição da fase móvel varia durante a eluição sendo imposta uma razão entre os solventes, de forma programada, de modo contínuo ou por etapas ou fases. Geralmente, a eluição por gradiente melhora a eficiência da separação.

O sistema de injeção da amostra incorpora, usualmente, um dispositivo que permite seleccionar o volume a injetar e que possui uma válvula rotatória (*loop*).

As bombas utilizadas em cromatografia líquida precisam de criar pressões até cerca de 400 bar e de ser resistentes à corrosão. Os tipos de bombas existentes são de duplo pistão, de válvulas proporcionais e de câmaras de mistura.

Geralmente, a coluna cromatográfica é precedida de uma pré-coluna cuja função é aumentar a vida útil da coluna analítica, através da remoção de partículas e de contaminantes presentes nos solventes. Satura, ainda, a fase móvel com a fase estacionária de modo a que as perdas de fase estacionária na coluna analítica sejam minimizadas. A coluna analítica é constituída por material inerte, aço inoxidável ou vidro reforçado e sílica fundida (colunas capilares), de diâmetro uniforme, capaz de resistir às pressões usadas e com um enchimento de partículas porosas com características adequadas à separação que se pretende. A escolha da coluna é feita em função da sua capacidade, que é determinada pelas suas dimensões, comprimento, diâmetro interno e material de enchimento. A composição da pré-coluna deve ser semelhante à da coluna analítica.

Algumas das aplicações analíticas decorrem à temperatura ambiente, mas existem situações em que é necessário que exista um controlo da temperatura e, nesses casos, a análise decorre à temperatura imposta ao forno onde está inserida a coluna.

No âmbito do estágio, o detetor utilizado foi o detetor de absorção de ultravioleta/visível com fotodíodos (DAD). O DAD deteta a absorção de UV para VIS. Enquanto um detetor UV/VIS tem apenas a secção de receção de luz de um lado da amostra, um DAD tem múltiplos agrupamentos de fotodíodos para obter informação sobre uma ampla gama de comprimentos de onda de uma só vez. Os espectros são medidos em intervalos de 1 segundo, ou menos, durante a separação por HPLC com eluição contínua. Sendo a medição realizada a um comprimento de onda fixo, os componentes são identificados a partir do seu tempo de retenção. Assim, um pequeno desvio no tempo de retenção pode dificultar a identificação dos componentes. Em tal caso, o DAD pode ser usado para identificar os componentes através de uma comparação do espectro.

3.1.2.1.1 Análise de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) por HPLC-DAD

Os PAH Benzo(b)fluoranteno (Bbf), Benzo(k)fluoranteno (Bkf), Benzo(a)pireno (BaP), Benzo(g,h,i)perileno (BghiP) e Indeno(1,2,3-cd)pireno (IcdP) são analisados por HPLC-DAD em águas naturais destinadas ao consumo humano, em águas superficiais e em águas subterrâneas.

Os PAH são removidos da matriz por extração líquido-líquido. O extrato é concentrado por evaporação e o resíduo é recuperado. Uma parte do extrato é diretamente injetado no cromatógrafo líquido, onde os analitos presentes são separados através de uma coluna de enchimento de elevada eficiência e medidos pelo sinal que originam num detetor de absorção de ultravioleta/visível com fotodíodos. A quantificação de cada composto é efetuada por comparação com o sinal medido para os padrões puros. A identificação dos compostos detetados é realizada por comparação dos tempos de retenção e é confirmada pela análise dos respetivos espectros de absorção na região UV/VIS, obtidos em tempo real à medida que os compostos saem da coluna cromatográfica.

Na tabela abaixo encontra-se representado um exemplo de uma sequência de eluição (tempos de retenção) para as duas fases móveis dos PAH's analisados no âmbito do estágio.

Tabela 3.5. Exemplo da sequência de eluição para as duas fases móveis dos PAH analisados.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo)

Composto	Tempo de retenção / (min)	
	Isocrática	Gradiente
Trifenileno	6,445	15,357
Benzo(b)fluoranteno	10,292	25,270
Benzo(k)fluoranteno	11,822	28,095
Benzo(a)pireno	14,057	30,970
Benzo(g,h,i)perileno	19,715	37,730
Indeno(1,2,3-cd)pireno	21,335	39,623

O *software* estabelece uma curva de calibração para cada analito, efetuando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Utiliza-se o método do padrão interno, para análise dos compostos cujo comprimento de onda é semelhante ao do padrão interno. A regressão entre as razões das áreas, Área/Área PI (*Area Ratio*), e a razão das concentrações dos padrões, c/c_{PI} (*Amount Ratio*) origina uma reta cuja forma algébrica da equação é dada por:

$$AreaRatio = ord + m \times AmountRatio \quad (3.6)$$

em que *ord* é a ordenada na origem e *m* é o declive da reta.

Para os restantes analitos utiliza-se o método do padrão externo, em que a regressão entre as áreas (Area), e as concentrações dos padrões (Amount) origina uma reta cuja equação é dada por:

$$Area = ord + m \times Amount \quad (3.7)$$

A concentração de cada analito no extrato é dada pelas expressões:

$$c = \frac{(ÁreaRatio - ord)}{m} \times c_{PI} \quad (3.8)$$

$$c = \frac{(Area - ord)}{m} \quad (3.9)$$

quando se utiliza o método do padrão interno e do padrão externo, respetivamente.

A concentração de cada analito na amostra obtém-se a partir das equações 3.4 e 3.5.

Se a amostra tiver sido diluída, multiplica-se o valor obtido pelo fator de diluição.

3.1.2.1.1 Interferências

As interferências na determinação de PAH por HPLC-DAD podem ser produzidas por contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes. Pode ser devido, também, a contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem como na análise e, ainda, no processo de extração, originando má reprodutibilidade dos t_r e alargamento dos picos.

3.1.2.1.2 Análise de pesticidas derivados de ureias por HPLC-DAD

Os pesticidas derivados de ureias examinados são: linurão, diurão, propanil e isoproturão. Estes são analisados por HPLC-DAD em águas destinadas ao consumo humano e águas naturais superficiais ou subterrâneas.

Os pesticidas são removidos da matriz por extração em fase sólida. Os analitos são eluídos da fase sólida e o extrato é concentrado para um determinado volume. Uma parte do extrato é diretamente injetado no cromatógrafo líquido, onde os analitos presentes são separados através de uma coluna de enchimento de elevada eficiência e medidos pelo sinal que originam num detetor de absorção de ultravioleta/visível com fotodíodos. A quantificação de cada composto é efetuada por

comparação com o sinal medido para os padrões puros. A identificação dos compostos detetados é realizada por comparação dos tempos de retenção e é confirmada pela análise dos respectivos espectros de absorção na região UV/VIS.

Na tabela abaixo encontra-se representado um exemplo de uma sequência de eluição (tempos de retenção) para as duas fases móveis dos pesticidas derivados de ureia analisados no âmbito do estágio.

Tabela 3.6. Exemplo da sequência de eluição para duas colunas.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo)

Composto	Tempo de retenção /(min)	
	RP-18	CN
Monurão	8,485	6,758
Isoproturão	14,385	7,698
Diurão	15,507	8,192
Propanil	24,625	9,165
Linurão	31,228	10,005

O *software* estabelece uma curva de calibração para cada analito, efetuando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

A concentração de cada analito no extrato é dada pela equação 3.8. A concentração de cada analito na amostra é dada através das equações 3.4 e 3.5.

3.1.2.1.2.1 Interferências

As interferências na determinação de ureias por HPLC-DAD podem ser produzidas por contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes. Pode ser devido, também, a contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem como na análise e, ainda, no processo de extração, originando má reprodutibilidade dos t_r e alargamento dos picos.

3.1.2.1.3 Análise de herbicidas ácidos por HPLC-DAD

Os herbicidas ácidos (HAC) analisados no âmbito do estágio são: bentazona, 2,4-D, triclopir e MCPA. Estes são analisados por HPLC-DAD em águas destinadas ao consumo humano e águas naturais superficiais e subterrâneas.

Os herbicidas são removidos da matriz por extração em fase sólida. Os analitos são eluídos da fase sólida e o extrato é concentrado para um determinado volume. Uma parte do extrato é diretamente injetado no cromatógrafo líquido, onde os analitos presentes são separados através de uma coluna de enchimento de elevada eficiência e medidos pelo sinal que originam num detetor de absorção de ultravioleta/visível com fotodíodos. A quantificação de cada composto é efetuada por comparação com o sinal medido para os padrões puros. A identificação dos compostos detetados é realizada por comparação dos tempos de retenção e é confirmada pela análise dos respetivos espectros de absorção na região UV/VIS.

Na tabela abaixo encontra-se representado um exemplo de uma sequência de eluição (tempos de retenção) para duas colunas dos herbicidas ácidos analisados no âmbito do estágio.

Tabela 3.7. Exemplo da sequência de eluição para duas colunas.

(Nota: O tempo de retenção é indicativo)

Composto	Tempo de retenção /(min)	
	Lichrospher	Purospher
Bentazona	9,103	52,812
2,4-D	10,503	29,943
MCPA	11,075	22,655
Triclopir	11,857	26,283

O *software* estabelece uma curva de calibração para cada analito, efetuando a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

A concentração de cada analito no extrato é dada pela equação 3.9. A concentração de cada analito na amostra é dada através das equações 3.4 e 3.5.

Se a amostra tiver sido diluída, multiplica-se o valor obtido pelo fator de diluição.

3.1.2.1.3.1 Interferências

As interferências na determinação de herbicidas ácidos por HPLC-DAD podem ser produzidas por contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes. Pode ser devido, também, a

contaminações efetuadas tanto na fase de amostragem como na análise e, ainda, no processo de extração, originando má reprodutibilidade dos t_r e alargamento dos picos.

3.1.2.2 Cromatografia Iónica

A cromatografia iónica é uma subdivisão da cromatografia líquida. Nesta técnica cromatográfica, a fase estacionária possui trocadores iónicos e o processo de separação baseia-se na interação eletrostática entre os iões presentes na amostra e os contra iões da fase estacionária, que possuem grupos com carga. A cromatografia iónica combina técnicas de separação por troca iónica, supressão do eluente, e deteção de condutividade para a determinação quantitativa de uma grande variedade de iões [41, 42].

Esta técnica destina-se à análise de iões inorgânicos e orgânicos com pK_a inferior a 7. Consiste em combinar uma coluna de troca iónica com um detetor de condutibilidade elétrica. Nesta técnica, é colocado um supressor entre a coluna e o detetor. A coluna de separação separa os analitos, e o supressor substitui o eluente iónico por uma espécie não iónica.

A amostra a analisar é introduzida na fase móvel, entrando na coluna separadora (fase estacionária). A coluna é constituída por uma resina de troca de aniões, ao longo da qual ocorre a troca entre os aniões presentes no eluente que se pretendem separar e os aniões ligados ao grupo de carga positiva que constituem a estrutura da resina. Os aniões a separar são arrastados ao longo da coluna, sendo mais facilmente transportado o que tiver menor interação com os grupos da resina. Ao sair da coluna, os aniões entram no supressor ácido catiónico, onde são convertidos nas respetivas formas ácidas, cuja condutibilidade é muito mais elevada que a do correspondente sal. O eluente é desionizado, sendo convertido em ácido, diminuindo, assim, a sua condutibilidade. Deste modo, e por ação do supressor, a solução que entra no detetor origina um sinal devido à sua elevada condutibilidade elétrica. A identificação dos aniões é feita a partir dos tempos de retenção, que são comparados com os tempos de retenção obtidos para soluções padrão. A quantificação é feita através da área do pico obtida no cromatograma, a qual é proporcional à concentração do anião.

3.1.2.2.1 Análise de aniões por cromatografia iónica

No âmbito do estágio, foram analisados os aniões fluoreto, cloreto, nitrito, nitrato, fosfato, sulfato e bromato. Estes são analisados por cromatografia iónica em águas de consumo, águas naturais e águas residuais.

A amostra é injetada na corrente de eluente e entra na coluna, onde ocorre a separação dos diferentes aniões. De seguida, os aniões entram no supressor ácido catiónico, cuja função é baixar a condutibilidade do eluente e converter os aniões separados nas correspondentes formas ácidas. Estas são detetadas pela sua condutibilidade elétrica e a identificação dos analitos é feita por comparação do tempo de retenção obtido para os referidos aniões, com o tempo de retenção de soluções padrão.

A concentração de cada um dos analitos na amostra é determinada por leitura no cromatograma. Sempre que a amostra tiver sido diluída, o valor obtido para a concentração tem de ter em conta o fator de diluição.

3.1.2.2.1.1 Interferências

As interferências na determinação de aniões por cromatografia iónica podem ser produzidas por contaminação, reagentes e material de vidro, originando mais picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Assim sendo, todos os materiais que entram em contacto com as amostras devem estar isentos de interferentes.

Todas as substâncias cujo tempo de retenção seja coincidente com o dos analitos a determinar, podem causar interferências. Grandes quantidades de cada anião podem interferir, com o anião adjacente, sendo necessário diluir a amostra. Amostras que contenham partículas grandes, podem provocar entupimento no sistema e danos na coluna, devendo-se filtrar todas as amostras, por precaução.

3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A espectroscopia estuda a interação entre a radiação eletromagnética (EM) e a matéria. Tem como objetivo principal estudar os níveis de energia de átomos ou moléculas.

A utilização de radiação EM na região do infravermelho (IV) com níveis de energia de 1-15 kcal/mol dá origem a transições vibracionais. As transições rotacionais são induzidas pela radiação EM na região de micro-ondas ou na região do infravermelho longínquo, onde as energias associadas são mais baixas [43].

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite identificar uma substância orgânica através dos seus grupos funcionais. Baseia-se na observação de que as ligações químicas apresentam frequências específicas às quais vibram, a níveis de energia bem definidos. Estas são determinadas pela forma da molécula, pelos seus níveis de energia e pela massa dos átomos que a

constituem. A amostra é submetida a uma radiação de comprimento de onda na região do infravermelho e a faixa de radiação utilizada situa-se, em geral, entre os 4000 e os 400 cm^{-1} [44].

A utilização de radiação EM na região do infravermelho, com níveis de energia de 1-15 kcal/mol, induzem transições vibracionais. As transições rotacionais são obtidas com a utilização de radiação EM na região de micro-ondas ou, em casos particulares na região do infravermelho longínquo, onde as energias associadas são mais baixas.

A região do espectro cujo comprimento de onda está compreendido entre 200 e 14300 cm^{-1} corresponde ao infravermelho. Na análise química, a região do espectro correspondente a frequências que variam entre 4000 a 400 cm^{-1} , conhecido como região fundamental ou infravermelho médio, é a que tem mais interesse. A região de baixa frequência (600 a 200 cm^{-1}) é conhecida como infravermelho longínquo e a região de alta frequência (4000 cm^{-1} até à região do visível) designa-se por infravermelho próximo. A tabela abaixo esquematiza as diferenças entre as diversas regiões de infravermelho [38, 41].

Tabela 3.8. Diferenças entre as regiões do IV.

	Infravermelho próximo	Infravermelho médio	Infravermelho longínquo
Frequência (cm^{-1})	14300-4000	4000-650	650-200
Comprimento de onda (μm)	0,7-2,5	3,5-2,5	15-100
Fenómeno	Sobretons de absorção de C-H	Vibrações e dobras	Espécies de baixa energia

Para que haja absorção da radiação IV é necessário que exista variação do momento dipolar da molécula, consequência do seu movimento vibracional ou rotacional. O momento dipolar determina-se pela magnitude da diferença de carga entre a distância dos centros de carga. Só com esta condição o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros. Por outras palavras, o espectro de absorção de uma determinada molécula, na região do infravermelho, tem origem quando a radiação EM incidente tem uma componente com frequência correspondente a uma transição entre dois níveis vibracionais.

Existem dois tipos gerais de vibrações moleculares:

- *Stretching* (estiramento), correspondente a uma vibração de movimento rítmico ao longo da ligação, de tal modo que a distância interatómica aumenta ou diminui como uma mola.
- *Bending* (deformação angular), vibração que tipicamente consiste na variação do ângulo das ligações.

Na figura abaixo estão representados os diferentes tipos de vibração molecular.

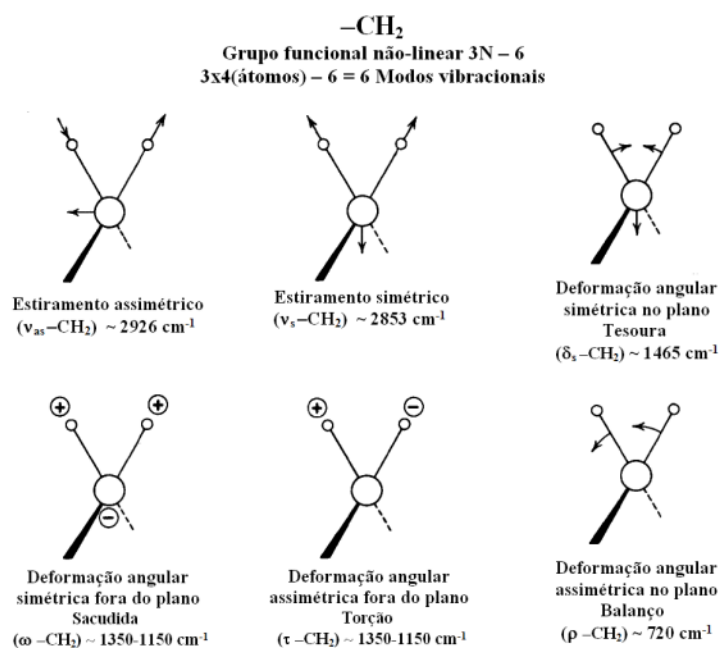


Figura 3.3. Modos vibracionais para o grupo funcional -CH₂. Os sinais + e - indicam os movimentos perpendiculares ao plano da página (Adaptado [45]).

Uma técnica importante no estudo de sistemas moleculares complexos é a espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR). Esta técnica baseia-se no método interferométrico de *Michelson* (Figura 3.4). Neste método, a radiação parte de uma fonte monocromática e divide-se em dois feixes (idealmente, cada feixe contém 50% do original) no *beamsplitter* (divisor de feixes). Um destes percorre uma distância fixa e a outra uma distância móvel. Variando as distâncias percorridas pelos dois feixes, obtêm-se interferências construtivas e destrutivas obtidas sequencialmente e, conseqüentemente, variação da intensidade da radiação que chega ao detector, obtendo-se assim um interferograma. O interferograma obtido numa escala temporal é convertido, por uma transformação de *Fourier*, para um interferograma numa escala de frequências. A transformação de *Fourier* em posições sucessivas do espelho origina um espectro de IV. Quando a posição do espelho móvel é tal que o feixe B percorre a mesma distância para chegar ao detector que o feixe A, os dois feixes estão em fase, reforçando-se um ao outro (interferência construtiva). Nesse instante, a energia que chega ao detector é máxima. À medida que o espelho móvel se movimenta, a intensidade da radiação EM varia, sendo possível varrer a região do espectro desejável, a partir de uma fonte de luz monocromática.

À medida que o espelho móvel se vai movimentando, a intensidade da radiação EM que chega ao detector vai variando e assim se forma o interferograma. Apesar do interferograma conter toda a informação necessária para a análise de uma amostra sob um dado conjunto de condições, a forma como essa informação é apresentada não é muito útil para os analistas. Assim sendo, essa informação é convertida num espectro relacionando as intensidades com as respectivas frequências através da transformada de *Fourier*.

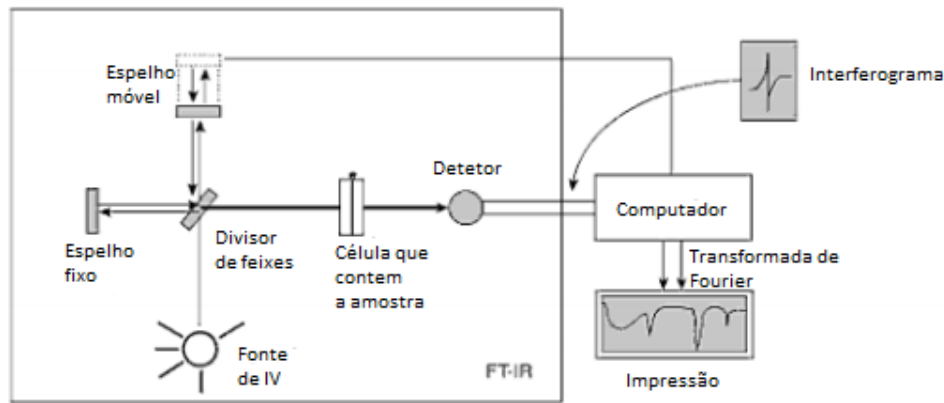


Figura 3.4. Representação esquemática da instrumentação usada num FTIR (Adaptado [44]).

3.2.1 Análise de adjuvantes por FTIR

Um adjuvante trata-se de um produto incorporado no betão, em quantidades muito pequenas, inferior a 5% do peso do cimento. A título de exemplo de adjuvantes tem-se os plastificantes, superplastificantes, hidrófugos, aceleradores e retardadores do endurecimento. Estes são incorporados no betão visando melhorar uma ou várias características do betão, como por exemplo: aumentar a fluidez/plasticidade, sem aumento da quantidade de água da mistura; aumentar ou diminuir a resistência aos ciclos de congelação e descongelação; aumentar a tensão de rotura, sem alteração da quantidade de cimento; manter a qualidade do betão durante as etapas de mistura, transporte, colocação e cura em condições ambientais adversas [46].

O espectro de IV de um superplastificante fornece importantes informações acerca das diferentes classes de compostos, tornando-se numa ferramenta útil na verificação da conformidade e da consistência dos adjuvantes. A informação acerca da natureza das ligações e dos grupos funcionais de um dado composto pode ser determinada pelo espectro de IV.

De modo a efetuar a análise dos adjuvantes, segue-se a seguinte metodologia:

- Secar os adjuvantes líquidos
- Pesar uma determinada massa de brometo de potássio (KBr) e de amostra
- Com um almofariz e um pilão homogeneizar a mistura
- Comprimir a mistura a vácuo, de modo a retirar o máximo de humidade
- Analisar o espectro obtido no FTIR, comparando-o com o do fornecedor.

3.2.2 Análise de óleos, gorduras e hidrocarbonetos totais por FTIR

A determinação de óleos e gorduras (OG) e hidrocarbonetos totais (HT) baseia-se na determinação da energia eletromagnética, que é absorvida na região do IV, pelas ligações C-H presentes na amostra. Este princípio tem origem na grande quantidade de ligações C-H que os óleos, gorduras e hidrocarbonetos possuem.

A determinação da concentração do analito presente no extrato é iniciada com a realização da leitura do *background* do solvente, registrando o seu espectro de absorção. A quantidade de energia eletromagnética absorvida acima desse valor é consequência da presença de óleos, gorduras ou hidrocarbonetos. Para a análise de óleos e gorduras, bem como de hidrocarbonetos totais, faz-se a extração da amostra por extração líquido-líquido, com o mesmo solvente da análise. Efetua-se a análise dos padrões da curva de calibração e converte-se o sinal analítico obtido pelo detector em concentração. De seguida, determina-se a concentração das amostras, tendo em conta o volume de amostra e o volume de extrato e quaisquer diluições efetuadas, através de um fator de concentração. Caso a amostra contenha hidrocarbonetos e esta quantifique, é necessário adicionar sílica gel e agitar, de modo a promover o contacto entre o extrato e a sílica gel. Esta tem a capacidade de remover compostos polares, óleos e gorduras, deixando apenas os compostos apolares como os hidrocarbonetos. O extrato que contém a sílica é filtrado e a amostra é lida diretamente, mas pode ser necessário efetuar diluições. A concentração é determinada do mesmo modo que os óleos e gorduras.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Revalidação do método analítico de determinação de PAH em águas por HPLC-DAD

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são constituídos por carbono e hidrogénio, contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados e podem ter grupos substituintes nos anéis. Resultam, essencialmente, de processos de combustão incompleta de matéria orgânica e de combustíveis fósseis e encontram-se na natureza sob a forma de contaminantes de solos, ar, água e alimentos. Tratam-se de poluentes orgânicos com uma grande importância ambiental e grande interesse toxicológico, uma vez que possuem propriedades carcinogénicas e/ou mutagénicas para a saúde humana e animal, sendo capazes de reagir após transformações metabólicas com o ácido desoxirribonucleico (ADN) [3, 47, 48].

As propriedades físico-químicas dos PAH são determinadas pelas ligações duplas conjugadas existentes nesta família de compostos. À temperatura ambiente, os PAH estão no estado sólido e têm, geralmente, baixa pressão de vapor e fraca solubilidade em água. O valor referente a cada uma das últimas duas propriedades diminui com o aumento da massa molecular de cada composto. São quimicamente estáveis, mas estão sujeitos a processos químicos e fotoquímicos, dando origem a produtos que apresentam maior toxicidade relativamente ao composto precursor. Devido à sua característica lipofílica, os PAH tendem a acumular-se em tecidos lipídicos de plantas e animais. Apesar da pouca solubilidade em água, estes podem ser transportados em meios aquáticos, adsorvidos em partículas em suspensão ficando, depois, depositados nos sedimentos [47].

A exposição do Homem aos PAH pode ocorrer de diversas formas, nomeadamente: inalação, contato com a pele e ingestão. Para não fumadores, os alimentos são a principal fonte de exposição a PAH [3, 48].

Derivado da sua baixa solubilidade em água, os PAH não são, normalmente, encontrados em água com uma grande concentração. O coaltar, usado para proteger os canos de água potável da corrosão, é a maior fonte de contaminação por PAH em água potável. Os PAH mais analisados na água são os seguintes: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno. Numa água de consumo humano, o valor paramétrico para a soma das concentrações de benzo(b)fluoranteno,

benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno é 100 ng/l e o valor paramétrico para o benzo(a)pireno é 10 ng/l [3, 5].

4.1.1 Identificação

Os PAHs pesquisados por rotina no HPLC-DAD para o controlo de inspeção são benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno. Estes passam por um processo de extração líquido-líquido, que é feita pela adição e agitação de um solvente imiscível na matriz e a extração acontece pela passagem do analito para o solvente imiscível. Após a agitação, formam-se duas fases líquidas que são, então, separadas. A fase que contém o analito, denominada por extrato, é evaporada num evaporador rotativo com vácuo e banho de água com controlo de temperatura. Deste modo, existe um processo de concentração dos analitos, sendo a sua concentração final calculada através de um fator de concentração. (ver secção 3.1.1.1.2 – equações 3.4 e 3.5) [41].

O Bbf e o IcdP são analisados através do recurso a padrão interno, uma vez que são analisados no mesmo comprimento de onda. O padrão interno é adicionado com uma concentração fixa e conhecida, tanto aos padrões como às amostras a analisar.

O padrão interno deve ser semelhante à substância a ser quantificada, o tempo de retenção deve ser próximo dessa substância, não deve reagir com a substância ou outro componente da matriz, não deve fazer parte da amostra e, depois de passar no sistema cromatográfico, deve ser separado de todas as substâncias presentes na amostra. Este último requisito não é necessário quando a deteção é feita por espectrometria de massas, na qual cada composto produz um espectro característico [49].

Em cada dia de trabalho é feita uma curva de calibração e é realizado um controlo de qualidade diário ao nível da área do padrão interno, brancos fortificados, duplicados e controlo da calibração através do padrão de calibração correspondente ao limite de quantificação, de um padrão do meio da gama de trabalho e de padrões externos de calibração.

4.1.2 Repetibilidade do sistema cromatográfico

Após otimizar a separação deve-se determinar a repetibilidade do HPLC-DAD, injetando 10 vezes consecutivas um padrão mistura dos analitos em estudo. O coeficiente de variação associado aos t_r medidos deve ser inferior a 2% e para as áreas dos picos deve ser inferior a 6%. O padrão utilizado para este teste foi o PAH 1. Este padrão não faz parte da curva de calibração, mas encontra-se definido em procedimento para fazer o teste da repetibilidade do sistema cromatográfico, estudo que deve ser efetuado anualmente.

Nas tabelas abaixo representadas encontram-se os dados relativos à avaliação da repetibilidade em termos de área e de tempo de retenção e o estudo da repetibilidade para cada composto.

Tabela 4.1. Avaliação da repetibilidade, em termos de área e tempo de retenção, através da análise do padrão PAH 1 do benzo(b)fluoranteno.

Composto	Área	Tempo de retenção/(min)
PAH 1	1480235	9,77
PAH 1	1475846	9,79
PAH 1	1475223	9,79
PAH 1	1486476	9,80
PAH 1	1479270	9,81
PAH 1	1476963	9,79
PAH 1	1466701	9,74
PAH 1	1497966	9,75
PAH 1	1489061	9,76
PAH 1	1488567	9,76
Média	1481631	9,78
Desvio Padrão	8947	0,02
Coefficiente de variação (%)	0,6038	0,2

Tabela 4.2. Avaliação da repetibilidade, em termos de área e tempo de retenção, através da análise do padrão PAH 1 do benzo(k)fluoranteno.

Composto	Área	Tempo de retenção/(min)
PAH 1	2203858	11,29
PAH 1	2213155	11,34
PAH 1	2199590	11,33
PAH 1	2217226	11,35
PAH 1	2217468	11,36
PAH 1	2194946	11,33
PAH 1	2174216	11,28
PAH 1	2222072	11,29
PAH 1	2196849	11,31
PAH 1	2217298	11,31
Média	2205668	11,32
Desvio Padrão	14740	0,03
Coefficiente de variação (%)	0,66828	0,2

Tabela 4.3. Avaliação da repetibilidade, em termos de área e tempo de retenção, através da análise do padrão PAH 1 do benzo(a)pireno.

Composto	Área	Tempo de retenção/(min)
PAH 1	1293175	13,30
PAH 1	1291748	13,35
PAH 1	1274064	13,35
PAH 1	1270681	13,37
PAH 1	1254868	13,37
PAH 1	1228184	13,36
PAH 1	1196691	13,28
PAH 1	1180043	13,30
PAH 1	1194123	13,32
PAH 1	1166995	13,31
Média	1235057	13,33
Desvio Padrão	47875	0,03
Coefficiente de variação (%)	3,8764	0,2

Tabela 4.4. Avaliação da repetibilidade, em termos de área e tempo de retenção, através da análise do padrão PAH 1 do benzo(g,h,i)perileno.

Composto	Área	Tempo de retenção/(min)
PAH 1	2809752	18,40
PAH 1	2795891	18,46
PAH 1	2761989	18,46
PAH 1	2740245	18,47
PAH 1	2729465	18,48
PAH 1	2736954	18,45
PAH 1	2680790	18,35
PAH 1	2686932	18,40
PAH 1	2666616	18,42
PAH 1	2613168	18,42
Média	2722180	18,43
Desvio Padrão	60746	0,04
Coefficiente de variação (%)	2,2315	0,2

Tabela 4.5. Avaliação da repetibilidade, em termos de área e tempo de retenção, através da análise do padrão PAH 1 do indeno(1,2,3-cd)pireno.

Composto	Área	Tempo de retenção/(min)
PAH 1	2729416	20,25
PAH 1	2753290	20,32
PAH 1	2719296	20,31
PAH 1	2741855	20,34
PAH 1	2698898	20,36
PAH 1	2718267	20,32
PAH 1	2709788	20,22
PAH 1	2701395	20,25
PAH 1	2740093	20,28
PAH 1	2726194	20,28
Média	2723849	20,29
Desvio Padrão	17850	0,05
Coefficiente de variação (%)	0,65533	0,2

Tal como se pode verificar, o sistema cromatográfico apresenta boa repetibilidade para a análise de todos os analitos, uma vez que a área e o tempo de retenção são, respetivamente, inferiores a 6% e a 2%.

4.1.3 Especificidade e Seletividade

A especificidade do método é avaliada injetando, sucessivamente, os extratos das seguintes soluções: solvente, branco dos reagentes, brancos fortificados com diferentes concentrações, amostra e amostra fortificada. A especificidade do método deve ser também garantida pelos espectros de absorção de UV/VIS obtidos pelo HPLC-DAD para cada analito, que devem ter resolução suficiente e apresentar um perfil marcado que os caracterize. Deste modo, deve-se verificar se os espectros obtidos para os padrões, brancos e amostras permitem identificar corretamente os compostos.

Para tal, efetuou-se um teste de recuperação nos brancos fortificados. Os dados relativos a esse teste encontram-se representados nas tabelas abaixo.

Da análise das tabelas 4.6. a 4.10. e, tendo em conta que a % de recuperação obtida se encontra dentro dos critérios de aceitação do método (60-130%), conclui-se que o método é específico e seletivo para o composto em questão.

Tabela 4.6. Dados dos testes de recuperação do Bbf, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real/($\mu\text{g/l}$)	Concentração da fortificação/($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida/($\mu\text{g/l}$)	Recuperação/(%)
19/09/14	0,000	95,900	104,711	109,2
19/09/14	0,000	95,900	102,800	107,2
19/09/14	0,000	95,900	70,695	73,7
19/09/14	0,000	95,900	70,867	73,9
17/10/14	0,000	9,590	11,960	124,7
11/12/14	0,000	9,590	9,585	99,9
11/12/14	0,000	9,590	9,945	103,7
11/12/14	0,000	9,590	9,340	97,4
11/12/14	0,000	9,590	9,581	99,9
23/02/15	0,000	19,180	20,392	106,3
23/02/15	0,000	47,950	47,192	98,4
08/04/15	0,000	9,590	8,040	83,8
21/04/15	0,000	9,590	10,100	105,1

Tabela 4.7. Dados dos testes de recuperação do Bkf, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real/(µg/l)	Concentração da fortificação/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
19/09/14	0,000	100,700	76,680	76,1
19/09/14	0,000	100,700	83,834	83,3
19/09/14	0,000	100,700	64,959	64,5
19/09/14	0,000	100,700	64,484	64,0
17/10/14	0,000	10,070	12,571	124,8
17/10/14	0,000	10,070	11,740	116,6
11/12/14	0,000	10,070	8,822	87,6
11/12/14	0,000	10,070	8,379	83,2
11/12/14	0,000	10,070	9,202	91,4
11/12/14	0,000	10,070	8,927	88,6
23/02/15	0,000	20,140	13,434	66,7
08/04/15	0,000	10,070	9,661	95,9
21/04/15	0,000	10,070	10,181	101,1

Tabela 4.8. Dados dos testes de recuperação do BaP, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real/(µg/l)	Concentração da fortificação/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
19/09/14	0,000	96,400	84,714	87,9
19/09/14	0,000	96,400	99,080	102,8
19/09/14	0,000	96,400	81,575	84,6
19/09/14	0,000	96,400	78,512	81,4
17/10/14	0,000	9,640	11,378	118,0
17/10/14	0,000	9,640	10,648	110,5
11/12/14	0,000	9,640	8,051	83,5
11/12/14	0,000	9,640	9,980	103,5
11/12/14	0,000	9,640	7,086	73,5
11/12/14	0,000	9,640	8,591	89,1
23/02/15	0,000	19,280	15,008	77,8
23/02/15	0,000	48,200	40,480	84,0
08/04/15	0,000	9,640	9,283	96,3
21/04/15	0,000	9,640	9,227	95,7

Tabela 4.9. Dados dos testes de recuperação do BghiP, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real/($\mu\text{g/l}$)	Concentração da fortificação/($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida/($\mu\text{g/l}$)	Recuperação/(%)
19/09/14	0,000	140,980	107,481	76,2
19/09/14	0,000	140,980	117,695	83,5
19/09/14	0,000	140,980	98,665	70,0
19/09/14	0,000	140,980	96,763	68,6
17/10/14	0,000	14,098	14,149	100,4
17/10/14	0,000	14,098	14,677	104,1
11/12/14	0,000	14,098	15,731	111,6
11/12/14	0,000	14,098	15,187	107,7
11/12/14	0,000	14,098	14,441	102,4
11/12/14	0,000	14,098	12,974	92,0
23/02/15	1,126	28,196	27,332	92,9
23/02/15	0,000	70,490	58,230	82,6
08/04/15	0,000	14,098	15,372	109,0
21/04/15	0,000	14,098	13,626	96,7

Tabela 4.10. Dados dos testes de recuperação do IcdP, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real/($\mu\text{g/l}$)	Concentração da fortificação/($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida/($\mu\text{g/l}$)	Recuperação/(%)
19/09/14	0,000	140,140	142,366	101,6
19/09/14	0,000	140,140	144,684	103,2
19/09/14	0,000	140,140	123,087	87,8
19/09/14	0,000	140,140	123,804	88,3
17/10/14	0,000	14,014	15,556	111,0
17/10/14	0,000	14,014	14,991	107,0
11/12/14	0,000	14,014	12,834	91,6
11/12/14	0,000	14,014	12,422	88,6
11/12/14	0,000	14,014	13,231	94,4
11/12/14	0,000	14,014	13,302	94,9
23/02/15	0,000	28,030	27,102	96,7
23/02/15	0,000	70,070	63,101	90,1
08/04/15	0,000	14,014	13,027	93,0
21/04/15	0,000	14,014	13,307	95,0

4.1.4 Sensibilidade

Tal como foi referido anteriormente e, tratando-se de um método linear (ver secção 2.2.5.1), a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao declive da reta de calibração.

Nas tabelas abaixo representadas, encontram-se os dados relativos ao declive da reta de cada composto e a avaliação da sensibilidade do método para o composto em questão.

Tabela 4.11. Avaliação da sensibilidade do benzo(b)fluoranteno.

Data	Declive
17/10/14	0,0090715
11/12/14	0,00894081
23/02/15	0,00901194
22/01/15	0,00904543
20/01/15	0,00904584
08/04/15	0,00893568
21/04/15	0,0093021
Média	0,0090505
Desvio Padrão	0,0001228
Coeficiente de variação (%)	1,357

Tabela 4.12. Avaliação da sensibilidade do benzo(k)fluoranteno.

Data	Declive
17/10/14	11589,1
11/12/14	10690,5
23/02/15	10945,6
22/01/15	10678,9
20/01/15	11090,4
08/04/15	10786,0
21/04/15	12759,2
Média	11299,7
Desvio Padrão	711,2
Coeficiente de variação (%)	6,294

Tabela 4.13. Avaliação da sensibilidade do benzo(a)pireno.

Data	Declive
17/10/14	6823,3
11/12/14	5529,0
23/02/15	5835,9
22/01/15	6033,2
20/01/15	5966,8
08/04/15	7255,6
21/04/15	7227,9
Média	6381,7
Desvio Padrão	706,3
Coeficiente de variação (%)	11,07

Tabela 4.14. Avaliação da sensibilidade do benzo(g,h,i)perileno.

Data	Declive
17/10/14	10896
11/12/14	9355,73
23/02/15	8576,09
22/01/15	6919,83
20/01/15	6509,76
08/04/15	7997,15
21/04/15	7674
Média	8276
Desvio Padrão	1501
Coefficiente de variação (%)	18,14

Tabela 4.15. Declive da reta de calibração do indeno(1,2,3-cd)pireno.

Data	Declive
17/10/14	0,0139690
11/12/14	0,0130013
23/02/15	0,0132090
22/01/15	0,00985724
20/01/15	0,0112551
08/04/15	0,0115065
21/04/15	0,0134704
Média	0,0123241
Desvio Padrão	0,0014809
Coefficiente de variação (%)	12,016

Como se pode observar, através da análise das tabelas 4.11 a 4.15., o declive da reta de calibração de cada um dos analitos mantém-se estável ao longo do tempo.

4.1.5 Limiares analíticos

4.1.5.1 Limite de quantificação

Apesar do limite de quantificação estar validado, é necessário proceder a atualizações dos limites experimentais sempre que ocorram alterações na rotina do método. Como tal, temos de garantir que o coeficiente de variação do branco fortificado seja inferior a 10%. No entanto, neste tipo de ensaio, nem sempre isso se verifica. Tal, deve-se ao facto de o branco fortificado ser

submetido a um processo de extração seguido de evaporação que está sujeito a algumas perdas e que, por si só, pode levar a um aumento do CV.

O limite de quantificação (LQ) deve ser avaliado através da análise, em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, de brancos fortificados com concentração correspondente à do padrão de menor concentração da gama de trabalho. O LQ é avaliado através de brancos fortificados e não pelo padrão de menor concentração, para se submeter às mesmas condições a que as amostras estão sujeitas.

Tal como descrito no Guia Relacre nº 13, a avaliação do limite de quantificação deve ser efetuada com o mínimo de 10 resultados. Contudo, não houve tempo para efetuar o resto das medições e foi avaliado com menos valores. Nas tabelas abaixo representadas, encontram-se os dados relativos aos brancos fortificados, com concentração correspondente à do padrão de menor concentração da gama de trabalho, para avaliação do limite de quantificação de cada composto e a respetiva análise.

Tabela 4.16. Estudo do limite de quantificação do Bbf.

Data	Concentração real/(µg/l)	Concentração da fortificação/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
17/10/14	0,000	9,590	11,960	124,7
11/12/14	0,000	9,590	9,585	99,9
11/12/14	0,000	9,590	9,945	103,7
11/12/14	0,000	9,590	9,340	97,4
11/12/14	0,000	9,590	9,581	99,9
08/04/15	0,000	9,590	8,040	83,8
21/04/15	0,000	9,590	10,1	105,1
Média			9,790	
Desvio Padrão			1,167	
Coeficiente de variação (%)			11,92	

Tabela 4.17. Estudo do limite de quantificação do Bkf.

Data	Concentração real/(µg/l)	Concentração da fortificação/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
17/10/14	0,000	10,070	12,571	124,8
17/10/14	0,000	10,070	11,74	116,6
11/12/14	0,000	10,070	8,822	87,6
11/12/14	0,000	10,070	8,379	83,2
11/12/14	0,000	10,070	9,202	91,4
11/12/14	0,000	10,070	8,927	88,6
08/04/15	0,000	10,070	9,661	95,9
21/04/15	0,000	10,070	10,181	101,1
Média			9,935	
Desvio Padrão			1,491	
Coeficiente de variação (%)			15,00	

Tabela 4.18. Estudo do limite de quantificação do BaP.

Data	Concentração real/(µg/l)	Concentração da fortificação/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
17/10/14	0,000	9,640	11,378	118,0
17/10/14	0,000	9,640	10,648	110,5
11/12/14	0,000	9,640	8,051	83,5
11/12/14	0,000	9,640	9,980	103,5
11/12/14	0,000	9,640	7,086	73,5
11/12/14	0,000	9,640	8,591	89,1
08/04/15	0,000	9,640	9,283	96,3
21/04/15	0,000	9,640	9,227	95,7
		Média	8,601	
		Desvio Padrão	1,024	
		Coefficiente de variação (%)	11,91	

Tabela 4.19. Estudo do limite de quantificação do BghiP.

Data	Concentração real/(µg/l)	Concentração da fortificação/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
17/10/14	0,000	14,098	14,149	100,4
17/10/14	0,000	14,098	14,677	104,1
11/12/14	0,000	14,098	15,731	111,6
11/12/14	0,000	14,098	15,187	107,7
11/12/14	0,000	14,098	14,441	102,4
11/12/14	0,000	14,098	12,974	92,0
08/04/15	0,000	14,098	15,372	109,0
21/04/15	0,000	14,098	13,626	96,7
		Média	12,697	
		Desvio Padrão	0,769	
		Coefficiente de variação (%)	6,06	

Tabela 4.20. Estudo do limite de quantificação do IcdP.

Data	Concentração real (µg/l)	Concentração da fortificação (µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Recuperação/(%)
17/10/14	0,000	14,014	15,556	111,0
17/10/14	0,000	14,014	14,991	107,0
11/12/14	0,000	14,014	12,834	91,6
11/12/14	0,000	14,014	12,422	88,6
11/12/14	0,000	14,014	13,231	94,4
11/12/14	0,000	14,014	13,302	94,9
08/04/15	0,000	14,014	13,027	93,0
21/04/15	0,000	14,014	13,307	95,0
		Média	12,957	
		Desvio Padrão	1,488	
		Coefficiente de variação (%)	11,49	

Da análise das tabelas 4.16. a 4.20., pode-se concluir que o limite de quantificação de cada um dos analitos estudados se mantém válido.

4.1.5.1 Limite de deteção

Após garantir que o limite de quantificação se mantém válido calcula-se o limite de deteção, através equação 2.19 da secção 2.2.4. Obtiveram-se os limites de deteção indicados na tabela abaixo para cada composto.

Tabela 4.21. Limites de deteção calculados com base no desvio padrão dos testes de recuperação do branco fortificado e no número de ensaios efetuados.

	Limite de deteção/($\mu\text{g/l}$)
Benzo(b)fluoranteno	0,0029
Benzo(k)fluoranteno	0,0035
Benzo(a)pireno	0,0024
Benzo(g,h,i)perileno	0,0018
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,0035

4.1.6 Linearidade e gama analítica

4.1.6.1 Linearidade – Teste de Mandel

O melhor modo de avaliar a linearidade da gama analítica é através do teste de Mandel. Como tal, testa-se o ajuste dos valores experimentais com um polinómio de primeiro grau (P01) e comparam-se estes resultados com os referentes obtidos através do ajuste dos valores experimentais com um polinómio de segundo grau (P012). Os valores obtidos para o teste de Mandel, bem como a respetiva análise, encontram-se sistematizados nas tabelas abaixo representadas.

Tabela 4.22. Resultados dos ajustes dos valores experimentais aplicando um polinómio do primeiro grau (P01) e um polinómio do segundo grau (P012) do benzo(b)fluoranteno.

Composto		P01	P012
Bbf	SS	$1,94 \times 10^{-3}$	$1,23 \times 10^{-3}$
	Ndf	7	6
	Varfit	$2,76 \times 10^{-4}$	$2,06 \times 10^{-4}$
Bkf	SS	$6,60 \times 10^9$	$4,49 \times 10^9$
	Ndf	8	7
	Varfit	$8,26 \times 10^8$	$6,42 \times 10^8$
BaP	SS	$1,05 \times 10^9$	$7,18 \times 10^8$
	Ndf	8	7
	Varfit	$1,31 \times 10^8$	$1,03 \times 10^8$
BghiP	SS	$2,87 \times 10^9$	$2,62 \times 10^9$
	Ndf	8	7
	Varfit	$3,59 \times 10^8$	$3,74 \times 10^8$
IcdP	SS	$8,32 \times 10^{-3}$	$4,07 \times 10^{-3}$
	Ndf	8	7
	Varfit	$1,04 \times 10^{-3}$	$5,81 \times 10^{-4}$

Tabela 4.23. Resultados obtidos no teste de Mandel para escolha do modelo.

	Valor de teste F	Valor de prova	Valor tabelado de F
Benzo(b)fluoranteno	3,40	0,115	13,75
Benzo(k)fluoranteno	3,29	0,113	12,25
Benzo(a)pireno	3,26	0,114	12,25
Benzo(g,h,i)perileno	0,68	0,436	12,25
Indeno(1,2,3-cd)pireno	7,33	0,030	12,25

Comparando os valores obtidos na tabela anterior e, tendo em conta que os TV de cada um dos PAH pesquisados são inferiores ao valor crítico de F, pode-se concluir que a hipótese nula é aceite, ou seja, ambos os modelos ajustam de modo similar os valores experimentais. Deste modo, o melhor modelo é aquele que tem maior número de graus de liberdade, que neste caso é o modelo P01, isto é, o modelo linear. Tal facto pode, também, ser comprovado pelo valor prova que é superior a 0,05 em todos os compostos, exceto no IcdP. No entanto, o valor de prova só rejeita a hipótese nula se o valor obtido for 0,01. Entre 0,01 e 0,05 existe uma zona dúbia e, como tal, aceita-se a hipótese nula para valores prova acima de 0,03. Assim sendo, a hipótese nula é aceite e o melhor modelo é o linear.

4.1.6.2 Teste da homogeneidade das variâncias

A homogeneidade das variâncias verifica-se através do Teste Fisher (F) com intervalo de confiança de 99%. Assume-se como hipótese inicial (H_0) que as variâncias obtidas são estatisticamente equivalentes e como hipótese alternativa (H_1) que são estatisticamente diferentes.

Para se verificar a homogeneidade de variâncias efetuam-se 10 leituras do padrão de concentração mais baixa e 10 leituras do padrão de concentração mais elevada da gama de trabalho, uma vez que os extremos da curva de calibração são mais suscetíveis a variação. Os valores calculados através do teste F bem como os respetivos valores prova (pH_0), encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela 4.24. Dados do teste de homogeneidade de variâncias do benzo(b)fluoranteno.

Leitura	Padrão de menor concentração/($\mu\text{g/l}$)	Padrão de maior concentração/($\mu\text{g/l}$)
1	9,511	145,952
2	8,719	144,379
3	8,705	144,405
4	8,939	146,072
5	8,856	145,020
6	8,515	145,095
7	8,876	146,399
8	9,692	145,109
9	8,239	146,580
10	8,554	145,825

Tabela 4.25. Dados do teste de homogeneidade de variâncias do benzo(k)fluoranteno.

Leitura	Padrão de menor concentração/($\mu\text{g/l}$)	Padrão de maior concentração/($\mu\text{g/l}$)
1	11,910	148,559
2	12,074	150,735
3	11,502	149,052
4	12,096	147,878
5	11,940	149,874
6	10,617	149,922
7	11,924	148,016
8	10,626	149,122
9	11,547	152,267
10	10,846	151,503

Tabela 4.26. Dados do teste de homogeneidade de variâncias do benzo(a)pireno.

Leitura	Padrão de menor concentração/($\mu\text{g/l}$)	Padrão de maior concentração/($\mu\text{g/l}$)
1	10,159	146,837
2	9,472	145,169
3	9,771	148,059
4	10,047	143,923
5	9,521	146,233
6	10,761	146,613
7	10,321	145,596
8	9,749	146,166
9	10,799	146,090
10	9,778	146,404

Tabela 4.27. Dados do teste de homogeneidade de variâncias do benzo(g,h,i)perileno.

Leitura	Padrão de menor concentração/($\mu\text{g/l}$)	Padrão de maior concentração/($\mu\text{g/l}$)
1	16,853	214,403
2	15,370	212,775
3	15,441	214,218
4	16,094	211,552
5	16,338	214,226
6	16,216	213,949
7	15,898	213,267
8	14,789	212,925
9	16,245	211,953
10	15,888	211,674

Tabela 4.28. Dados do teste de homogeneidade de variâncias do indeno(1,2,3-cd)pireno.

Leitura	Padrão de menor concentração/($\mu\text{g/l}$)	Padrão de maior concentração/($\mu\text{g/l}$)
1	12,370	183,339
2	12,897	180,344
3	11,984	181,253
4	12,346	182,901
5	12,274	183,983
6	11,924	182,242
7	12,041	180,468
8	11,114	181,304
9	11,122	180,511
10	11,991	181,635

Tabela 4.29. Resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias.

	Valor de teste F	Valor de prova	Valor tabelado de F
Benzo(b)fluoranteno	3,17	0,100	6,54
Benzo(k)fluoranteno	6,00	0,014	6,54
Benzo(a)pireno	5,29	0,021	6,54
Benzo(g,h,i)perileno	3,52	0,075	6,54
Indeno(1,2,3-cd)pireno	5,43	0,019	6,54

Comparando os valores obtidos na tabela anterior e, tendo em conta que os TV de cada um dos PAH pesquisados são inferiores ao valor tabelado de F, pode-se concluir que a hipótese nula é aceite, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias. Deste modo, comprova-se que as gamas analíticas estabelecidas se mantêm-se adequadas. Tal facto pode ser comprovado pelo valor prova, que é superior a 0,05, para o Bbf e para o BghiP. No entanto, o valor de prova só rejeita a hipótese nula se o valor obtido for inferior a 0,01. Entre 0,01 e 0,05 existe uma zona dúbia e, como tal, aceita-se a hipótese nula para valores prova acima de 0,03 e rejeitamos a hipótese nula abaixo desse valor. Contudo, como o valor teste é inferior ao valor tabelado, assumimos que a hipótese nula é aceite, ou seja, que existe homogeneidade de variâncias entre os extremos da curva de calibração.

4.1.7 Precisão

A precisão do método deve ser avaliada para cada analito através da análise, em condições de precisão intermédia, de brancos fortificados com concentrações a meio da gama de trabalho e no limite inferior.

O valor obtido para a precisão, em termos de coeficiente de variação (CV), deve ser $\leq 25\%$. Para a avaliação da precisão, usaram-se os valores dos brancos fortificados de cada composto, representados nas tabelas 4.6. - 4.10..

Tabela 4.30. Avaliação da precisão do método.

	Média	Desvio padrão	% CV
Benzo(b)fluoranteno	98,716	14,282	14,467
Benzo(k)fluoranteno	87,996	18,678	21,226
Benzo(a)pireno	86,022	11,411	13,365
Benzo(g,h,i)perileno	82,313	10,519	12,779
Indeno(1,2,3-cd)pireno	92,262	9,769	10,59

Como se pode verificar através da análise da tabela anterior, todos os coeficientes de variação dos brancos fortificados dos PAH são inferiores a 25%. Deste modo, pode-se concluir que o método é preciso.

4.1.7.1 Repetibilidade

Outro modo de avaliar a precisão do método é através da repetibilidade. Esta pode ser realizada sobre os padrões de calibração da curva. Nesse sentido, avaliou-se a repetibilidade, em condições de precisão intermédia, dos padrões PAH 6 e PAH 3 que são, respetivamente, os padrões do limite de quantificação e do meio da gama da curva de calibração. Estes valores, bem como a respetiva análise, encontram-se sistematizados nas tabelas abaixo.

Os dados relativos à avaliação efetuada na tabela abaixo, encontram-se nas tabelas 4.43.-4.47..

Tabela 4.31. Avaliação da precisão do método, com base na repetibilidade dos padrões PAH 6 e PAH 3.

	PAH 6				PAH 3			
	Média	Desvio padrão	% CV	Limite de repetibilidade	Média	Desvio padrão	% CV	Limite de repetibilidade
Bbf	9,338	0,802	8,58	2,2	97,892	2,395	2,447	6,7
Bkf	10,002	1,540	15,39	4,3	103,233	2,423	2,347	6,8
BaP	9,042	1,035	11,44	2,9	97,994	3,003	3,065	8,4
BghiP	13,552	1,784	13,17	5,0	138,503	6,760	4,881	19
IcdP	11,329	0,940	8,30	2,6	119,017	2,017	1,694	5,6

Quanto menor for o coeficiente de variação da repetibilidade, melhor é a repetibilidade. Deste modo, conclui-se que os analitos têm uma boa repetibilidade para ambos os padrões.

O limite de repetibilidade indica o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em ensaios independentes.

4.1.7.2 Reprodutibilidade

A precisão também pode ser avaliada através da reprodutibilidade, recorrendo à participação em ensaios interlaboratoriais. Como tal, é feito um levantamento dos valores do desvio padrão para cada EIL em que o laboratório participou. Seguidamente, calcula-se o limite de reprodutibilidade e o

coeficiente de variação de reprodutibilidade, para cada composto. Estes dados encontram-se sistematizados nas tabelas abaixo.

Tabela 4.32. Avaliação da precisão dos analitos, através dos EIL.

Composto	Data	Média	Desvio padrão	% CV _R	Limite de reprodutibilidade
Bbf	16/7/2010	12,01	2,49	20,7	7,0
	13/7/2012	22,54	1,35	6,02	3,8
	20/2/2015	13,37	0,909	6,80	2,5
Bkf	16/7/2010	20,92	1,062	5,076	3,0
	13/7/2012	23,57	1,56	6,619	4,4
BaP	16/7/2010	9,52	0,99	10	2,8
	13/7/2012	2,58	0,375	14,5	1,1
	20/2/2015	7,71	0,842	10,9	2,4
BghiP	16/7/2010	12,57	2,77	22,0	7,8
	13/7/2012	10,15	0,887	8,74	2,5
	20/2/2015	10,35	1,596	15,42	4,5
IcdP	13/7/2012	18,64	1,289	6,92	3,6
	20/2/2015	7,47	1,173	15,7	3,3

Quanto menor for o coeficiente de variação da reprodutibilidade, melhor é a reprodutibilidade. Deste modo, conclui-se que o resultado para uma mesma amostra analisada em laboratórios diferentes, com equipamentos e analistas diferentes não varia muito.

O limite de reprodutibilidade indica o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em ensaios independentes.

4.1.8 Exatidão

A exatidão deve ser calculada através da análise de amostras fortificadas, por cálculo da percentagem de recuperação e através da participação em ensaios interlaboratoriais de aptidão, por cálculo do fator de desempenho “Z-score”.

4.1.8.1 Testes de recuperação

Através das tabelas 4.11.-4.15., onde se encontram os dados dos testes de recuperação dos brancos fortificados, pode avaliar-se a exatidão de cada analito. Esta encontra-se nas tabelas abaixo.

Tabela 4.33. Avaliação da exatidão do benzo(b)fluoranteno.

Composto		Recuperação/(%)
Bbf	Média	98,7
	Desvio Padrão	14,3
	Coeficiente de variação (%)	14,5
Bkf	Média	88,0
	Desvio Padrão	18,7
	Coeficiente de variação (%)	21,2
BaP	Média	92,1
	Desvio Padrão	12,9
	Coeficiente de variação (%)	14,0
BghiP	Média	92,7
	Desvio Padrão	14,4
	Coeficiente de variação (%)	15,6
IcdP	Média	92,7
	Desvio Padrão	14,4
	Coeficiente de variação (%)	15,6

Estando o critério de aceitação da % de recuperação situado entre 60% e 130%, podemos concluir que o método apresenta boa exatidão para todos os analitos.

4.1.8.2 Ensaios interlaboratoriais

Para avaliar a exatidão de um laboratório existem EIL de aptidão. Deste modo, os resultados obtidos pelo laboratório comparam-se com o valor alvo definido pela entidade organizadora. A avaliação desses resultados normalmente é efetuada por cálculo do fator de desempenho “Z-Score”.

Na tabela abaixo, encontram-se os resultados obtidos para cada analito nos EIL.

Tabela 4.34. Resultados e Z-score dos ensaios interlaboratoriais.

Data	Analito	Resultado AEMITEQ	Resultado alvo	Z-score
16-7-2010	Benzo(b)fluoranteno	13 ng/L	12,93 ng/L	0,04
	Benzo(k)fluoranteno	22 ng/L	22,32 ng/L	-0,14
	Benzo(a)pireno	< 10 ng/L	9,81 ng/L	---
	Benzo(g,h,i)perileno	< 14 ng/L	14,02 ng/L	---
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	---	---	---
13-7-2012	Benzo(b)fluoranteno	23,8 ng/L	22,06 ng/L	0,79
	Benzo(k)fluoranteno	23,40 ng/L	23,48 ng/L	-0,01
	Benzo(a)pireno	21,10 ng/L	2,41 ng/L	37,38
	Benzo(g,h,i)perileno	< 14 ng/L	9,84 ng/L	---
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	18 ng/L	19,31 ng/L	-0,65
20-2-2015	Benzo(b)fluoranteno	14,42 ng/L	13,79 ng/L	0,32
	Benzo(k)fluoranteno	---	---	---
	Benzo(a)pireno	< 10 ng/L	8,33 ng/L	---
	Benzo(g,h,i)perileno	< 14 ng/L	10,84 ng/L	---
	Indeno(1,2,3-cd)pireno	< 14 ng/L	7,79 ng/L	---

Como se pode verificar através da análise da tabela anterior, o laboratório apresenta um desempenho satisfatório para a análise dos compostos pesquisados, uma vez que o fator de desempenho “Z-score” é sempre inferior a 2, exceto no caso do BaP em 13-7-2012 que apresenta um desempenho incorreto.

4.1.9 Robustez

Uma vez que as condições das técnicas cromatográficas são sempre as mesmas, apenas faz sentido estudar a robustez do método com base no fator tempo, de modo a avaliar se este afeta, ou não, a exatidão e precisão do mesmo. Para tal, efetuou-se o teste ANOVA fator único com base nos valores dos padrões externos de controlo da curva de calibração, do padrão de controlo do limite de quantificação e num padrão de calibração situada a meio da gama analítica. Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela abaixo.

Tabela 4.35. Resultados do teste ANOVA fator único.

	$F_{\text{crítico}}$	TV (F)	p[H_0]
Benzo(b)fluoranteno	2,27	0,04	0,999
Benzo(k)fluoranteno	2,24	0,33	0,959
Benzo(a)pireno	2,24	0,62	0,768
Benzo(g,h,i)perileno	2,24	0,62	0,768
Indeno(1,2,3-cd)pireno	2,25	0,66	0,733

Como se pode verificar, através da análise da tabela anterior, o valor teste F é inferior ao valor crítico para todos os analitos. Assim sendo, pode-se concluir que o método é robusto, uma vez que não existe efeito do fator tempo. Tal facto pode ser comprovado pelo valor prova que é sempre superior a 0,05.

4.1.10 Coerência

Uma vez que a coerência avalia a capacidade do método analítico em conduzir ao mesmo valor estimado sem ter imposto qualquer alteração deliberada de condições experimentais, o estudo da robustez do método permite evidenciar que o fator tempo não tem qualquer efeito sobre os dados obtidos, isto é, o método apresenta boa coerência dos resultados para qualquer analito estudado.

4.2 Revalidação do método analítico de análise de compostos orgânicos voláteis em águas por GC-MS

Os compostos orgânicos voláteis são compostos orgânicos com elevada pressão de vapor, em condições de temperatura e pressão normais, ao ponto de vaporizar facilmente e entrar na atmosfera. Possuem, ainda, uma forte recalcitrância à degradação, fazendo com que estes sejam transportados para longas distâncias no meio ambiente [50].

Os VOC foram introduzidos no meio ambiente devido a atividades humanas, desde o início do século XX. Desde então, são muito utilizados como solventes, desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento industrial. Contudo, durante a produção ou durante o consumo de compostos orgânicos voláteis, estes podem ser libertados, involuntariamente, para o meio ambiente. Outra causa de contaminação por VOC é a cloração. Esta trata-se de um método de desinfecção da água, onde o cloro reage com matéria orgânica natural em água para formar grandes quantidades de subprodutos da desinfecção, entre os quais metanos clorados, como o clorofórmio.

A exposição humana aos compostos orgânicos voláteis pode ocorrer de diversas formas, nomeadamente: inalação, ingestão e absorção através da pele. Os VOC têm um grande impacto na saúde humana, derivado da sua elevada toxicidade e efeito cancerígeno. Além disso, formam ozono troposférico, que fica concentrado nas baixas camadas da atmosfera.

Numa água de consumo humano, o valor paramétrico para a concentração de 1,2-DCE é 3 µg/L e de benzeno é 1 µg/L [5].

4.2.1 Identificação

Os VOC pesquisados por GC-MS são o benzeno e o 1,2-dicloroetano (1,2-DCE). A extração pela qual passam estes dois compostos é a microextração em fase sólida (SPME).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma microtécnica de extração de amostras, tanto pelas dimensões do suporte de extração empregue como pelos volumes de matriz e de solvente necessários. Utiliza-se fibra ótica de sílica fundida, recoberta com filme fino de um polímero, como por exemplo o polidimetilsiloxano (PDMS), ou com um adsorvente adequado. A fibra encontra-se acondicionada dentro de uma agulha num amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração [40, 41].

O processo de extração por SPME pode ser efetuado por imersão da fibra diretamente na matriz ou através da exposição no espaço confinante chamado “headspace”, onde a fibra entra em contacto apenas com os vapores do analito que são libertados da matriz por aquecimento. Efetuada a extração, a fibra é retirada da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo gasoso, onde os analitos são termicamente desorvidos sob fluxo do gás de arraste e transportados para a coluna

cromatográfica. Nesta técnica extraem-se pequenas quantidades de analito, o que facilita a sua dessorção e subsequente separação cromatográfica.

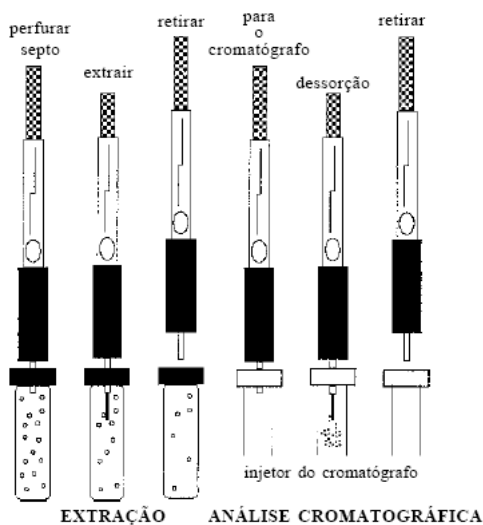


Figura 4.1. Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e de dessorção do material extraído para análise por GC [42].

Numa extração por SPME as moléculas do analito deslocam-se da matriz e transpõem o recobrimento. Para tal, têm de ultrapassar as resistências a transferências de massa, até estabelecer um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve. Em suma, a microextração em fase sólida baseia-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas [42].

Os analitos contidos na amostra de água são removidos da matriz por aquecimento da amostra num frasco (“vial”) fechado hermeticamente, criando um espaço vazio situado acima do nível da água (“headspace”). A seringa de SPME é introduzida nesse espaço e absorve os analitos numa fibra de PDMS que é introduzida no injetor do cromatógrafo, onde os compostos são extraídos diretamente para a coluna capilar. Após a separação, são medidos num detetor de massas.

Os compostos são analisados através do recurso a padrão interno. Este é adicionado com uma concentração fixa e conhecida, tanto aos padrões como às amostras a analisar.

Em cada dia de trabalho é feita uma curva de calibração e é realizado um controlo de qualidade diário ao nível da área do padrão interno, amostras fortificadas, duplicados e controlo da calibração através do padrão de calibração correspondente ao limite de quantificação, de um padrão do meio da gama de trabalho e de padrões externos de calibração.

4.2.2 Repetibilidade do sistema cromatográfico

Após otimizar a separação deve-se determinar a repetibilidade do GC-MS, injetando 10 vezes consecutivas um padrão mistura dos analitos em estudo. Todavia, este estudo é efetuado através dos pesticidas alacloro e S-metolacloro e deve ser efetuado anualmente. O CV associado aos tempos de retenção medidos deve ser inferior a 2% e para as áreas dos picos deve ser inferior a 6%.

O padrão utilizado para este teste foi o PestG1-1, que corresponde ao padrão de maior concentração da reta de calibração dos pesticidas G1. Os dados correspondentes à verificação do sistema cromatográfico bem como a sua respetiva avaliação, estão representados nas tabelas abaixo.

Tabela 4.36. Repetibilidade da área do GC-MS, através da análise do padrão PestG1-1 dos pesticidas.

Padrão	Área do Alacloro (m/z 160)	Área do S-Metolacloro (m/z 62)
Pest G1-1	778618	3346094
Pest G1-1	797430	3318824
Pest G1-1	805612	3484299
Pest G1-1	791092	3340194
Pest G1-1	793456	3337735
Pest G1-1	786992	3358448
Pest G1-1	815160	3444056
Pest G1-1	821319	3494587
Pest G1-1	806866	3429626
Pest G1-1	830540	3569399
Média	802708	3412326
Desvio Padrão	16253	84803
Coefficiente de variação (%)	2,0	2,5

Tabela 4.37. Repetibilidade do tempo de retenção do GC-MS, através da análise do padrão PestG1-1 dos pesticidas.

Padrão	Tempo de retenção do Alacloro/(min)	Tempo de retenção do S-Metolacloro/(min)
Pest G1-1	21,08	22,30
Pest G1-1	21,08	22,30
Pest G1-1	21,08	22,29
Pest G1-1	21,07	22,29
Pest G1-1	21,08	22,30
Pest G1-1	21,07	22,29
Pest G1-1	21,07	22,29
Pest G1-1	21,08	22,29
Pest G1-1	21,08	22,29
Pest G1-1	21,07	22,29
Média	21,08	22,29
Desvio Padrão	0,0075	0,0054
Coefficiente de variação (%)	0,036	0,024

Tal como se pode verificar, o sistema cromatográfico apresenta boa repetibilidade uma vez que a área e o tempo de retenção são, respetivamente, inferiores a 6% e a 2%.

4.2.3 Especificidade e Seletividade

Terminado o estudo da repetibilidade do sistema cromatográfico, passamos então para o estudo dos analitos em questão, benzeno e 1,2-DCE. A especificidade do método é avaliada injetando, sucessivamente, água ultra pura, amostra, amostra diluída e amostra fortificada. Para tal, efetuou-se um teste de recuperação nas amostras fortificadas.

Nas tabelas 4.66. e 4.67 encontram-se representados os dados relativos aos testes de recuperação para os dois compostos em estudo. Através da sua análise podemos concluir que o método é específico e seletivo para os analitos em questão, uma vez que a percentagem de recuperação obtida se encontra dentro do critério de aceitação do método (60-130%).

Tabela 4.38. Dados dos testes de recuperação do 1,2-DCE, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real/($\mu\text{g/l}$)	Concentração da fortificação/($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida/($\mu\text{g/l}$)	Recuperação/(%)
30-09-14	0,000	3,986	4,244	106,5
17-10-14	0,000	3,986	3,349	84,0
17-10-14	0,000	3,986	4,020	100,9
22-10-14	2,460	0,997	3,555	109,8
22-10-14	2,463	0,997	3,371	91,1
22-10-14	0,000	0,997	0,867	87,0
22-10-14	0,000	0,997	0,702	70,4
24-10-14	2,052	0,997	2,697	64,7
24-10-14	0,000	0,997	1,132	113,5
24-10-14	1,940	0,997	2,561	62,3
24-10-14	0,000	0,997	0,876	87,9
27-10-14	2,467	0,997	3,201	73,6
27-10-14	0,000	0,997	1,216	122,0
27-10-14	2,479	0,997	3,599	112,3
27-10-14	0,000	0,997	1,216	122,0
18-11-14	0,000	9,965	10,813	108,5
13-01-15	0,000	3,986	4,051	101,6
29-01-15	0,000	1,993	2,319	116,4
29-01-15	0,000	1,993	1,942	97,4
05-02-15	0,219	3,986	4,160	98,9
05-02-15	0,187	3,986	4,601	110,7
23-02-15	0,000	1,993	1,967	98,7
19-03-15	0,000	3,986	3,911	98,1
19-03-15	0,000	3,986	3,908	98,0
22-04-15	0,000	3,986	4,464	112,0
18-05-15	0,000	3,986	3,554	89,2
18-05-15	0,000	3,986	3,682	92,4

Tabela 4.39. Dados dos testes de recuperação do benzeno, para avaliação da especificidade e seletividade.

Data	Concentração real ($\mu\text{g/l}$)	Concentração da fortificação ($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida ($\mu\text{g/l}$)	Recuperação/(%)
30/09/14	0,000	3,992	4,471	112,0
17/10/14	0,000	3,993	4,072	102,0
17/10/14	0,000	3,992	4,144	103,8
22/10/14	0,000	0,998	0,832	83,4
22/10/14	0,000	0,998	1,006	100,8
22/10/14	0,976	0,998	1,436	46,1
22/10/14	0,991	0,998	1,728	73,8
24/10/14	0,000	0,998	0,966	96,8
24/10/14	0,605	0,998	1,828	122,5
24/10/14	0,000	0,998	0,76	76,2
24/10/14	0,621	0,998	1,421	80,2
27/10/14	0,000	0,998	0,774	77,6
27/10/14	0,827	0,998	1,773	94,8
27/10/14	0,000	0,998	0,934	93,6
27/10/14	0,764	0,998	1,798	103,6
18/11/14	0,000	9,980	10,359	103,8
13/01/15	0,000	3,992	4,428	110,9
29/01/15	0,000	1,996	2,58	129,3
29/01/15	0,000	1,996	2,508	125,7
05/02/15	0,000	3,992	4,533	113,6
05/02/15	0,000	3,992	5,014	125,6
23/02/15	0,000	1,996	2,215	111,0
19/03/15	0,000	3,992	4,282	107,3
19/03/15	0,000	3,992	3,991	100,0
22/04/15	0,000	3,992	4,779	119,7
18/05/15	0,000	3,992	4,392	110,0
18/05/15	0,000	3,992	4,551	114,0

4.2.4 Sensibilidade

Tal como foi referido anteriormente e, tratando-se de um método linear (ver secção 2.2.5.1), a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e corresponde ao declive da reta de calibração.

Na tabela abaixo, encontram-se os dados dos declives das retas de calibração do 1,2-DCE e do benzeno para avaliar a sensibilidade do método, bem como a respetiva análise.

Como se pode observar na tabelas abaixo, o declive da reta de calibração de ambos os compostos varia um pouco ao longo do tempo.

Tabela 4.41. Declive da reta de calibração do 1,2-Dicloroetano.

Data	Declive da reta de calibração do 1,2-DCE	Declive da reta de calibração do benzeno
03-09-14	0,0172302	0,155796
30-09-14	0,0339718	0,182685
17-10-14	0,0245999	0,154394
22-10-14	0,0400617	0,272418
24-10-14	0,0348431	0,159551
27-10-14	0,0322984	0,153897
18-11-14	0,0193141	0,172059
13-01-15	0,0289056	0,155194
29-01-15	0,0201677	0,108688
05-02-15	0,0210591	0,128881
23-02-15	0,0288620	0,144985
19-03-15	0,0303997	0,136504
30-03-15	0,0307940	0,127311
22-04-15	0,0203335	0,101565
18-05-15	0,0195334	0,103946
Média	0,0268249	0,150525
Desvio Padrão	0,0069890	0,041460
Coefficiente de variação (%)	26,054	27,544

4.2.5 Limiares analíticos

4.2.5.1 Limite de quantificação

Apesar do limite de quantificação estar validado, é necessário proceder a atualizações dos limites experimentais sempre que ocorram alterações na rotina do método. Como tal, apenas temos de garantir que o coeficiente de variação do padrão de menor concentração da gama de trabalho, em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, seja inferior a 10%.

Nas tabelas abaixo, estão os dados relativos ao padrão de menor concentração da curva de calibração, bem como a avaliação do limite de quantificação.

Através dos dados seguintes, verifica-se que o limite de quantificação de ambos os analitos se mantém válido.

Tabela 4.42. Avaliação do limite de quantificação do 1,2-DCE.

Data	Concentração padrão (µg/l)	Concentração medida (µg/l)	Desvio/(%)
03/09/14	0,977	0,862	-11,8
03/09/14	0,977	0,89	-8,90
30/09/14	0,977	1,14	16,7
17/10/14	0,977	1,091	11,7
22/10/14	0,977	1,135	16,2
24/10/14	0,977	0,966	-1,10
24/10/14	0,977	0,974	-0,30
27/10/14	0,977	1,05	7,50
18/11/14	0,977	0,897	-8,20
13/01/15	0,977	0,934	-4,40
29/01/15	0,977	0,843	-13,7
05/02/15	0,977	0,985	0,80
23/02/15	0,977	1,044	6,90
19/03/15	0,977	0,911	-6,80
22/04/15	0,977	0,882	-9,70
18/05/15	0,977	0,998	2,10
Média		0,975	
Desvio Padrão		0,095	
Coefficiente de variação (%)		9,7	

Tabela 4.43. Dados relativos ao padrão de menor concentração da gama de trabalho do benzeno, para avaliação do limite de quantificação.

Data	Concentração padrão (µg/l)	Concentração medida (µg/l)	Desvio /(%)
03/09/14	0,253	0,236	-6,72
03/09/14	0,253	0,263	3,95
30/09/14	0,253	0,235	-7,11
17/10/14	0,253	0,240	-5,14
27/10/14	0,253	0,220	-13,0
18/11/14	0,253	0,229	-9,49
13/01/15	0,253	0,225	-11,1
29/01/15	0,253	0,243	-3,95
05/02/15	0,253	0,240	-5,14
23/02/15	0,253	0,261	3,16
19/03/15	0,253	0,280	10,7
22/04/15	0,253	0,223	-11,9
18/05/15	0,253	0,233	-7,91
Média		0,241	
Desvio Padrão		0,018	
Coefficiente de variação (%)		7,3	

4.2.5.2 Limite de deteção

Após garantir que o limite de quantificação está válido, calcula-se o limite de deteção. Este é calculado a partir da equação 2.19. Deste modo, o limite de deteção definido para o 1,2-Dicloroetano é 0,20 µg/l e para o benzeno é 0,04 µg/l.

4.2.6 Linearidade e gama analítica

4.2.6.1 Linearidade – Teste de Mandel

O melhor modo de avaliar a linearidade da gama analítica é através do teste de Mandel. Como tal, testa-se o ajuste dos valores experimentais com um polinómio de primeiro grau (P01) e comparam-se estes resultados com os referentes obtidos através do ajuste dos valores experimentais com um polinómio de segundo grau (P012).

Os dados obtidos para efetuar o teste de Mandel, bem como a sua análise, encontram-se sistematizados nas tabelas abaixo.

Tabela 4.44. Resultados obtidos para os ajustes dos valores experimentais aplicando um polinómio do primeiro grau (P01) e um polinómio do segundo grau (P012) do 1,2-DCE.

	1,2-DCE		Benzeno	
	P01	P012	P01	P012
SS	$5,53 \times 10^{-5}$	$5,79 \times 10^{-6}$	$2,17 \times 10^2$	$1,11 \times 10^{-3}$
Ndf	3	2	4	3
Varfit	$1,84 \times 10^{-5}$	$2,90 \times 10^{-6}$	$5,42 \times 10^1$	$3,69 \times 10^{-4}$

Tabela 4.45. Resultados obtidos no teste de Mandel para escolha do modelo.

	Valor de teste F	Valor de prova	Valor tabelado de F
1,2-Dicloroetano	17,08	0,054	98,50
Benzeno	4,00	0,139	34,12

Através dos valores obtidos na tabela anterior e, tendo em conta que os TV de cada um dos VOC pesquisados é inferior ao valor crítico de F, conclui-se que a hipótese nula é aceite, ou seja, ambos os modelos ajustam de modo similar os valores experimentais. Deste modo, o melhor modelo é aquele que tem maior número de graus de liberdade, que neste caso é o modelo P01, isto é, o modelo linear. Tal facto pode, também, ser comprovado pelo valor prova que é superior a 0,05.

4.2.6.2 Teste da homogeneidade das variâncias

A homogeneidade das variâncias verifica-se através do Teste Fisher (F) com intervalo de confiança de 99%. Assume-se como hipótese inicial (H_0) que as variâncias obtidas são estatisticamente equivalentes e como hipótese alternativa (H_1) que são estatisticamente diferentes.

O teste de homogeneidade de variâncias foi efetuado apenas para o composto 1,2-DCE. Para se verificar a homogeneidade de variâncias efetuam-se 10 leituras do padrão de concentração mais baixa e 10 leituras do padrão de concentração mais elevada da gama de trabalho, uma vez que os extremos da curva de calibração são suscetíveis a uma maior variância. Os valores calculados através do teste F bem como os respetivos valores prova (pH_0), encontram-se nas tabelas seguintes.

Tabela 4.46. Dados do teste de homogeneidade de variâncias do 1,2-DCE.

Leitura	Padrão de menor concentração ($\mu\text{g/l}$)	Padrão de maior concentração ($\mu\text{g/l}$)
1	1,172	9,707
2	1,174	9,161
3	1,214	8,983
4	1,127	8,947
5	1,228	9,103
6	0,991	9,386
7	0,996	9,141
8	1,060	9,402
9	1,285	9,603
10	1,237	9,158

Tabela 4.47. Resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias.

	Valor de teste F	Valor de prova	Valor tabelado de F
1,2-Dicloroetano	6,20	6,54	0,012

Comparando os valores obtidos na tabela anterior e, tendo em conta que o TV do 1,2-DCE é inferior ao valor tabelado de F, pode-se concluir que a hipótese nula é aceite, ou seja, não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias. Contudo, pelo valor prova que é inferior a 0,05, este valor seria rejeitado, uma vez que entre 0,01 e 0,05 existe uma zona dúbia e, como tal, aceita-se a hipótese nula para valores prova acima de 0,03 e rejeitamos a hipótese nula abaixo desse valor. Contudo, como o valor teste é inferior ao valor tabelado, assumimos que a hipótese nula é aceite, ou seja, que existe homogeneidade de variâncias entre os extremos da curva de calibração.

4.2.7 Precisão

A precisão do método deve ser avaliada para cada analito através da análise, em condições de precisão intermédia, dos padrões externos de controlo e do padrão de menor concentração da gama de trabalho. Os dados referentes ao padrão de menor concentração do 1,2-DCE e do benzeno encontram-se, respetivamente, nas tabelas 4.71. e 4.73.. Os dados referentes a cada padrão externo de controlo assim como a avaliação da precisão, encontram-se representados nas tabelas abaixo.

O valor obtido para a precisão, em termos de coeficiente de variação (CV) deve ser $\leq 25\%$.

Tabela 4.48. Dados do padrão de controlo externo (EPA-MIX 7-5).

Data	1,2-DCE			Benzeno		
	Concentração padrão/($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida/($\mu\text{g/l}$)	Desvio/(%)	Concentração padrão/($\mu\text{g/l}$)	Concentração medida/($\mu\text{g/l}$)	Desvio/(%)
03/09/14	1,993	1,711	-14,10	1,996	1,705	-14,60
30/09/14	1,993	2,064	3,600	1,996	1,975	-1,100
17/10/14	1,993	1,854	-7,000	1,996	2,167	8,600
22/10/14	1,993	2,116	6,200	1,996	1,791	-10,30
24/10/14	1,993	1,706	-14,40	1,996	2,165	8,500
27/10/14	1,993	2,345	17,70	1,996	2,377	19,10
18/11/14	1,993	2,125	6,600	1,996	2,178	9,100
13/01/15	1,993	1,760	-11,70	1,996	2,018	1,100
29/01/15	1,993	1,977	-0,800	1,996	2,377	19,10
05/02/15	1,993	1,808	-9,300	1,996	1,656	-17,00
23/02/15	1,993	2,168	8,800	1,996	1,996	0,000
19/03/15	1,993	1,744	-12,50	1,996	2,175	9,000
30/03/15	1,993	1,958	-1,756	1,996	2,367	18,59
22/04/15	1,993	1,892	-5,068	1,996	2,238	12,12
18/05/15	1,993	2,186	9,684	1,996	2,237	12,07

Tabela 4.49. Dados do padrão de controlo externo (EPA-MIX 7-6).

Data	1,2-DCE			Benzeno		
	Concentração padrão/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Desvio/(%)	Concentração padrão/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Desvio/(%)
03/09/14	3,986	4,275	7,300	3,992	3,474	-13,00
30/09/14	3,986	4,424	11,00	3,992	4,124	3,300
17/10/14	3,986	4,647	16,60	3,992	2,585	14,90
22/10/14	3,986	3,765	-5,500	3,992	3,311	-17,10
24/10/14	3,986	4,122	3,400	3,992	4,560	14,20
27/10/14	3,986	4,670	17,20	3,992	4,259	6,700
18/11/14	3,986	5,103	28,00	3,992	4,743	18,80
13/01/15	3,986	3,449	-13,50	3,992	4,254	6,600
19/03/15	3,986	3,869	-2,900	3,992	4,410	10,50
30/03/15	3,986	3,478	-12,75	3,992	4,346	8,868
18/05/15	3,986	3,836	-3,763	3,992	4,498	12,68

Tabela 4.50. Avaliação da precisão do método.

	1,2-DCE			Benzeno		
	CDB 4	EPA-MIX 7-5	EPA-MIX 7-6	CDB 2	EPA-MIX 7-5	EPA-MIX 7-6
Média	0,975	1,961	4,149	0,241	2,095	4,051
Desvio padrão	0,095	0,200	0,528	0,018	0,234	0,654
% CV	9,7	10,2	12,7	7,3	11,2	16,1

Como se pode verificar através da análise da tabela anterior, todos os coeficientes de variação dos padrões externos de controlo e do padrão de menor concentração da gama analítica são inferiores a 25%. Deste modo, pode-se concluir que o método é preciso.

4.2.7.1 Repetibilidade

Outro modo de avaliar a precisão do método é através da repetibilidade. Esta pode ser realizada sobre os padrões de calibração da curva. Nesse sentido, avaliou-se a repetibilidade, em condições de precisão intermédia, dos padrões de controlo da calibração de cada analito. O CDB 4 e o CDB 6 são os padrões de controlo do 1,2-DCE. O padrão CDB 2 e o padrão CDB 6 são os padrões de controlo do benzeno.

O valor obtido para a precisão, em termos de coeficiente de variação (CV), deve ser $\leq 25\%$.

Tabela 4.51. Dados dos padrões de calibração do 1,2-DCE.

	CDB 4			CDB 6		
	Cocentração padrão/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Desvio/(%)	Cocentração padrão/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Desvio/(%)
03-09-14	0,977	0,787	-19,4			
03-09-14	0,977	0,890	-8,9	4,884	5,714	17,0
30-09-14	0,977	1,140	16,7	4,884	4,241	-13,2
17-10-14	0,977	1,091	11,7	4,884	5,422	11,0
22-10-14	0,977	1,135	16,2	4,884	4,672	-4,3
24-10-14	0,977	0,966	-1,1	4,884	4,352	-10,9
24-10-14	0,977	0,974	-0,3	4,884	5,214	6,8
27-10-14	0,977	1,192	22,0	4,884	4,548	-6,9
18-11-14	0,977	0,843	-13,7	4,884	5,382	10,2
13-01-15	0,977	0,824	-15,7	4,884	4,654	-4,7
29-01-15	0,977	0,840	-14,0	4,884	5,245	7,4
05-02-15	0,977	0,995	1,8	4,884	5,055	3,5
23-02-15	0,977	1,044	6,9	4,884	4,763	-2,5
19-03-15	0,977	0,911	-6,8	4,884	4,284	-12,3
22-04-15	0,977	0,882	-9,7	4,884	4,409	-9,7
18/05/15	0,977	0,998	8,3	4,884	4,755	-2,6

Tabela 4.52. Dados dos padrões de calibração do benzeno.

	CDB 4			CDB 6		
	Cocentração padrão/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Desvio/(%)	Cocentração padrão/(µg/l)	Concentração medida/(µg/l)	Desvio/(%)
03/09/14	0,253	0,236	-13,8	5,060	4,804	-5,1
03/09/14	0,253	0,263	18,6	5,060	5,176	2,3
30/09/14	0,253	0,235	-7,1	5,060	4,968	-1,8
17/10/14	0,253	0,24	-19,4	5,060	5,190	2,6
22/10/14				5,060	4,166	-17,7
24/10/14				5,060	5,253	3,8
24/10/14				5,060	5,490	8,5
27/10/14	0,253	0,22	-13,0	5,060	5,185	2,5
18/11/14	0,253	0,229	-9,5	5,060	5,168	2,1
13/01/15	0,253	0,225	-20,6	5,060	4,920	-2,8
29/01/15	0,253	0,243	-4,0	5,060	5,773	14,1
05/02/15	0,253	0,24	-17,0	5,060	5,273	4,2
23/02/15	0,253	0,261	16,6	5,060	4,517	-10,7
19/03/15	0,253	0,28	10,7	5,060	4,712	-6,9
22/04/15	0,253	0,223	-11,9	5,060	5,398	6,7

Tabela 4.53. Avaliação da precisão do método, com base na repetibilidade dos padrões CDB 4 e CDB 6.

	CDB 4			CDB 6				
	Média	Desvio padrão	% CV	Limite de repetibilidade	Média	Desvio padrão	% CV	Limite de repetibilidade
1,2-DCE	0,975	0,095	9,7	0,266	4,847	0,463	9,5	1,296

Tabela 4.54. Avaliação da precisão do método, com base na repetibilidade dos padrões CDB 2 e CDB 6.

	CDB 2			CDB 6				
	Média	Desvio padrão	% CV	Limite de repetibilidade	Média	Desvio padrão	% CV	Limite de repetibilidade
Benzeno	0,241	0,018	7,3	0,049	5,063	0,388	7,7	1,086

Quanto menor for o coeficiente de variação da repetibilidade, melhor é a repetibilidade. Deste modo, conclui-se que os analitos têm uma boa repetibilidade para ambos os padrões.

O limite de repetibilidade indica o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados obtidos em ensaios independentes.

4.2.7.2 Reprodutibilidade

A precisão também pode ser avaliada através da reprodutibilidade, recorrendo à participação em ensaios interlaboratoriais. Como tal, é feito um levantamento dos valores do desvio padrão para cada EIL em que o laboratório participou. Seguidamente, calcula-se o limite de reprodutibilidade e o coeficiente de variação de reprodutibilidade.

Tabela 4.55. Avaliação da precisão do 1,2-DCE, através dos EIL.

Composto	Data	Média	Desvio padrão	% CV _R	Limite de reprodutibilidade
1,2-DCE	23/11/2009	1,07	0,15	14	0,42
	19/11/2010	2,76	0,55	20	1,5
	21/11/2014	2,62	0,41	16	1,2
Benzeno	23/11/2009	0,754	0,095	12,6	0,27
	19/11/2010	0,812	0,084	10,3	0,24
	16/11/2012	1,061	0,123	11,6	0,34
	21/11/2014	0,919	0,105	11,4	0,29

Para o 1,2-DCE, obteve-se um limite de reprodutibilidade igual a 0,42 em 2009, 1,5 em 2010 e 1,2 em 2014. Assim sendo, para cada amostra, os resultados obtidos em laboratórios diferentes, com equipamentos e operadores diferentes e num intervalo temporal diferente, serão considerados satisfatórios se o módulo da diferença entre esses resultados, não ultrapassar o respetivo limite de reprodutibilidade.

Obteve-se um coeficiente de variação de reprodutibilidade igual a 14% em 2009, 20% em 2010 e 16% em 2014. Desta forma, verifica-se que a mesma amostra analisada em condições diferentes está sujeita a alguma variação no valor obtido.

Para o benzeno, obteve-se um limite de reprodutibilidade igual a 0,27 em 2009, 0,24 em 2010, 0,34 em 2012 e 0,29 em 2014. Assim sendo, para cada amostra, os resultados obtidos em laboratórios diferentes, com equipamentos e operadores diferentes e num intervalo temporal diferente, serão considerados satisfatórios se o módulo da diferença entre esses resultados, não ultrapassar o respetivo limite de reprodutibilidade.

Obteve-se um coeficiente de variação de reprodutibilidade igual a 12,6% em 2009, 10,3% em 2010, 11,6% em 2012 e 11,4% em 2014. Desta forma, verifica-se que a mesma amostra analisada em condições diferentes não está sujeita a muita variação no valor obtido.

4.2.8 Exatidão

A exatidão deve ser calculada através da análise de amostras fortificadas, por cálculo da percentagem de recuperação e através da participação em ensaios interlaboratoriais de aptidão, por cálculo do fator de desempenho “Z-score”.

4.2.8.1 Testes de recuperação

Na tabela 4.38. e 4.39. encontram-se os dados relativos aos testes de recuperação. Na tabela abaixo encontra-se a avaliação da exatidão para o composto em estudo.

Tabela 4.56. Avaliação da exatidão do 1,2-Dicloroetano e do benzeno.

	% Rec 1,2-DCE	% Rec benzeno
Média	97,4	101,4
Desvio Padrão	16,3	19,0
Coeficiente de variação (%)	16,8	18,7

Estando o critério de aceitação da % de recuperação situado entre 60% e 130%, podemos concluir que o método apresenta boa exatidão para a análise dos VOC em estudo.

4.2.8.2 Ensaio interlaboratoriais

Para avaliar a exatidão de um laboratório existem EIL de aptidão. Deste modo, os resultados obtidos pelo laboratório comparam-se com o valor alvo definido pela entidade organizadora. A avaliação desses resultados normalmente é efetuada por cálculo do fator de desempenho “Z-Score”. Na tabela abaixo, encontram-se os resultados obtidos para cada analito nos EIL.

Tabela 4.57. Resultados e Z-score dos ensaios interlaboratoriais.

Data	Analito	Resultado AEMITEQ	Resultado alvo	Z-score
23/11/2009	1,2-DCE	1,06 µg/l	0,91 µg/l	1
	Benzeno	0,800 µg/l	0,771 µg/l	0,38
19/11/2010	1,2-DCE	2,63 µg/l	3,08 µg/l	-1,45
	Benzeno	0,870 µg/l	0,843 µg/l	0,32
16/11/2012	1,2-DCE	---	---	---
	Benzeno	0,970 µg/l	1,085 µg/l	-1,06
21/11/2014	1,2-DCE	2,46 µg/l	2,52 µg/l	-0,24
	Benzeno	0,877 µg/l	0,893 µg/l	-0,18

Como se pode verificar através da análise da tabela anterior, o laboratório apresenta um desempenho satisfatório para a análise dos compostos pesquisados, uma vez que o fator de desempenho “Z-score” é sempre inferior a 2. Em 2012 não foram obtidos resultados para o 1,2-DCE, uma vez que a concentração da amostra se encontrava em concentração inferior ao limite de quantificação do equipamento.

4.2.9 Robustez

Uma vez que as condições das técnicas cromatográficas são sempre as mesmas, apenas faz sentido estudar a robustez do método com base no fator tempo, de modo a avaliar se este afeta ou não a exatidão e precisão do mesmo. Para tal, efetuou-se o teste ANOVA fator único com base nos valores dos padrões externos de controlo da curva de calibração, do padrão de controlo do limite de quantificação e num padrão de calibração situada a meio da gama analítica. Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela abaixo.

Tabela 4.58. Resultados do teste ANOVA fator único.

	$F_{\text{crítico}}$	TV (F)	$p[H_0]$
1,2-DCE	1,82	0,07	1
Benzeno	1,83	0,07	1

Como se pode verificar, através da análise da tabela anterior, o valor teste de F é inferior ao valor crítico do teste F para todos os analitos. Assim sendo, pode-se concluir que o método é robusto, uma vez que não existe efeito do fator tempo. Tal facto pode ser comprovado pelo valor prova que é sempre superior a 0,05.

4.2.10 Coerência

Uma vez que a coerência avalia a capacidade do método analítico em conduzir ao mesmo valor estimado sem ter imposto qualquer alteração deliberada de condições experimentais, o estudo da robustez do método permite evidenciar que o fator tempo não tem qualquer efeito sobre os dados obtidos, isto é, o método apresenta boa coerência dos resultados para qualquer analito estudado.

4.3 Implementação do método analítico de análise de trihalometanos em águas por GC-MS

Os trihalometanos formam-se durante a cloração da água, através da interação de ácidos orgânicos que estão geralmente presentes em águas superficiais [51].

Os THM são compostos voláteis que apresentam relativamente baixa solubilidade em água. São compostos por apenas um carbono e têm fórmula geral CHX_3 , onde X representa um halogénio (flúor, bromo, cloro ou iodo).

Os THM mais encontrados em água de consumo são clorofórmio ou triclorometano, bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) e bromofórmio ou tribromometano.

O clorofórmio é considerado como um composto carcinogénico, sendo que existe uma ligação entre a exposição a THM específicos com tumores. estudos epidemiológicos indicam, também, uma ligação entre a exposição a água clorada, quer por ingestão quer por adsorção endérmica ou por inalação, e o desenvolvimento de cancro na bexiga, aborto espontâneo e outras consequências reprodutivas adversas [52].

Uma vez que os THM são compostos formados na água de consumo humano e, tendo em conta os efeitos nocivos para a saúde, o monitoramento da sua concentração é muito importante.

Os solventes clorados, família de compostos à qual pertence o tetracloroetileno e tricloroetileno, são hidrocarbonetos clorados sintéticos conhecidos pelas suas excelentes propriedades de solvente. São muito utilizados como solventes para ceras, resinas, gorduras, borrachas, óleos e vernizes, pintura em setores público e privado, e também têm sido amplamente utilizados para a limpeza a seco e desengorduramento de metais.

Como consequência de fugas, derrames e de eliminação inadequada em locais industriais, foram introduzidas no ambiente quantidades significativas de solventes clorados, sendo que a exposição a baixos níveis desses substratos na água potável podem causar efeitos cancerígenos em seres humanos.

Numa água de consumo humano, o valor paramétrico para a soma das concentrações dos THM é 100 µg/L e para a soma das concentrações dos solventes clorados, tetracloroetileno e tricloroetileno, o valor paramétrico é 10 µg/L [5].

4.3.1 Identificação

Na etapa final do estágio, começaram a efetuar-se estudos no sentido de analisar os trihalometanos em conjunto com os compostos orgânicos voláteis, por GC-MS. Este estudo tem o intuito de economizar tempo na realização dos ensaios e material. Uma vez que este estudo foi iniciado perto do final do estágio, apenas existem dados relativos à linearidade da reta de calibração. Tal como nos VOC, os THM e os solventes clorados pesquisados passam por microextração em fase sólida (SPME).

Na figura abaixo representada, temos o perfil de corrente iónica total onde se encontra a representação dos picos correspondentes à abundância de todos os iões no detetor em função do tempo. O *software* utilizado deve permitir obter, a partir do TIC, o registo da abundância dos iões de uma massa específica versus tempo, o qual se designa por perfil de corrente iónica extraída (PCIE). Da análise do TIC obtém-se informação sobre o tempo de retenção e a área de cada pico. Os PCIE permitem verificar que os picos têm boa resolução e que os compostos estão a ser bem identificados.

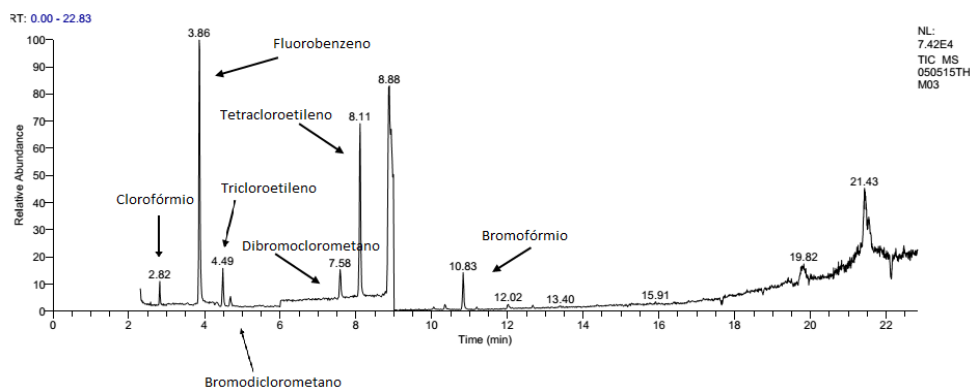


Figura 4.2. Representação dos picos correspondentes à abundância de todos os iões no detetor em função do tempo, do padrão do limite de quantificação.

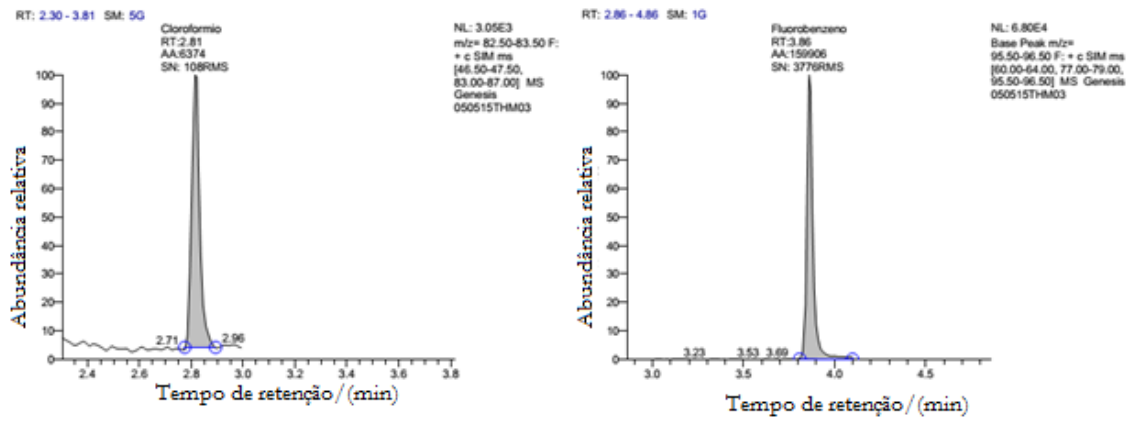


Figura 4.3. Representação do PCIE do clorofórmio e do fluorobenzeno, do padrão do limite de quantificação.

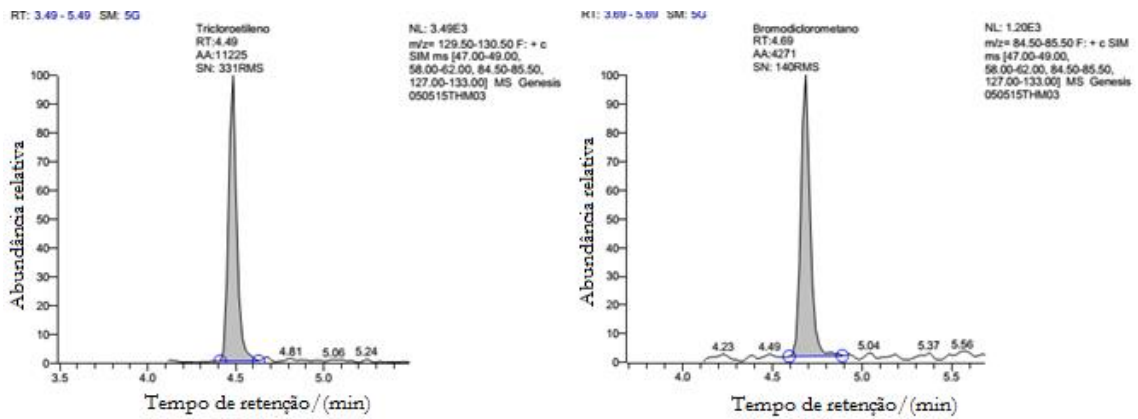


Figura 4.4. Representação do PCIE do tricloroetileno e do bromodichlorometano, do padrão do limite de quantificação.

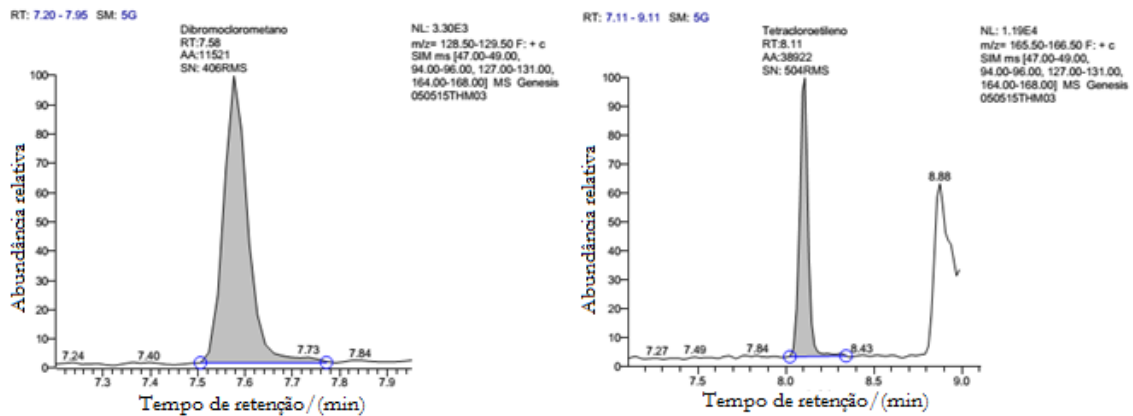


Figura 4.5. Representação do PCIE do dibromoclorometano e do tetracloretileno, do padrão do limite de quantificação.

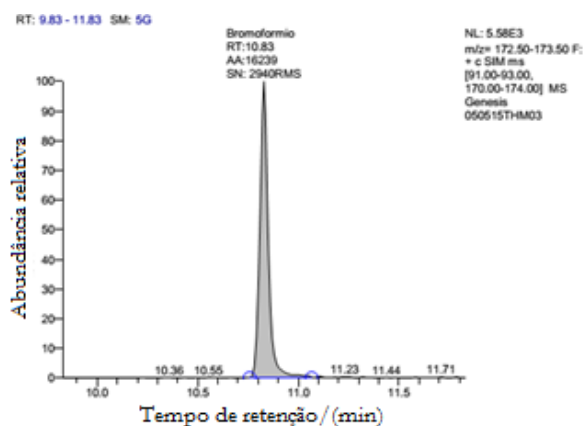


Figura 4.6. Representação do PCIE do bromoformio, do padrão do limite de quantificação.

4.3.1 Linearidade – Teste de Mandel

O melhor modo de avaliar a linearidade da gama analítica é através do teste de Mandel. Como tal, testa-se o ajuste dos valores experimentais com um polinómio de primeiro grau (P01) e comparam-se estes resultados com os referentes obtidos através do ajuste dos valores experimentais com um polinómio de segundo grau (P012). Os valores obtidos para o teste de Mandel, bem como a respetiva análise, encontram-se sistematizados nas tabelas abaixo representadas.

Os cromatogramas relativos aos padrões para a construção da curva de calibração encontram-se em anexo, no apêndice B, onde é possível verificar o tempo de retenção correspondente a cada analito, bem como a sua identificação que é feita com base na livreria do *software*.

Comparando os valores obtidos na 4.60 e, tendo em conta que os TV de cada um dos THM pesquisados, exceto para o tricloroetileno, são inferiores ao valor crítico de F, pode-se concluir que a hipótese nula é aceite, ou seja, ambos os modelos ajustam de modo similar os valores experimentais. Deste modo, o melhor modelo é aquele que tem maior número de graus de liberdade, que neste caso é o modelo P01, isto é, o modelo linear. Tal facto pode, também, ser comprovado pelo valor prova que é superior a 0,03 em todos os compostos, exceto o tricloroetileno e o tetracloroetileno. No caso do tricloroetileno, a hipótese nula é rejeitada e o melhor modelo é o P012, ou seja, o melhor ajuste é o quadrático. No caso do tetracloroetileno, como o valor teste é inferior ao valor crítico, e tendo em conta que a reta de calibração apresenta um coeficiente de correlação próximo de 1, tal como se pode ver no gráfico abaixo representado, consideramos que o melhor modelo é o P01.

Tabela 4.59. Resultados obtidos para os ajustes dos valores experimentais aplicando um polinómio do primeiro grau (P01) e um polinómio do segundo grau (P012).

Composto		P01	P012
Clorofórmio	SS	$9,52 \times 10^{-3}$	$3,84 \times 10^{-3}$
	Ndf	7	6
	Varfit	$1,36 \times 10^{-3}$	$6,40 \times 10^{-4}$
Tricloroetileno	SS	$1,32 \times 10^{-2}$	$6,26 \times 10^{-4}$
	Ndf	6	5
	Varfit	$2,20 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-4}$
BDCM	SS	$2,34 \times 10^{-3}$	$2,12 \times 10^{-3}$
	Ndf	7	6
	Varfit	$3,35 \times 10^{-4}$	$3,53 \times 10^{-4}$
Tetracloroetileno	SS	$9,83 \times 10^{-2}$	$2,51 \times 10^{-2}$
	Ndf	6	5
	Varfit	$1,64 \times 10^{-2}$	$5,01 \times 10^{-3}$
DBCM	SS	$7,65 \times 10^{-3}$	$7,25 \times 10^{-3}$
	Ndf	6	5
	Varfit	$1,27 \times 10^{-3}$	$1,45 \times 10^{-3}$
Bromofórmio	SS	$1,41 \times 10^{-2}$	$8,95 \times 10^{-3}$
	Ndf	7	6
	Varfit	$2,01 \times 10^{-3}$	$1,49 \times 10^{-3}$

Tabela 4.60. Resultados obtidos no teste de Mandel para escolha do modelo.

	Valor de teste F	Valor de prova	Valor tabelado de F
Clorofórmio	8,87	0,031	16,26
Tricloroetileno	100,43	0,000	16,26
BDCM	0,64	0,455	16,26
Tetracloroetileno	14,60	0,012	21,20
DBCM	0,28	0,620	21,20
Bromofórmio	3,44	0,113	16,26

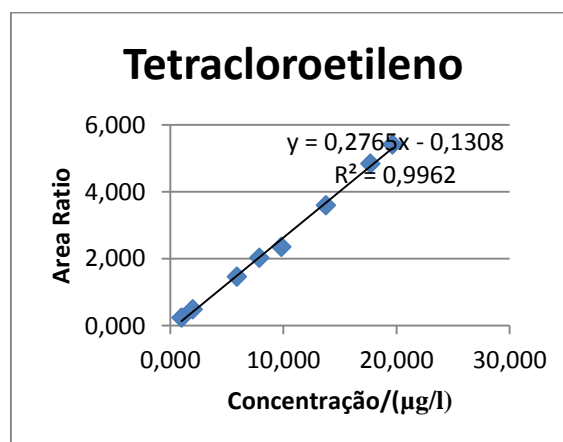


Gráfico 4.1. Representação gráfica da recta de calibração do tetracloroetileno.

Capítulo 5

Conclusão

O tema deste trabalho centrou-se na aquisição de conhecimentos relativos à validação de métodos cromatográficos e à integração na matriz de qualificação para métodos dentro do âmbito da acreditação, no contexto das atividades do Laboratório de Cromatografia da AEMITEQ. De acordo com os objetivos propostos inicialmente, pode considerar-se que o estágio foi realizado com sucesso.

Na fase inicial do estágio pretendia-se a integração na AEMITEQ, a familiarização com a documentação utilizada no Laboratório (Manual de Gestão da Qualidade, legislação e procedimentos técnicos específicos de métodos analíticos), o desenvolvimento de competências no uso de equipamentos e materiais/reagentes de laboratório.

De seguida, foi efetuada a familiarização com as técnicas analíticas, através da realização de ensaios fora do âmbito da acreditação com os equipamentos de análise FTIR e GC-FID.

Posteriormente, ocorreu a integração nos ensaios do âmbito da acreditação e, mais tarde, iniciaram-se os estudos de revalidação dos métodos analíticos. Já perto do final do estágio surgiu a possibilidade de estudar a implementação da análise de trihalometanos e solventes clorados por GC-MS, de modo a economizar tempo e material utilizado na análise.

Após a validação do método analítico, o Laboratório deve exercer um controlo da sua execução, de modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm, uma vez que durante o procedimento de um método de ensaio ocorrem manipulações suscetíveis de acumular erros, tanto sistemáticos como aleatórios, que podem afetar significativamente o valor do resultado final. Sendo a garantia e o controlo de qualidade dos resultados diários um dos objetivos do SG, é necessário avaliar periodicamente a exatidão dos resultados, com recurso ao controlo de qualidade interno e ao controlo de qualidade externo. A revalidação dos métodos analíticos é, por isso, essencial para verificar se o método se mantém válido e se permite obter resultados fiáveis. Esta permitiu verificar que os métodos analisados (determinação de compostos orgânicos voláteis por GC-MS e determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por HPLC-DAD em águas de consumo) se mantêm válidos, sendo por isso possível obter resultados fiáveis.

O objetivo da familiarização com as práticas do Laboratório, bem como o acompanhamento dos técnicos na execução das várias metodologias em vigor e a análise de amostras reais com supervisão foi atingido com sucesso, uma vez que no decorrer do estágio foi possível adquirir competências em métodos analíticos referentes à análise de vários tipos de águas e participar em ensaios interlaboratoriais obtendo \bar{x} -score satisfatório.

Bibliografia

- [1] E. R. Alley, *Water Quality Control Handbook*, New York: McGraw-Hill Professional, 2000.
- [2] J. Pato, *História das políticas públicas de abastecimento e saneamento de águas em Portugal*, Lisboa: Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, 2011.
- [3] B. Mendes e J. F. S. Oliveira, *Qualidade da água para consumo humano*, Lisboa: Lidel, 2004.
- [4] J. M. Baptista, *Uma abordagem regulatória integrada (ARIT-ERSAR) para os serviços de águas e resíduos*, Lisboa: Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, 2014.
- [5] *Decreto-Lei nº 306/2007*.
- [6] R. C. Marques, *A regulação dos serviços de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais*, Lisboa: Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, 2011.
- [7] *Decreto-Lei nº 243/2001*.
- [8] *Conjunto de normas para a Certificação de Sistemas de Gestão da Qualidade (ISO 9001)*, International Standard Organization, 2008.
- [9] *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2005)*, International Standard Organization, 2010.
- [10] *Regulamento Geral de Acreditação (DRC001)*, IPAC, 2012.
- [11] *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Lisboa: Relacre, 2000.
- [12] D. B. Hibbert e J. J. Gooding, *Data Analysis for Chemistry*, Oxford University Press, 2006.
- [13] R. W. Samohyl, *Controle Estatístico de Qualidade*, Elsevier, 2009.
- [14] D. C. Montgomery, *Introdução ao Controle Estatístico da Qualidade*, LTC, 2009.
- [15] J. C. Miller e J. N. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, 2000.
- [16] *Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical method validation*, European Medicines Agency, 2011.
- [17] *Normalização e Qualidade Industrial: Orientação sobre a validação de métodos de ensaios químicos*, Inmetro, 2007.
- [18] *The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, Eurachem, 2014.

- [19] Validation of Analytical Procedures: text and methodology, International Conference on Harmonization, 2005.
- [20] M. Thompson, S. L. R. Ellison e R. Wood, Harmonized guidelines for single - laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), Pure and Applied Chemistry, 2002.
- [21] J. K. Taylor, Quality Assurance of Chemical Measurements, CRC Press, 1987.
- [22] F. Leite, Validação em Análise Química, Campinas: Átomo, 1996.
- [23] Guia para a acreditação de laboratórios químicos (OGC 002), IPAC, 2011.
- [24] Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics – Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function (ISO 8466 – 1), International Standard Organization, 1990.
- [25] Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 2: Statistical strategy for non-linear second-order calibration functions (ISO 8466 – 2), International Standard Organization, 2001.
- [26] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions (ISO 5725-1), International Standard Organization, 1994.
- [27] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (ISO 5725-2), International Standard Organization, 1994.
- [28] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method (ISO 5725-3), International Standard Organization, 1994.
- [29] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 6: Use in practice of accuracy values (ISO 5725-6), International Standard Organization, 1994.
- [30] Guia Relacre 3 - Validação de resultados em laboratórios químicos, Lisboa: Relacre, 1996.
- [31] Validation of Compendial Methods, United States Pharmacopoeia, 2006.
- [32] Avaliação da incerteza da medição em calibração (OGC 010), IPAC, 2015.
- [33] Handbook for calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, NORDTEST Technical Report 537, 2012.
- [34] Water quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data (ISO 11352), International Standard Organization, 2012.
- [35] Guia Relacre 9 – Alguns exemplos de cartas de control em laboratórios químicos, Lisboa: Relacre, 1998.
- [36] Control charts - Part 2: Shewart control charts (ISO 7870-2), International Standard Organization, 2013.

- [37] D. A. Skoog, F. J. Holler e S. T. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks Cole, 2007.
- [38] N. Adam e G. Cooper, *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*, Londres; Chicago: Pharmaceutical Press, 2008.
- [39] H. Willard, L. Merritt e J. Dean, *Análise Instrumental*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1974.
- [40] D. K. F. Fifield, *Principles and Practice of Analytical Chemistry*, Cambridge: Blackwell Science Ltd, 2000.
- [41] S. Ahuja e N. Jespersen, *Modern Instrumental Analysis in Comprehensive Analytical Chemistry*, Amsterdam: Elsevier, 2006.
- [42] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman, 2010.
- [43] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Ltd., 2004.
- [44] D. L. Pavia et. al., *Introduction to spectroscopy*, Belmont, CA: Cengage Learning, 2009.
- [45] R. M. Silverstein e F. X. Webster, *Identificação Espectométrica de compostos orgânicos*, Rio de Janeiro: LTC: Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.
- [46] *Admixtures for concrete, mortar and grout - Part 2: Concrete admixtures - Definitions, requirements, conformity, marking and labelling*, Norma Inglesa, 2013.
- [47] R. G. Harvey, *The Handbook of Environmental Chemistry of PAHs and Related Compounds 3.1*, A. H Neilson Editor, 1998.
- [48] W. Lopes e J. B. F. Andrade, *Formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera*, Química Nova, 1996.
- [49] V. R. Meyer, *Practical high-performance liquid chromatography*, Wiley, 1999.
- [50] B. Huang, C. Lei, C. Wei e G. Zeng, *Chlorinated volatile organic compounds (Cl-VOCs) in environment – sources, potential human health impacts, and current remediation technologies*, Environmental International, 2014.
- [51] A. L. P. Valente e F. Augusto, *Microextração por fase sólida*, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas: Química Nova, 2000.
- [52] A. Alegria e I. J. de Sousa et. Al., *Trihalometanos- Análise da situação em Portugal*.

Apêndice A

Tabelas testes estatísticos – *F-Fisher* e *t-student*

Valores críticos da distribuição *t-student* bilateral. Os valores referentes à distribuição unilateral devem ser consultados através da coluna referente a 2α (ex: teste a 5% de uma cauda $\rightarrow \alpha = 2 \times 0.05 = 0.10$).

ν	α				ν	α				ν	α			
	0.10	0.05	0.02	0.01		0.10	0.05	0.02	0.01		0.10	0.05	0.02	0.01
2	2.92	4.30	6.96	9.92	12	1.78	2.18	2.68	3.05	24	1.71	2.06	2.49	2.80
3	2.35	3.18	4.54	5.84	13	1.77	2.16	2.65	3.01	26	1.71	2.06	2.48	2.78
4	2.13	2.78	3.75	4.60	14	1.76	2.14	2.62	2.98	30	1.70	2.04	2.46	2.75
5	2.02	2.57	3.36	4.03	15	1.75	2.13	2.60	2.95	35	1.69	2.03	2.44	2.72
6	1.94	2.45	3.14	3.71	16	1.75	2.12	2.58	2.92	40	1.68	2.02	2.42	2.70
7	1.89	2.36	3.00	3.50	17	1.74	2.11	2.57	2.90	50	1.68	2.01	2.40	2.68
8	1.86	2.31	2.90	3.36	18	1.73	2.10	2.55	2.88	60	1.67	2.00	2.39	2.66
9	1.83	2.26	2.82	3.25	19	1.73	2.09	2.54	2.86	80	1.66	1.99	2.37	2.64
10	1.81	2.23	2.76	3.17	20	1.72	2.09	2.53	2.85	100	1.66	1.98	2.36	2.63
11	1.80	2.20	2.72	3.11	22	1.72	2.07	2.51	2.82	∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Valores críticos da distribuição de Fisher-Snedcor unilateral ($\alpha = 0.05$).

$\nu_1 \setminus \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.226	2.151	2.071
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.165	2.089	2.007
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.092	2.015	1.932

Valores críticos da distribuição de Fisher-Snedcor unilateral ($\alpha = 0.01$).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55