



Andreia Filipa Silva Martins

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Mestrado em Química

Departamento de Química

FCTUC

Junho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Andreia Filipa Silva Martins

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

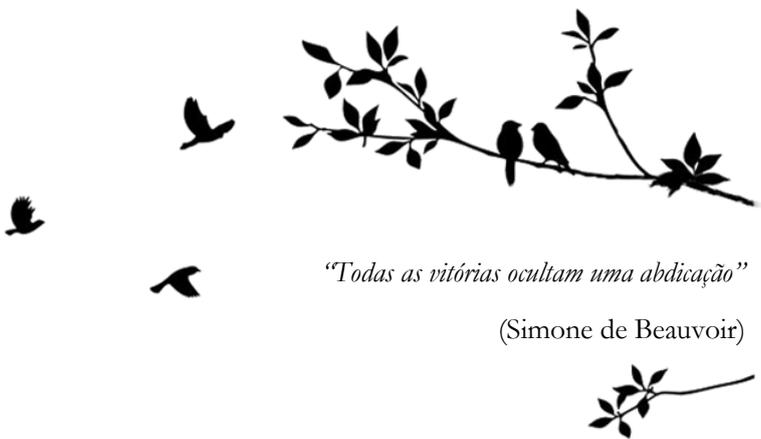
**Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química,
Área de especialização em Controle de Qualidade e Ambiente**

Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro

Engenheiro Alain Lopes da Costa

Junho 2016

Universidade de Coimbra



“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

(Simone de Beauvoir)

Agradecimentos

Não restam dúvidas de como este trabalho é o reflexo de oito meses de aprendizagem, dedicação e partilha que, no fim, resulta na despedida da vida académica e no abraçar de novos desafios. É claro que não seria possível sem o contributo de inúmeras pessoas que, de uma forma ou de outra, permitiram que este objetivo fosse alcançado.

Antes de mais quero agradecer à Doutora Ana Ribeiro, minha orientadora de estágio do Departamento de Química, pelo seu voto de confiança neste desafio, bem como pelo apoio prestado ao longo destes três anos, nesta relação de orientadora-estagiária. Também foi muito importante a sua compreensão, orientação, disponibilidade e partilha de conhecimentos ao longo desta etapa, pois tornaram esta dissertação de Mestrado possível.

Ao Doutor Miguel Esteso gostaria de agradecer por toda a disponibilidade, atenção e espírito crítico, pois foi um contributo muito positivo para a melhoria desta dissertação.

À Direção da ÆMITEQ quero agradecer a oportunidade que me foi concedida para realizar este estágio curricular nas suas instalações.

Ao Engenheiro Alain Costa, meu orientador na ÆMITEQ, um muito obrigada por todo o apoio, disponibilidade e conhecimento demonstrado e transmitido ao longo deste estágio. A paciência, o acompanhamento e o interesse pelo trabalho desenvolvido foi, sem dúvida, um incentivo para a concretização do mesmo, tornando o difícil em relativamente fácil.

A todos os colaboradores da ÆMITEQ quero agradecer pela excelente receção, integração e partilha de conhecimentos, mas também pelos momentos mais descontraídos, nos quais a alegria e diversão eram palavras de ordem.

Aos meus amigos e colegas de curso fica o agradecimento por todos os momentos de partilha e sabedoria nesta nossa Coimbra, onde a saudade pesara como a capa aos ombros!

À minha afilhada resta dizer: muito obrigada! Foi, sem dúvida, o melhor que Coimbra me pôde proporcionar. Da nossa história fazem parte todos os momentos de caloiras, todas as brincadeiras, todas as noites em que a conversa não tinha hora, todas as gargalhadas (algumas incontrolláveis), todas as lágrimas de

alegria, todas as histórias (in)questionáveis, todos os momentos em que o silêncio e a distância não mudam nada... Por todos estes anos de amizade, obrigada!

Não menos importante, quero agradecer à minha família por me ter apoiado incondicionalmente nesta longa caminhada. Os meus agradecimentos são dirigidos à minha mãe, por todo o esforço que esta escolha implicou e por ter sido o motor que tornou esta conquista possível. Também ao meu pai, de uma forma especial, quero agradecer todo o companheirismo, presença e apoio ao longo destes anos, pois foram fundamentais todas as horas em que segredámos.

À minha irmã e cunhado, apesar de distantes, agradeço o apoio e conselhos prestados, pois tornaram esta batalha mais fácil, e foram o incentivo para aceitar desafios diferentes.

Ao meu sobrinho, por todas as horas de paciência e conversa, que fazem parte da nossa história de irmãos.

Ao meu namorado um muito obrigada pela paciência, compreensão, companheirismo, amizade, mas sobretudo pela força e motivação ao longo de todos estes anos. A confiança e a coragem foram claramente o impulso para o culminar desta vida académica. Obrigada!

E à nossa Coimbra! Obrigada pelo abrigo, pela pacificidade, pelos momentos, pelos amores, pelos desamores, pela coragem, pela determinação, pela força da capa negra, pelas memórias... “Uma vez Coimbra, para sempre saudade”. E claro, “Amo-te com a força de quem não te quer ver partir”!

A todos vós, muito obrigada e um enorme bem-haja!

Índice

Agradecimentos	v
Índice	vii
Abreviaturas	xi
Resumo	xv
Abstract	xvii
Preâmbulo	xix
Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Água	1
1.2. Legislação	2
1.3. Acreditação	4
Capítulo 2 – Validação de métodos analíticos	7
2.1. Análise Indireta	8
2.1.1. Identificação	8
2.1.2. Especificidade e Seletividade	9
2.1.3. Sensibilidade	9
2.1.4. Limiares analíticos	10
2.1.4.1. Limite de Detecção	10
2.1.4.2. Limite de Quantificação	12
2.1.5. Linearidade e gama analítica	12
2.1.5.1. Linearidade	13
2.1.5.2. Gama analítica	14
2.1.6. Precisão	16
2.1.6.1. Repetibilidade	16
2.1.6.2. Reprodutibilidade	17
2.1.6.3. Precisão intermédia	18
2.1.7. Robustez	19
2.1.8. Coerência	20
2.2. Análise Direta	20
2.2.1. Exatidão	20
2.2.1.1. Materiais de Referência Certificados	21

2.2.1.2. Ensaio Interlaboratoriais	21
2.2.1.3. Testes comparativos	22
2.3. Controlo químico da qualidade	23
2.3.1. Controlo da qualidade interno	23
2.3.1.1. Calibração analítica	24
2.3.1.2. Materiais de Referência Internos	24
2.3.1.3. Análise de Brancos	25
2.3.1.4. Análise de Padrões de Controlo	25
2.3.1.5. Análise de Duplicados	25
2.3.1.6. Ensaio de recuperação	26
2.3.1.7. Cartas de Controlo	27
2.3.2. Controlo da qualidade externo	29
2.4. Estimativa da incerteza	29
2.4.1. Reprodutibilidade intralaboratorial	30
2.4.1.1. Padrões de controlo	30
2.4.1.2. Duplicados de amostras/amostras fortificadas	31
2.4.2. Efeito sistemático do método e do laboratório	31
2.4.3. Incerteza padrão combinada	32
2.4.4. Incerteza expandida	32
Capítulo 3 – Análise de óleos, gorduras e hidrocarbonetos por espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>	33
3.1. Óleos e gorduras	33
3.2. Hidrocarbonetos	34
3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>	35
3.4. Escolha do solvente de extração	38
3.4.1. Tetracloroetileno	38
3.5. Princípio do método	39
3.6. Material e método	42
3.6.1. Materiais, equipamento e reagentes	42
3.6.2. Método	43
3.6.3. Interferências/Limitações do método	44

Capítulo 4 – Análise de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno por micro-extração em fase sólida em cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa	45
4.1. Trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno	45
4.2. Cromatografia	46
4.2.1. Cromatografia Gasosa	48
4.2.2. Cromatografia gasosa associada ao detetor MS	50
4.3. Micro-extração em fase sólida, SPME	52
4.4. Princípio do método	53
4.5. Material e método	54
4.5.1. Materiais, equipamento e reagentes	54
4.5.2. Método	56
4.5.3. Interferências/Limitações do método	57
Capítulo 5 – Resultados e Discussão	59
5.1. Implementação e validação da determinação de óleos, gorduras e hidrocarbonetos em águas residuais por FTIR	59
5.1.1. Identificação	59
5.1.2. Especificidade e Seletividade	60
5.1.3. Sensibilidade	61
5.1.4. Limiares analíticos	61
5.1.4.1. Limite de quantificação	62
5.1.4.2. Limite de deteção	62
5.1.5. Linearidade e gama analítica	63
5.1.5.1. Linearidade – Teste de <i>Mandel</i>	63
5.1.5.2. Gama analítica – Teste de homogeneidade das variâncias	63
5.1.6. Precisão	64
5.1.6.1. Repetibilidade	65
5.1.6.2. Precisão intermédia	66
5.1.7. Exatidão	67
5.1.7.1. Testes de recuperação	67
5.1.8. Robustez	67
5.1.9. Coerência	68
5.2. Implementação e validação do método analítico de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno em águas de consumo por SPME-GC-MS	69

5.2.1. Identificação	69
5.2.2. Resolução	70
5.2.3. Avaliação do padrão interno	73
5.2.4. Especificidade e Seletividade	74
5.2.5. Sensibilidade	75
5.2.6. Limiares analíticos	76
5.2.6.1. Limite de quantificação	76
5.2.6.2. Limite de detecção	77
5.2.7. Linearidade e gama analítica	79
5.2.7.1. Linearidade – Teste de <i>Mandel</i>	79
5.2.7.2. Gama analítica – Teste de homogeneidade das variâncias	79
5.2.8. Precisão	80
5.2.8.1. Repetibilidade	81
5.2.8.2. Precisão intermédia	82
5.2.9. Exatidão	83
5.2.9.1. Testes de recuperação	83
5.2.10. Robustez	84
5.2.11. Coerência	84
5.2.12. Incerteza	85
5.2.13. Conservação de amostras	86
Capítulo 6 - Conclusão	89
Bibliografia	91
Anexos	95
Anexo A – Parâmetros avaliados em controlo de rotina (R1 ou R2) e controlo de inspeção	95
Anexo B – Tabelas: testes estatísticos	97
Anexo C – Esquema do fluxo de decisão e do procedimento para a estimativa da incerteza medida	99
Anexo D – PCIE: Abundância relativa de cada analito em função do seu tempo de retenção, com respetivo espetro de massa (<i>Full scan</i>)	101

Abreviaturas

ÆMITEQ	Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade
ANOVA	Análise de variância
BDCM	Bromodiclorometano
b_{rms}	Raiz quadrada da média dos desvios dos ensaios de recuperação
CE	Comissão Europeia
CEE	Comunidade Económica Europeia
CFC	Clorofluorcarboneto
C_i	Ionização química
CID	Colisão por dissociação induzida
CQ	Controlo de Qualidade
CQE	Controlo de Qualidade Externo
CQI	Controlo de Qualidade Interno
CV	Coefficiente de variação
DBCM	Dibromoclorometano
DL	Decreto-Lei
DR	Diferença relativa
EA	Cooperação Europeia para Acreditação
ECD	Detetor de captura eletrónica
E_i	Ionização por impacto eletrónico
EIL	Ensaio interlaboratoriais
EN	Norma Europeia
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
F	Teste de <i>Fisher</i>
F_{crit}	Valor tabelado da distribuição F de Fisher
FE	Fase estacionária
FID	Detetor de ionização por chama
FM	Fase móvel
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de <i>Fourier</i>
GC	Cromatografia Gasosa
GC-ECD	Cromatografia gasosa associada a um detetor de captura eletrónica

GC-MS	Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa
GQ	Garantia da Qualidade
H₀	Hipótese nula
H₁	Hipótese alternativa
HDE	Hidrocarbonetos
IAF	Fórum Internacional de Acreditação
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
ID	Número de identificação
IEC	Norma Internacional Eletrotécnica
ILAC	Cooperação internacional de acreditação de laboratórios
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IRAR	Instituto Regulador de Águas e Resíduos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IV	Infravermelho
LAI	Limite de Aviso Inferior
LAS	Limite de Aviso Superior
LC	Limite de Controlo
LCI	Limite de Controlo Inferior
LCS	Limite de Controlo Superior
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
m/z	massa/carga
MRC	Material de Referência Certificado
MRI	Material de Referência Interno
MS	Espectrometria de massa
NP	Norma Portuguesa
ODS	Substâncias de Depleção do Ozono
OG	Óleos e Gorduras
ONA	Organização Nacional de Acreditação
p[H₀]	Valor de prova da hipótese nula
p[H₁]	Valor de prova da hipótese alternativa
P01	Polinómio de primeiro grau
P012	Polinómio de segundo grau

PCIE	Perfil de corrente iónica extraída
PDMS	Polidimetilsiloxano
PI	Padrão interno
R	Radical
R	Coefficiente de correlação
R²	Coefficiente de determinação
R1	Controlo de rotina 1
R2	Controlo de rotina 2
SIM	Monitorização seletiva de iões
SGQ	Sistema de Gestão de Qualidade
SPME	Micro-extração em fase sólida
t_E	Tempo de permanência do analito na fase estacionária
TetraCE	Tetracloroetileno
THM	Trihalometanos
TIC	Corrente iónica total
t_M	Tempo morto ou tempo de retenção da fase móvel
TOF	Analizador do tempo de voo
t_R	Tempo de retenção
TriCE	Tricloroetileno
TV	Valor teste
U	Incerteza expandida
u_{add}	Incerteza na concentração do analito adicionado
u_b	Incerteza associada ao efeito sistemático
u_c	Incerteza combinada
u_{ma}	Unidade massa atómica
u_{R_w}	Incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VMA	Valor máximo admissível
VMR	Valor máximo recomendável
VP	Valor paramétrico
Z	z-score

Resumo

No âmbito da unidade curricular “Projeto Científico ou Projeto Industrial” do Mestrado em Química, com especialização em Controle de Qualidade e Ambiente, surgiu o interesse em estabelecer a correlação entre a vertente teórica e prática, daí a realização de um estágio curricular na ÆMITEQ – Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade. Trata-se de uma instituição privada de utilidade pública, sediada em Coimbra, cujo objetivo se prende no apoio à indústria e à comunidade no domínio da química, especializada em controlo químico da qualidade.

Numa fase inicial, o foco do trabalho desenvolvido passou pela integração num ambiente empresarial, pela familiarização com a legislação em vigor, no que diz respeito à análise de águas, e com o controlo de qualidade realizado, pelo desenvolvimento de competências na utilização de equipamento, material de laboratório e reagentes e pelo enquadramento nas atividades do laboratório (documentação, gestão de amostras e de equipamento, etc.). Para além disso, também foi importante o conhecimento pelas metodologias que existem dentro e fora do âmbito da acreditação.

O trabalho realizado incidiu na implementação e validação de dois métodos analíticos que se encontram, ainda, fora do âmbito da acreditação. O primeiro refere-se à determinação de óleos e gorduras e hidrocarbonetos totais, em águas residuais, por espectroscopia de Infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR), utilizando como solvente de extração tetracloroetileno. O segundo método analítico alude à determinação de trihalometanos (nomeadamente clorofórmio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromofórmio) e de solventes clorados, tricloroetileno e tetracloroetileno. Este método analítico é realizado em águas de consumo, através de micro-extração em fase sólida e posterior análise num cromatógrafo gasoso acoplado à espetrometria de massa (SPME-GC-MS). A implementação surge com a finalidade de substituir o ensaio acreditado realizado em cromatografia gasosa acoplada a um detetor de captura de eletrões (GC-ECD).

Abstract

Within the course “Scientific Project or Industrial Project” of the Master in Chemistry, with specialisation in Quality and Environmental Control, became interested in establishing the correlation between theoretical and practical approach, thus achieving a traineeship in ÆMITEQ – Association for Technology and Quality Innovation. It is a private institution of public utility, based in Coimbra, whose purpose is related to support the industry and the community in the field of chemistry, specializing in chemical quality control.

Initially, the focus of work spent by integration an enterprise environment, the familiarization with the legislation in force, with regard to water analysis, and quality control carried out by the development of skills in the use of equipment, laboratory equipment and reagent and the environment in the laboratory activities (documentation, sample management and equipment, etc.). Futhermore, it was also important to know the methods that exist within and outside the scope of accreditation.

The work focused on the validation and implementation of two analytical methods which are also outside the scope of accreditation. The first relates to the determination of oils and fats and total hydrocarbons, in waste water, by infrared spectroscopy by Fourier transform (FTIR), using tetrachloroethylene as extraction solvent. The second analytical method refers to the determination of total trihalometanes (such as chloroform, bromodichloromethane, dibromochloromethane and bromoform) and chlorinated solvents, trichloroethylene and tetrachlorethylene. This analytical method is performed in drinking water, through micro-extraction in solid phase and subsequent analysis in a gas chromatograph coupled to mass spectrometry (SPME-GC-MS). The implementation arises with the aim of replacing the assay believed carried out in a gas chromatography electron capture detector (GC-ECD).

Preâmbulo

A presente dissertação encontra-se organizada em seis capítulos, em conjunto com alguns anexos nos quais consta alguma informação adicional.

No **Capítulo 1** – Introdução – é feita uma referência ao historial da água, à empresa onde foi realizado este estágio curricular (EMITEQ), à legislação utilizada em termos de controlo de qualidade de águas e ao conceito de acreditação, bem como todas as etapas necessárias.

No **Capítulo 2** – Validação de métodos analíticos – encontram-se descritos todos os conceitos e procedimentos necessários ao processo de validação de métodos analíticos e ao controlo químico de qualidade. Para além disso, faz referência à norma ISO 11352:2012, que remete para a estimativa da incerteza.

O **Capítulo 3** – Análise de óleos, gorduras e hidrocarbonetos por espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* – descreve a técnica utilizada de forma detalhada: instrumentação, solvente de extração, processo de extração líquido-líquido, princípio do método, material, reagentes e possíveis interferências.

O **Capítulo 4** – Análise de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno por micro-extração em fase sólida em cromatografia gasosa associada à espetrometria de massa – contemplam conceitos de cromatografia gasosa, de espetrometria massa e de micro-extração em fase sólida. Também descreve o princípio do método, material, reagentes e possíveis interferências desta técnica.

No **Capítulo 5** – Resultados e Discussão – constam todos os resultados obtidos dos diversos parâmetros que fazem parte do processo de validação dos métodos analíticos estudados. Além dos resultados, são feitos vários comentários que permitem tirar conclusões plausíveis relativamente à validação realizada.

Por fim, no **Capítulo 6** – Conclusão – é apresentada a suma do estudo realizado.

Introdução

1.1. Água

A água é um recurso precioso, essencial para a existência do Homem e das suas atividades económicas. Muitas vezes, trata-se de um recurso limitado, sendo, conseqüentemente, necessária compreensão face à influência humana na quantidade e qualidade da água. É por isso fundamental, de uma forma crescente, o desenvolvimento de novos conceitos e metodologias que permitam a aplicação de políticas de gestão de água, uma vez que não é suficiente tratar a água apenas como um recurso disponível. ^[1, 2]

Esta substância vital encontra-se, maioritariamente, nos oceanos e sob a forma de gelo nos glaciares, acabando por apenas cerca de 1% dos recursos hídricos do Planeta representar a água disponível para consumo humano. É, sem dúvida, uma percentagem mínima, quando se sabe, por exemplo, que o corpo humano é constituído maioritariamente por água (entre 75% e 80%). ^[2, 3]

Desde sempre que o Planeta foi alvo de diversas e constantes agressões, nomeadamente, o consumo excessivo de água, a contaminação, a negligência e a carência do planeamento da mesma, havendo um reflexo de conseqüências várias, sobretudo na escassez da água e na saúde pública. Deste modo, os recursos hídricos tornam-se em vulgares meios de receção e transporte de poluentes, tais como, efluentes domésticos e industriais. A reutilização das águas residuais é uma medida sensata para a redução da escassez de água e conservação dos recursos. A garantia da qualidade da água para consumo humano, a gestão dos recursos hídricos, a manutenção dos reservatórios naturais de água e a garantia da sua pureza são pontos a ter em elevada consideração. ^[2, 4]

Para um maior e melhor controlo de qualidade da água é realizada a avaliação de parâmetros físico-químicos e microbiológicos, através de análises específicas e avaliação dos respetivos valores paramétricos. A

água de consumo humano exige um contínuo controlo de qualidade, com base em análises que garantam conformidade entre o tratamento/distribuição e os objetivos/regulamentos previstos. Estas análises devem ser realizadas periodicamente em laboratórios especializados e acreditados, com profissionais habilitados na área. Os parâmetros selecionados estão de acordo com a intenção do estudo a realizar, evitando danos ambientais e de saúde pública. ^[5]

Desde 1991 que a Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, ÆMITEQ, especializada em controlo químico da qualidade, desenvolve atividades de apoio técnico ao serviço da indústria e da comunidade nos domínios da química, ambiente, qualidade, energia e inovação. A partir de 1994 exerce as suas atividades em Coimbra, onde se encontra sediada. Trata-se de um laboratório acreditado de análises de águas, cujo objetivo visa o controlo da qualidade da água nos sistemas de abastecimento público. A ÆMITEQ presta ainda 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 residuais (ETAR). A competência técnica pode ser demonstrada através do rigoroso processo de acreditação e da participação em ensaios interlaboratoriais, nacionais e internacionais. A ÆMITEQ presta também serviços de apoio à indústria e à comunidade científica.

1.2. Legislação

A água, como bem essencial que é, exige um controlo de qualidade regular que garanta a isenção de qualquer risco, encontrando-se em conformidade com as normas estabelecidas legalmente. Estas normas visam a análise e proteção dos recursos hídricos, com base em programas de controlo adequados às necessidades locais e que cumpram os requisitos mínimos estabelecidos. ^[6]

A Diretiva n.º 80/778/CEE foi aprovada, em 1980, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida da população europeia. Contudo, em 1998, surgiu a necessidade de adaptar novas exigências, daí a aprovação da Diretiva n.º 98/83/CE pela União Europeia. A atual Diretiva foi transposta para o direito interno português através do Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, que, mais tarde, foi revogado pelo Decreto-Lei n.º 243/2001 de 5 de Setembro, em diversos aspetos da qualidade. Este DL estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade para a água de consumo humano com a finalidade de proteger a saúde do Homem dos efeitos nefastos de qualquer contaminação, garantindo a salubridade e limpeza da água. ^[7-9]

Atualmente, a qualidade da água para consumo humano é legislada pelo DL n.º 306/2007 de 27 de Agosto, resultante da revisão do D.L. n.º 243/2001 de 5 de Setembro. Este vai de encontro ao objetivo traçado pelo anterior, no entanto, pretende ainda assegurar a disponibilização tendencialmente universal da sua composição,

tal como as obrigações de garantia dos parâmetros de qualidade da água disponibilizada. Ainda estabelece critérios de repartição de responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, quando existir partilha da mesma por duas ou mais entidades gestoras. ^[6]

Para a regulação da qualidade da água foi criada uma autoridade competente para a coordenação e fiscalização do atual DL, o Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), nos dias de hoje designada por Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos (ERSAR). É uma entidade reguladora dos serviços de abastecimento público de água, saneamento de águas residuais e de gestão de resíduos urbanos, que pretende reforçar as medidas e instrumentos que privilegiam a eficácia da ação nesta área. A atividade da ERSAR visa assegurar uma correta proteção do utilizador dos serviços de águas, evitando possíveis abusos decorrentes dos direitos de exclusivo (tais como, garantia e controlo da qualidade dos serviços públicos prestados, supervisão e controlo das tarifas praticadas). A sua intervenção deve seguir os princípios de competência, isenção, imparcialidade e transparência, e considerar as vertentes técnica, económica, jurídica, ambiental, social, ética e de saúde pública. ^[6-8, 10]

O novo D.L. veio introduzir os conceitos de valores paramétricos (VP), que terão vindo substituir os valores máximos admissível (VMA) e recomendado (VMR). Segundo o D.L. 306/2007 de 27 de Agosto, o VP corresponde ao valor máximo ou mínimo fixado para cada um dos parâmetros a controlar, sendo classificado como parâmetro obrigatório ou parâmetro indicador. Os parâmetros obrigatórios abrangem os parâmetros químicos e microbiológicos, cujos valores não podem ultrapassar os que constam no DL. Já os parâmetros indicadores correspondem ao VP que deve ser considerado como um valor de referência. Caso o resultado da análise da amostra se enquadre nos valores paramétricos fixados para cada tipo de água, significa que os requisitos de qualidade da mesma são satisfeitos. Quando não existe conformidade de resultados, a autoridade competente (ERSAR, Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos) é informada e são tomadas medidas adequadas, definindo-se um plano que vise a resolução do incumprimento. ^[6]

Mediante o descrito no anexo II do D.L. n.º 306/2007, o controlo de qualidade da água de abastecimento é realizado com base em controlos de rotina (R1 ou R2) e de inspeção, segundo a avaliação de parâmetros que se pretende efetuar (Anexo A), em que ambos os controlos pretendem verificar o cumprimento dos valores paramétricos que constam em legislação. O controlo de rotina pretende assegurar informação regular sobre a qualidade organoléptica e microbiológica da água destinada ao consumo humano, bem como sobre a eficácia dos tratamentos existentes. O controlo de inspeção acaba por assegurar um controlo mais alargado da qualidade da água. ^[6] Os ensaios que levam à verificação do cumprimento da legislação são realizados obrigatoriamente por laboratórios acreditados para esse fim. ^[8]

1.3. Acreditação

O fenómeno de globalização associado à permanente evolução do mercado encaminhou as empresas para novos desafios, condicionando-as na procura de ferramentas de gestão que acrescentassem valor à organização, melhorassem o rendimento dos processos, controlassem os custos operacionais e valorizassem os recursos existentes. Assim, a implementação de um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) promove uma melhoria interna da organização, bem como o interesse pelo reconhecimento externo. ^[11]

Devido à necessidade do desenvolvimento de normas internacionais, que garantissem a qualidade dos serviços dos laboratórios de ensaio e calibração, surge a Norma ISO 17025: Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração, que apresenta os princípios técnicos e de gestão a serem seguidos para garantir a qualidade dos serviços prestados e demonstrar a sua competência técnica.

A acreditação baseia-se num conjunto de regras e procedimentos usados para o reconhecimento da competência técnica de entidades para a realização de atividades de avaliação da conformidade especificadas, sendo regida por normas internacionais. ^[12] Com o intuito de verificar o cumprimento dos requisitos da acreditação de um laboratório são realizadas reavaliações periódicas. Para um exemplar cumprimento dos requisitos das boas práticas laboratoriais, que se refletem em bons resultados, é necessário que um laboratório acreditado possua recursos humanos, instalações, equipamentos, métodos e procedimentos adequados. ^[12, 13]

O Instituto Português de Acreditação, IPAC, é um organismo nacional de acreditação nos termos do Regulamento (CE) nº 765/2008, que atua como agente regulador dos organismos de avaliação da conformidade. O IPAC tem como objetivo prestar serviços de acreditação, selecionando, treinando e qualificando para a sua execução um conjunto de avaliadores e peritos, que estão sujeitos aos deveres de sigilo profissional, imparcialidade e independência. ^[12]

Devido à harmonização global de normas, é possível a participação em Acordos de Reconhecimento Mútuo (EA & IAF & ILAC) entre organismos de acreditação, assegurando a livre circulação de bens e serviços compreendidos pelas acreditações. Para tal, o IPAC fica sujeito ao sistema de avaliações pelos pares da Cooperação Europeia para Acreditação, EA, e divulga publicamente o resultado dessas avaliações. ^[12]

O processo de acreditação engloba várias etapas, que constam no Regulamento Geral de Acreditação (DRC001): candidatura, avaliação e decisão; tendo por base a norma ISO 17025. ^[11] A fase da candidatura é marcada pela abertura de um processo de candidatura junto da Organização Nacional de Acreditação (ONA), sendo atribuído um código de registo ao laboratório que pretende acreditação. O laboratório deve apresentar uma candidatura completa e enviar ao IPAC os formulários correspondentes à área técnica que pretende

desempenhar. Na fase de avaliação, é feita uma análise documental ou uma avaliação presencial (auditoria), de modo a detetar não-conformidades, que podem ser resolvidas através da implementação de correções e ações corretivas adequadas. Ou seja, após a conclusão efetiva da fase de candidatura, o IPAC atribui a equipa avaliadora nomeada, a qual estuda a documentação e procede à avaliação, informando os membros do laboratório e da equipa auditora sobre a data da auditoria. A tomada de decisão pelo IPAC é realizada com base na análise dos relatórios, na opinião da equipa auditora e na análise das ações corretivas. Posteriormente, é redigido um relatório, no qual são referidas as não-conformidades a corrigir, demonstrando o cumprimento das normas de acreditação, ao qual a entidade terá de responder. Depois da equipa avaliadora realizar o seu estudo, emite um parecer, que se segue de uma análise processual pelo IPAC. Por fim, é tomada a decisão pelo IPAC, que é válida enquanto a entidade evidenciar cumprir os critérios e obrigações de acreditação. ^[12] Quando a decisão da acreditação é favorável, o IPAC procede à emissão de um certificado de acreditação, depois da entidade auditada ter efetuado o pagamento relativo ao processo, no qual é descrito o âmbito de acreditação.

Sempre que um laboratório possui o certificado de acreditação, significa que o laboratório é obrigado a cumprir os princípios estabelecidos, bem como sujeito a diversas auditorias, sendo necessário um esforço e dedicação constantes para que tal estado seja mantido. Contudo, o laboratório deixa de estar acreditado sempre que o solicitar, sempre que deixar de estar ativo ou sempre que for aplicada uma suspensão ou anulação. Cada laboratório tem um número de acreditação associado, sendo L0271 o número de acreditação da ÆMITEQ.

Para que o estado de acreditação seja mantido são realizadas auditorias. Estas visam uma avaliação presencial que consiste num diagnóstico sistemático e detalhado das atividades desenvolvidas no âmbito da acreditação, feita nos locais onde a entidade desenvolve tais atividades, pretende avaliar o cumprimento dos critérios de acreditação, como por exemplo: conformidade com os requisitos especificados, avaliação da eficácia do sistema de gestão empresarial, etc. As auditorias são realizadas anualmente, salvo raras exceções, tais como: mudanças significativas na organização e no sistema de gestão da empresa. ^[12]

2

Validação de métodos analíticos

Cada vez mais é exigida e reconhecida a necessidade de evidenciar a qualidade de um método de ensaio analítico, embora este possa envolver a presença de possíveis erros (sistemáticos ou aleatórios) e, conseqüentemente, a eventual alteração significativa do valor do resultado final. [14]

Para um controle efetivo dos resultados e para a garantia da interpretação e confiabilidade dos mesmos, o método analítico é sujeito a uma série de etapas de avaliação, que garantem a sua validação. Segundo a norma ISO/IEC 17025 – Requerimentos gerais de competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração, a validação de um método analítico consiste na “comprovação, através de evidências objetivas, de que o método cumpriu os requisitos para uma aplicação ou uso específico pretendido”. [15] O objetivo fundamental da validação visa então confirmar que as características do método satisfazem as especificações exigidas para os resultados analíticos, bem como estabelecer limites de controle a aplicar no trabalho de rotina. [11] É essencial que o método de validação se encontre descrito num procedimento laboratorial e que a determinação dos parâmetros de validação seja efetuada em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, devidamente calibrados. Para além disso, os analistas devem ser adequadamente treinados e qualificados. [13, 16, 17]

A revalidação do método acontece sempre que surge alguma modificação nas características de métodos normalizados e validados, pois na implementação de novos métodos de ensaio é feita a validação do mesmo.

Na elaboração de métodos internos de ensaio (métodos não normalizados) que produzem resultados fiáveis, é fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos que demonstrem, recorrendo à validação, que esses métodos internos de ensaio dão origem a resultados adequados à qualidade pretendida. É por isso que a validação dos métodos internos deve ser adaptada a cada caso, sendo necessário para tal o estudo e conhecimento de diversos parâmetros, tais como, por exemplo: gama de trabalho e linearidade da curva de calibração, limiares analíticos, sensibilidade, precisão e exatidão. Em análises

quantitativas, todos estes requisitos são importantes. Em análises qualitativas, os aspetos mais relevantes são o limite de deteção, a seletividade/especificidade e a robustez. Desta forma, o laboratório tem a liberdade de analisar os parâmetros que pretende incluir no seu plano de validação, mediante o tipo de metodologia. ^[18] Isto porque a validação de um método analítico não tem necessariamente que passar por todas as etapas referidas, pois, por vezes, é suficiente apenas demonstrar algumas delas, efetuando uma validação parcial do método.

Segundo as recentes diretivas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a Conferência Internacional sobre Harmonização, para que um método analítico seja validado completamente têm de ser avaliados 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. Para além disso, ainda envolve o controlo químico da qualidade, bem como a estimativa da incerteza segundo a norma ISO 11352.

2.1. Análise Indireta

A análise indireta corresponde à determinação e evidência dos parâmetros característicos do método:

- ❖ identificação;
- ❖ especificidade e seletividade;
- ❖ sensibilidade;
- ❖ limiares analíticos;
- ❖ linearidade e gama analítica;
- ❖ precisão;
- ❖ robustez;
- ❖ coerência.

2.1.1. Identificação

O ensaio de identificação tem como objetivo demonstrar a capacidade do método em identificar inequivocamente a presença ou ausência do analito na amostra, evidenciando que a propriedade físico-química em que o método analítico se baseia está diretamente relacionada com a presença do analito. O processo de identificação é feito 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 (por exemplo, metilação, etc.)]. [20-22]

Feita a escolha do melhor método para a determinação e detecção do analito em estudo é necessário garantir que o sinal instrumental proporcionado pelo equipamento corresponde de facto ao analito em questão. Geralmente, as condições de análise são referidas na literatura, embora haja necessidade de as verificar experimentalmente, devido à eventual presença de interferências de matriz.

2.1.2. Especificidade e Seletividade

A determinação dos parâmetros, especificidade e seletividade, foca o interesse em perceber se existem interferências no método e a sua influência nos resultados, uma vez que a matriz da amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição.

A seletividade avalia a capacidade de um método identificar um analito e um número restrito de interferentes numa mistura complexa. Já a especificidade tem a capacidade de responder apenas a um analito de interesse presente numa mistura complexa, não existindo interferentes no método. [23]

Para averiguar o efeito de possíveis interferentes poder-se-á realizar um teste de recuperação, usando uma série de amostras com a mesma matriz, existindo apenas variação da concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. É conveniente que as amostras sejam analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade. [23]

Um método analítico é considerado específico e seletivo quando se confirmam percentagens de recuperação dentro dos critérios de aceitação pré-definidos.

2.1.3. Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método/equipamento para distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Esta corresponde à derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de calibração. Caso a curva de calibração seja 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,

$$\text{Sensibilidade } (m) = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad (2.1)$$

em que 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). [23]

A sensibilidade é um parâmetro interessante pelo seu relativismo, ou seja,

- ✧ quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo;
- ✧ quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para um mesmo analito;
- ✧ quando se compara a sensibilidade para vários analitos. [23]

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

2.1.4. Limiars analíticos

Em Química Analítica, os conceitos de limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) têm extrema importância, uma vez que estes permitem que o analista trace os limiars analíticos possíveis de alcançar com o método a utilizar. Tratam-se dos limites inferiores da curva de calibração, que correspondem a baixos níveis de concentração. [22-24]

O intervalo compreendido entre o limite de deteção e o limite de quantificação deve ser considerado como uma zona de deteção semi-quantitativa e não quantitativa, não devendo ser reportados valores numéricos neste intervalo. [24-25]

Em qualquer caso, os LD e LQ referem-se à variável medida, pelo que deverão ser tidas em conta as diluições efetuadas nas amostras. Estes limites dependem de diversos fatores que variam no tempo (contaminações, tipo de amostra, equipamento, operador, ...), devendo assim ser reavaliados sempre que haja variação de equipamento, pessoal, critérios, quando se trabalha com gamas baixas de concentração. [24]

2.1.4.1. Limite de Deteção

O limite de deteção corresponde à menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser fiavelmente distinguida do branco. Com uma dada confiança estatística, geralmente 95%, o limite de deteção corresponde ao início do intervalo em que é possível distinguir o sinal do branco do sinal da amostra, indicando se o analito em questão está presente ou ausente. Ou seja, a mais pequena quantidade de analito numa amostra (LD) pode ser estatisticamente detetada, mas não tem de ser necessariamente quantificada com um valor exato,

uma vez que a quantificação a este nível está sujeita a erros significativos. Qualquer leitura que seja inferior ao limite de deteção não significa que o analito esteja ausente, apenas indica que a concentração do composto em causa é inferior a um certo valor. [24]

O limite de deteção pode ser determinado através de réplicas de brancos ou de padrões vestígio e através da calibração linear. Na primeira situação, o LD pode ser expresso por:

$$LD = x_0 + ks_0 \quad (2.2)$$

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 . Partindo do princípio que se trata de uma distribuição normal de erros (gaussiana) e de que a lei de probabilidade de x_0 é suficientemente conhecida, então o valor de k (constante da distribuição normal) é 3,3 para um nível de confiança de cerca de 99,7%.

Na segunda situação, o LD pode ser calculado mediante a expressão:

$$LD = \frac{[3,3 \times S_{y/x}]}{b} \quad (2.3)$$

onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio-padrão residual da curva de calibração e b representa o declive da reta de calibração. [23]

Caso a concentração correspondente ao sinal do branco não tenha significado, o LD pode ser determinado de acordo com a expressão:

$$LD = t_{(n-1,1-\alpha)}^u \times s_0 \quad (2.4)$$

onde $t_{(n-1,1-\alpha)}^u$ representa o 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]

Para que o limite de deteção seja definido corretamente, há que conhecer dois conceitos estatísticos referentes a análises laboratoriais:

- ✧ erro do tipo I (risco α) – probabilidade de confirmar a presença do analito em estudo numa amostra, quando, na verdade, este está ausente.
- ✧ erro tipo II (risco β) – probabilidade de confirmar a ausência do analito em estudo numa amostra, quando, na verdade, este está presente.

Estes dois tipos de erros devem ser minimizados optando-se por definir que $\alpha = \beta = 5\%$, para ser feita uma correta análise destes limiares analíticos.

2.1.4.2. Limite de Quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exatidão e precisão. Em termos práticos, LQ corresponde ao padrão de calibração de menor concentração. Após a determinação deste limite, o mesmo deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão conseguida é satisfatória, recorrendo a uma série de padrões internos, em condições de precisão intermédia, cuja concentração se encontre próxima ou igual à do limiar de quantificação. O coeficiente de variação (**CV**) associado, também conhecido por desvio-padrão relativo, não deve exceder 10%. Na prática, só podem ser reportados valores de concentrações superiores ao LQ.^[23]

Quantitativamente, o limite de quantificação é determinado, genericamente, por:

$$LQ = x_0 + 10s_0 \quad (2.5)$$

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

No caso do LQ ser determinado através de padrões vestígio ou brancos fortificados, independentes, estes são testados em condições de precisão intermédia, e sujeitos a estudos de exatidão e precisão.

Se o método envolver a utilização de uma calibração linear, o LQ é dado por:

$$LQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b} \quad (2.6)$$

onde $S_{y/x}$ corresponde ao desvio-padrão residual da curva de calibração e b ao declive da mesma.

Embora o limite de quantificação teórico esteja definido para o método, é necessário proceder a atualizações dos limites experimentais sempre que ocorram alterações na rotina do método.

2.1.5. Linearidade e gama analítica

A quantificação num método analítico requer o conhecimento sobre a dependência entre a resposta do sistema de medição e a concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Esta relação é conseguida através da curva de calibração, que deve ser efetuada, em cada dia de análise, cumprindo os critérios de aceitação

definidos internamente. Para realizar regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados, é aconselhável o uso da norma ISO 8466-1 como referência para calibrações analíticas. 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 (com maior concentração). [23, 26]

A análise da linearidade e da gama de trabalho deve ser efetuada ao longo da fase de implementação/validação do método de ensaio ou sempre que se justifique. Em análises de rotina, a linearidade da curva de calibração usada em determinado método analítico deve ser avaliada através da sua representação gráfica juntamente com a análise do coeficiente de correlação.

2.1.5.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico corresponde à capacidade do mesmo produzir um sinal que seja diretamente proporcional à concentração do analito, dentro de uma determinada gama de trabalho. Na prática, para traçar a curva de calibração são necessários definir, no mínimo, cinco pontos, não incluindo o ponto zero da curva, para que não existam eventuais erros associados.

A análise de correlação linear é uma das formas de verificar a linearidade da curva de calibração. O **coeficiente de correlação (R)** estabelece a interdependência entre sequências de dados entre o sinal medido e a concentração do padrão correspondente, enquanto o **coeficiente de determinação (R^2)** traduz a adequabilidade do modelo linear aos valores experimentais, ou seja, a variabilidade explicada pelo modelo. Esta representação 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 mesma. \bar{x} representa a média de valores da concentração dos padrões utilizados e \bar{y} a média dos valores do sinal instrumental. Desta forma, o coeficiente de correlação é expresso por:

$$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 (2.7)$$

O valor do coeficiente de correlação pode tomar valores entre $[-1; +1]$, ou seja, $-1 \leq R \leq 1$. Quando $R = -1$, trata-se de uma correlação negativa (reta de declive negativo). Quando $R = 1$, trata-se de uma correlação positiva (reta de declive positivo). Ambas as situações refletem correlações perfeitas. Contudo, se for obtido um bom valor do coeficiente de correlação ($\cong 1$), não significa que a correlação linear seja a que melhor se ajusta. É por isso que este parâmetro deve implicar a visualização da curva de calibração, recorrendo

à elaboração de um gráfico do sinal obtido em função da concentração dos padrões, para que sejam detetadas tendências não lineares dos resultados. [20, 23, 26]

A avaliação da linearidade pode ser feita através de um modelo estatístico, conforme a norma ISO 8466-1. Partindo de um conjunto de pares ordenados, determina-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear, tal como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}^2$ e $S_{y^2}^2$. A diferença das variâncias (DS^2) é calculada pela expressão:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y^2}^2 \quad (2.8)$$

em que N corresponde ao número de padrões de calibração.

O valor teste (TV) é dado por:

$$TV = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (2.9)$$

É feita a comparação entre o valor obtido e o valor tabelado da distribuição F de Fisher:

- ✧ Se $TV \leq F_{crit}$: a função de calibração é linear.
- ✧ Se $TV > F_{crit}$: a função de calibração não é linear. Neste caso deve-se averiguar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

Através do método dos mínimos quadrados, é possível chegar ao melhor ajuste dos pontos obtidos. No caso da função linear possuir o melhor ajuste, a equação da reta que relaciona as duas variáveis é dada por: [23]

$$y = ax + b \quad (2.10)$$

onde,

y = resposta dada pelo equipamento

x = concentração do analito

a = declive da reta

b = interseção da reta com o eixo y (ordenada na origem)

2.1.5.2. Gama analítica

A gama de trabalho corresponde ao intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com boa linearidade, precisão e exatidão. Para que esta seja definida é necessário que a resposta instrumental seja, preferencialmente, linear e que haja homogeneidade de variâncias na variável dependente. Assim, é

recomendado o uso da norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau. [23, 26, 27]

O teste de homogeneidade de variâncias permite avaliar a gama de trabalho, quando é utilizado um método que envolve a representação gráfica de uma curva de calibração. Nos métodos em que tal não acontece, a gama de trabalho deve ser definida previamente e pode ser função de alguns fatores como, por exemplo, a quantidade de amostra disponível ou a boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos em volumetrias. [20, 23, 26]

Segundo a norma ISO 8466-1, é recomendado a utilização de dez pontos de calibração. Caso estes não sejam efetuados ou exista rejeição de algum valor, a reta de calibração deve ter no mínimo cinco pontos, distribuídos equitativamente ao longo da gama de trabalho. O primeiro e o último padrão são analisados através de dez réplicas independentes, realizando-se o teste de homogeneidade de variâncias da seguinte forma:

- ❖ Determinação das variâncias associadas ao primeiro e último padrão (S_1 e S_N), de acordo com:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (2.11)$$

sendo,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (2.12)$$

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

i representa o número do padrão e j 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:

$$\checkmark \quad TV = \frac{S_N^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_N^2 > S_1^2 \quad (2.13)$$

$$\checkmark \quad TV = \frac{S_1^2}{S_N^2}, \text{ quando } S_N^2 < S_1^2 \quad (2.14)$$

Comparando o valor teste TV e o valor tabelado da distribuição F de Fisher, para $n - 1$ graus de liberdade:

- ❖ Se $TV \leq F_{crit}$: a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada.
- ❖ Se $TV > F_{crit}$: a diferença de variâncias é significativa e deve-se reduzir a gama de trabalho até que a diferença entre as variâncias permita obter $TV \leq F_{crit}$.

2.1.6. Precisão

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

Segundo as diretivas da Relacre e da ICH (*Internacional Conference on Harmonisation*), a precisão pode ser avaliada de três formas: [23, 28-30]

- ✧ Repetibilidade;
- ✧ Reprodutibilidade;
- ✧ Precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial.

Geralmente, a precisão é expressa sob a forma de desvio-padrão (**s**)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.15)$$

ou pelo coeficiente de variação (**CV**):

$$\%CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.16)$$

onde **s** corresponde ao desvio-padrão da precisão e \bar{x} à média dos resultados obtidos.

Quer a repetibilidade, quer a reprodutibilidade dependem, geralmente, da concentração de analito, por isso devem ser determinadas para um diferente número de concentrações.

2.1.6.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado nas mesmas condições experimentais e num curto intervalo de tempo. Estas condições devem ser tão estáveis quanto possível como, por exemplo:

- ✓ mesmo analista;
- ✓ mesmo laboratório;
- ✓ mesmo equipamento;
- ✓ mesmos reagentes.

Para além disso, a repetibilidade expressa-se pela dispersão dos resultados e pode ser determinada a partir de um ensaio interlaboratorial ou intralaboratorial, em amostras de diferentes concentrações, considerando toda a gama de trabalho, em materiais de referência internos ou em soluções padrão. A determinação da repetibilidade exige, no mínimo, 10 ensaios. [23, 29, 31]

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

$$\Delta r = t_{0,05(m-1)}^u \times \sqrt{2} \times S_{ri} \quad (2.17)$$

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

Se a amplitude entre os dois ensaios for superior ao limite, deve ser feita uma análise crítica e, se necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano assente em dados bibliográficos ou normas (por exemplo, Norma ISO 5725-2 e ISO 5725-6). [29, 31]

Também é importante considerar 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, \bar{x} , segundo a expressão:

$$\%CV_r = 100 \times \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \quad (2.18)$$

2.1.6.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efetuado em condições experimentais diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio numa mesma amostra, fazendo variar determinadas condições de medição como, por exemplo:

- ✧ operadores diferentes;
- ✧ laboratórios diferentes;
- ✧ equipamentos diferentes;
- ✧ intervalo temporal diferente.

Este parâmetro define a amplitude de erros aleatórios de quantificação a uma escala transnacional e só pode ser estimado através de ensaios interlaboratoriais. Desta forma, é feito o envio de uma série de amostras aos laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre a mesma amostra. O valor da variância associada à reprodutibilidade é determinada segundo a expressão:

$$S_{Ri}^2 = S_{Li}^2 + S_{ri}^2 \quad (2.19)$$

em que S_{Ri}^2 corresponde à variância da reprodutibilidade, S_{Li}^2 à variância interlaboratorial e S_{ri}^2 à variância da repetibilidade. [19, 20, 23]

Quando o objetivo passa pela implementação de um novo método de análise, o estudo da reprodutibilidade de um método é imprescindível, visto que assim surge a necessidade de averiguar a precisão do método sobre diferentes condições de trabalho. O mesmo não tem tal importância na validação de um método num laboratório de análises, uma vez que a intenção passa por executar o método nesse mesmo laboratório, dando uso ao mesmo equipamento e condições experimentais que variam pouco ao longo do tempo.

O limite de reprodutibilidade (ΔR) corresponde ao valor máximo admissível para a diferença absoluta entre ensaios em condições de reprodutibilidade, determinada para o nível de confiança de 95%. De modo similar à equação 2.17, o limite de reprodutibilidade é dado por:

$$\Delta R = t_{0,05(m-1)}^u \times \sqrt{2} \times S_{Ri} \quad (2.20)$$

Também é importante considerar 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, \bar{x} , segundo a expressão:

$$\%CV_R = 100 \times \frac{S_{Ri}}{\bar{x}} \quad (2.21)$$

2.1.6.3. Precisão intermédia

A precisão intermédia, também conhecida por variabilidade intralaboratorial, exprime a precisão estimada sobre a mesma amostra ou padrão, utilizando o mesmo método, dentro do mesmo laboratório, estabelecendo exatamente as condições que sofrem alterações, tais como: [23, 30]

- ✧ operadores diferentes;
- ✧ equipamentos diferentes;
- ✧ intervalo temporal diferente.

A quantificação da precisão intermédia consiste em efetuar diversas medições sobre uma amostra ou um padrão, variando os parâmetros experimentais em cada análise. A sua determinação é feita com recurso a cartas de controlo de amplitudes, pois assume-se que, ao realizar ensaios em dias diferentes, existe uma considerável variação aleatória dos parâmetros experimentais não controlados, que afetam o desempenho do método.

A precisão intermédia é determinada com base nos resultados de t padrões, que devem ser analisados em replicado, as mesmas n vezes, de acordo com a expressão:

$$S_{\text{precisão}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}} \quad (2.22)$$

em que $S_{\text{precisão}}$ corresponde ao desvio-padrão relativo da precisão intermédia, n ao número de réplicas, y_{jk} ao resultado replicado k (variando k entre 1 e n) do padrão j (variando j entre 1 e t) e \bar{y}_j à média aritmética dos resultados de n ensaios realizados sobre o padrão j . Esta equação exige que o termo $t(n-1)$ seja superior a 15. [23]

2.1.7. Robustez

A robustez de um método analítico corresponde à capacidade do método produzir o mesmo resultado, mantendo o seu desempenho analítico inalterável perante pequenas alterações das condições experimentais (por exemplo: variação de temperatura, pH, força iónica, composição de uma mistura de solventes).

A avaliação da robustez e a verificação da influência de cada uma das variações nos resultados obtidos é feita através do teste de *Youden*. Este consiste 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. Como fatores designam-se todos os parâmetros cujos efeitos se pretendem quantificar, através dos resultados de ensaios.

Este parâmetro (robustez) trás consigo aspetos vantajosos. Por exemplo, maior robustez de um método implica maior insensibilidade de fatores experimentais deliberadamente alterados, o que faz com que o método continue a conduzir a valores concordantes, apesar das alterações efetuadas. Ou seja, quanto maior a robustez de um método, maior a confiança do mesmo quanto à sua precisão.

Em alternativa ao teste de *Youden*, pode ser testado o método em condições de precisão intermédia, ao longo de um elevado número de dias, obtendo um número significativo de resultados, em termos de precisão do método. Esta possibilidade fornece informação preciosa acerca do comportamento da metodologia em condições experimentais diferentes, no entanto, não tem a capacidade de oferecer as vantagens do teste de *Youden*. [23]

2.1.8. Coerência

A coerência de um método analítico avalia a sua capacidade em conduzir sempre ao mesmo resultado, ou seja, traduz-se na auto-concordância dos valores de ensaios em instantes diferentes. Conforme a USP (*United States Pharmacopeia*), este parâmetro pode ser quantificado através da variabilidade dos resultados obtidos sob a alteração de várias condições experimentais (por exemplo: no mesmo laboratório, diferentes analistas, instrumentos, reagentes, períodos de tempo, entre outros), sendo expressa por %CV. [32]

2.2. Análise Direta

A análise direta pretende 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. [23]

Neste tipo de análise, podem ser utilizados os vários processos:

- ✧ Materiais de Referência Certificados (MRC);
- ✧ Ensaios interlaboratoriais;
- ✧ Testes comparativos.

2.2.1. 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 está dependente de erros sistemáticos, 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 de: [23]

- ✧ erro absoluto (Δ);
- ✧ erro relativo (%RE);
- ✧ fator de desempenho (*z-score*);
- ✧ erro normalizado (E_n);
- ✧ percentagem de recuperação (%Rec).

2.2.1.1. Materiais de Referência Certificados

Os materiais de referência certificados (MRC) apresentam um valor de uma determinada grandeza (por exemplo, concentração) conhecida para um dado parâmetro, com uma incerteza associada a esse valor. Segundo o Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025, os MRC são “preparados por entidades reconhecidas, sendo atribuídos valores certificados e respetivas incertezas aos parâmetros”. [33] Estes estabelecem a rastreabilidade das medições químicas e permitem controlar a exatidão do método utilizado. Desta forma, poderão ser utilizados no processo de validação, na implementação ou como controlo de qualidade na utilização quotidiana. [24]

A aquisição de um MRC deverá ser feita a um organismo fornecedor reconhecido e credível. A sua utilização consiste na sua análise para avaliar o desempenho do método utilizado pelo laboratório. O valor obtido pelo método na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado determinando-se o erro e exatidão da análise. Quando o valor obtido na análise do MRC não se encontra dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deverá procurar as causas na origem desse desvio e tentar eliminá-las ou aceitá-las. A avaliação dos resultados obtidos na análise de um MRC pode ser feita usando processos suplementares tais como:

- ✧ erro relativo;
- ✧ teste de hipóteses (*t-test*);
- ✧ fator de desempenho (*z-score*);
- ✧ erro normalizado.

2.2.1.2. Ensaio Interlaboratoriais

Com o intuito de estabelecer a comparação entre os resultados obtidos pelo laboratório e o valor aceite como verdadeiro, recorre-se à utilização de ensaios interlaboratoriais. Estes são uma ferramenta fundamental no controlo de qualidade externo, visto que asseguram a qualidade do resultado obtido pelo método. [23] Para além disso, podem ser de vários tipos, mediante os objetivos a que se destinam:

- ✧ **Ensaio interlaboratorial de aptidão** – visa avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, funcionando nalguns países como uma condição para a acreditação do laboratório. Os participantes, geralmente, podem usar os métodos que preferirem.
- ✧ **Ensaio interlaboratorial de normalização** – visa o estudo das características de um método de análise (reprodutibilidade e repetibilidade). A utilização exclusiva do método em causa é uma exigência. Desta

forma, caso se pretenda demonstrar a repetibilidade e reprodutibilidade de um método que evidencie, em simultâneo, precisão compatível com a de outros laboratórios, então pode-se recorrer a um ensaio interlaboratorial de normalização. Contudo, se se pretender evidenciar a exatidão dos resultados, a melhor opção passa por participar em ensaios interlaboratoriais de aptidão.

A utilização do fator de desempenho “*z-score*” permite quantificar a avaliação do desempenho obtido pelo laboratório, envolvendo o resultado obtido pelo método de análise em estudo (X_{lab}), o resultado aceite como verdadeiro (X_v) e o desvio-padrão entre os resultados obtidos por todos os laboratórios presentes no ensaio interlaboratorial (s), de acordo com a expressão: ^[23]

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s} \quad (2.23)$$

O desempenho é avaliado segundo a escala de pontuação (Figura 2.1):



Figura 2.1 – Esquema representativo da avaliação do fator desempenho, “*z-score*”. (adaptado de ^[23])

ou seja,

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

$2 < |Z| < 3 \Rightarrow$ Questionável

$|Z| \geq 3 \Rightarrow$ Incorreto

Através dos ensaios interlaboratoriais é possível averiguar se a incerteza do resultado obtido (U_{lab}) está bem estimada, isto é, se o valor X_v está dentro do intervalo de incerteza de X_{lab} . Se tal não acontecer, o intervalo relativo à incerteza pode ser subestimado e é necessário recorrer ao conceito de erro normalizado (E_n) para avaliar o desempenho.

2.2.1.3. Testes comparativos

Na validação de um método interno de ensaio, a aplicação de testes comparativos é uma mais-valia, para além de uma opção mais económica, uma vez que permite estabelecer a comparação entre os resultados obtidos por esse mesmo método e os resultados de um método considerado como referência. Este tipo de ensaio comparativo pretende fundamentalmente realizar o estudo da proximidade dos resultados obtidos pelos dois

métodos de ensaio, ou seja, avaliar a exatidão do método interno face ao método de referência. Em termos práticos, usando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras, são realizadas análises em replicado. Este tipo de comparação pode ser feito tanto numa gama restrita de concentrações como em toda a gama de concentrações na qual se pretende validar o método. [23]

2.3. Controlo químico da qualidade

Uma das necessidades de um laboratório químico passa pela obtenção de resultados de análises químicas, que apenas é conseguida se os mesmos apresentarem qualidade adequada ao uso que lhes será incutido. [23]

O conceito de qualidade encontra-se, inequivocamente, associado ao sentido de bem-estar, satisfação do cliente, garantia da mesma e fiabilidade do resultado. Desse modo, feita a validação do método analítico, deve ser realizado um controlo da qualidade que garanta que as condições de validade do método se mantêm. Qualquer análise química pode ser sujeita a manipulações que induzam a erros, tanto sistemáticos como aleatórios, que podem afetar significativamente o valor do resultado final. É, por isso, essencial a minimização das fontes de erro (designada por Garantia da Qualidade - GQ) e o controlo da sua ocorrência (designado por Controlo da Qualidade - CQ), com vista à garantia e melhoria da eficácia do Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) escolhido. A necessidade da avaliação periódica da exatidão dos resultados provem dos objetivos traçados pelo SGQ: garantia e o controlo da qualidade dos resultados diários. Para tal, recorre-se ao controlo de qualidade interno (CQI) e ao controlo de qualidade externo (CQE). O CQI depende dos meios utilizados pelo próprio laboratório, enquanto que o CQE corresponde às ações realizadas pelo laboratório que dependem de intervenções externas ao mesmo. [23, 24]

2.3.1. Controlo da qualidade interno

O controlo da qualidade interno dos métodos de ensaio corresponde ao conjunto de procedimentos realizados num laboratório para uma análise de rotina, tendo como objetivo o controlo da qualidade dos resultados obtidos à medida que as análises são executadas. O sistema de controlo da qualidade interno que o laboratório possui deve recorrer a determinadas ferramentas como, por exemplo [24]:

- ❖ Materiais de Referência Internos (MRI);
- ❖ Técnicas complementares de CQ de resultados, nomeadamente:
 - análise de brancos em paralelo com amostras;
 - uso de análises em duplicado;

- repetição de análises anteriormente efetuadas;
 - ensaios de recuperação e fortificação de amostras;
 - uso do método de adição de padrão;
 - comparação de resultados obtidos por diferentes técnicas analíticas;
 - correlação de resultados de características diferentes da mesma amostra;
- ❖ Tratamento estatístico de dados, como as cartas de controlo.

A seleção de técnicas complementares de CQ deve ser feita mediante a complexidade e dificuldade dos métodos e as fontes de erro a controlar.

2.3.1.1. Calibração analítica

A calibração analítica depende do tipo de análises e de amostras analisadas. É realizada com o número mínimo de pontos definidos pelo fabricante, com a periodicidade definida ou sempre que for 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. [24]

Quando não é efetuada uma curva de calibração na sessão de trabalho, a verificação da calibração é feita, pelo menos, com os padrões correspondentes ao limite inferior e superior da gama de trabalho.

O controlo da curva de calibração é feito tendo por base o:

- ✧ coeficiente de correlação (R) da curva de calibração, de modo a avaliar a linearidade;
- ✧ declive da reta para controlo da estabilidade/sensibilidade da curva.

2.3.1.2. Materiais de Referência Internos

Muitas vezes chamados como materiais de referência do Laboratório, os materiais de referência internos (MRI) são imprescindíveis para o controlo da qualidade interno, permitindo controlar a exatidão e a precisão/fidelidade ao longo do tempo. [34] Como MRI podem ser utilizados: amostras de controlo, padrões de matriz ajustada com a das amostras, padrões semelhantes e/ou remanescentes de amostras de ensaios interlaboratoriais.

A frequência do uso dos MRI deve ser estabelecida consoante as características de cada análise. Esta deve aumentar quando:

- ✧ não houver MRC ou ensaios interlaboratoriais disponíveis e adequados;

✧ não forem usados outros meios de controlo da precisão/fidelidade a médio/longo prazo. [24]

Os padrões de calibração e de controlo são efetuados através dos MRI independentes. As concentrações utilizadas nos padrões de controlo devem ser semelhantes às das amostras (em análises de rotina) e estabelecidas junto à zona de interesse (obrigatório a utilização de padrões nos limiares das gamas de trabalho). Para além disso, o CQI através de padrões deve representar pelo menos 5% do volume de amostras (a menos que a norma de ensaio ou a legislação especifique outra frequência), ou seja, a cada 20 análises. [24]

2.3.1.3. Análise de Brancos

O controlo de brancos é uma grande ajuda para a deteção de eventuais contaminações ou deterioração de reagentes, permitindo ainda controlar (indiretamente) o limite de deteção e/ou quantificação. Esta técnica deve ser reforçada se o laboratório alterar os reagentes, o material de lavagem ou outros propícios a introduzir contaminações. [34]

No ensaio em branco estão presentes todos os reagentes, exceto a amostra. Também é de realçar o facto do resultado obtido ter de ser inferior ao limite de deteção do método.

2.3.1.4. Análise de Padrões de Controlo

Os padrões de controlo são independentes dos padrões de calibração. Os reagentes, solventes e soluções usados no controlo da curva de calibração devem apresentar um grau de pureza e estabilidade compatíveis com a qualidade exigida pelos resultados, independentemente da sua preparação ser feita pelo próprio laboratório ou adquirida comercialmente. Em qualquer sessão de trabalho que seja efetuada calibração, deve ser feita a análise, no mínimo, de um padrão, em conformidade com a concentração das amostras e com a frequência definida mediante o método de ensaio. [24, 34]

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

2.3.1.5. Análise de Duplicados

A análise de duplicados consiste em ensaios realizados sobre duas tomas de amostra submetidas em separado a todo o processo analítico e não na realização de várias medições ou leituras sobre a mesma toma de

amostra. A análise de uma amostra em duplicado não garante que o resultado final possua um erro menor (maior exatidão), visto que podem ocorrer erros sistemáticos, logo ambos os duplicados são afetados. Contudo, se ocorrer um erro acidental somente num dos duplicados, então o valor médio terá um erro menor. [24, 34]

Este tipo de análise deve ser considerada como uma ferramenta de detecção de erros acidentais e de controlo de repetibilidade, sendo aconselhável que a frequência da sua realização não seja inferior a 5%.

A utilização de duplicados é especialmente recomendada para análises com diversos passos e fontes de erro, para novas amostras ou amostras de difícil homogeneização e/ou estabilidade e para treino de novos analistas ou domínio e aprendizagem de novos ensaios. [34]

A avaliação do resultado dos duplicados é feita através da diferença relativa (DR), expressa em percentagem, para resultados quantificáveis:

$$DR = \frac{|A - D|}{\bar{X}} \times 100 \quad (2.24)$$

em que A corresponde ao resultado da amostra, D ao resultado do duplicado e \bar{X} à média aritmética dos resultados da amostra e do duplicado.

Geralmente, 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. Ainda assim, podem existir análises que optem por usar o resultado do duplicado para confirmação do primeiro resultado obtido, assumindo o primeiro como resultado final.

2.3.1.6. Ensaio de recuperação

Os ensaios de recuperação são muito importantes na análise qualitativa da resposta analítica obtida em inúmeras matrizes, devendo ser efetuados regularmente e ao longo de toda a gama de trabalho. O conceito “recuperação” reflete a relação entre a quantidade de analito recuperada no processo face à quantidade real presente na amostra. Este tipo de ensaios pretende identificar a viabilidade do método em diferentes matrizes que correspondem a amostras reais, através da adição de uma quantidade conhecida de uma solução padrão numa amostra real (designada por fortificação da amostra), de modo a verificar a quantidade de analito obtida. Ambas as amostras são analisadas posteriormente, sendo determinada a percentagem de recuperação.

O objetivo da percentagem de recuperação consiste na verificação da existência de efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, também conhecido por efeito de matriz. Este efeito baseia-se na

presença de interferentes característicos de determinadas matrizes, que causam um aumento ou diminuição da resposta analítica. Na prática, a percentagem de recuperação indica a eficácia com que o analito introduzido numa amostra é recuperado. A percentagem de recuperação é dada por:

$$\%Rec = \frac{|c_f(V + V_1) - c_i V_1|}{c_a V} \times 100 \quad (2.25)$$

em que c_f e $V + V_1$ correspondem à concentração e volume após fortificação da amostra; c_i e V_1 correspondem à concentração e volume da amostra real; c_a e V correspondem à quantidade e volume da solução padrão. [24, 25, 34]

Em métodos instrumentais, nos quais possam existir eventuais perdas ou contaminações, a realização de ensaios de recuperação na matriz a analisar junto do LQ deve ser feita mais frequentemente.

Em termos de critérios de aceitação, a recuperação apresenta-se, por exemplo, entre 80-120%, uma vez que o laboratório tem a liberdade de definir outro critério, consoante o desempenho e/ou complexidade do método.

2.3.1.7. Cartas de controlo

Wallter Shewhart, em 1931, através do estudo de um dos seus processos laboratoriais, formalizou a distinção entre variação controlada e não controlada, que corresponde às chamadas causas comuns e causas especiais. Tal deu origem ao desenvolvimento da carta de controlo, uma ferramenta simples e poderosa para separar estes dois tipos de causas. [34]

As cartas de controlo são usadas com êxito em diversas situações de controlo da qualidade interno. Deste modo, estas cartas servem para verificar o desempenho de um processo, isto é, se está ou não fora de controlo, permitindo detetar possíveis não conformidades. É por isso que o objetivo destas consiste em manter a qualidade satisfatória e uniforme do produto em estudo, acabando a média e o desvio-padrão por serem constantes, se existir controlo. Para além disso, a carta de controlo (do Inglês, *chart*) deve ser adaptada de acordo com as necessidades da operação que se monitorizarem, reconhecendo a estabilidade estatística de um dado “evento”, uma vez que se trata de uma ferramenta estatística muito importante. A intervenção imediata, em casos de anomalias, acaba por reduzir os riscos de rejeição de produtos e erros nos resultados.

As cartas de controlo tentam atender a alguns aspetos estatisticamente fundamentados:

- ✧ evidenciar prontamente as situações fora de controlo;

- ✧ evitar falsos alarmes, ou seja, situações acidentais que não representam uma efetiva alteração do processo;
- ✧ evidenciar a necessidade de uma avaliação de uma reavaliação do processo, pois as estimativas iniciais para o processo não estão corretas.

Esta ferramenta contém um conjunto de linhas que permitirão saber se o processo é ou não controlado. Por exemplo, o **limite central** (LC) especifica o valor mais provável (média das leituras efetuadas). Os **limites de controlo superior e inferior** (LCS e LCI), os chamados limites de ação, correspondem aos limites de confiança estabelecidos a 99% (extremos), enquanto os **limites de aviso superior e inferior** (LAS e LAI) são estabelecidos a 95%, pois alertam para a entrada numa zona de perigo.

De forma simplificada, a situação representa:

$$\text{Limite de Controlo Superior: } LCS = \bar{X} + 3s \quad (2.26)$$

$$\text{Limite de Aviso Superior: } LAS = \bar{X} + 2s \quad (2.27)$$

$$\text{Limite de Controlo: } LC = \bar{X} \quad (2.28)$$

$$\text{Limite de Aviso Inferior: } LAI = \bar{X} - 2s \quad (2.29)$$

$$\text{Limite de Controlo Inferior: } LCI = \bar{X} - 3s \quad (2.30)$$

em que \bar{X} corresponde à média das leituras efetuadas e s ao desvio-padrão da grandeza a ser controlada.

Confirmada a estabilidade da carta de controlo, procede-se à comparação dos limites da carta com os critérios de aceitação definidos no método e decide-se se a carta deve ser colocada em rotina. Caso exista concordância entre os limites estabelecidos e os critérios de aceitação, os critérios fixos definidos devem ser mantidos. Ao contrário, deve ser feita uma avaliação que justifique a realização de um ajuste nos critérios de aceitação estabelecidos, promovendo a aproximação aos limites da carta, nunca esquecendo as exigências legais ou normativas para o ensaio em causa, ou ponderando a construção de outro tipo de carta de controlo que se ajuste adequadamente à realidade do método.

Apesar de existirem vários tipos de cartas de controlo, as mais utilizadas são 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 permitem obter resultados pela análise de MRI, brancos, padrões de calibração, repetição de amostras, desvio entre duplicados, recuperação de adições, dados referentes a parâmetros instrumentais ou de calibração. [24] Tanto as cartas de indivíduos como as de médias podem representar, ao longo do tempo, um determinado parâmetro ou uma média em função do teor. Também 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.

A seleção das cartas a utilizar deve ser feita tendo em conta as características que se pretendem controlar e as ações de controlo de qualidade adotadas. [24]

2.3.2. Controlo da qualidade externo

O controlo da qualidade externo visa avaliar a exatidão dos resultados obtidos num determinado método de ensaio, através da participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) ou de materiais de referência certificados (MRC). Caso MRC e EIL não existam, 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 baseia-se no erro percentual relativo. [24, 34]

2.4. Estimativa da incerteza

Para demonstrar a fiabilidade de um método analítico e o cumprimento dos seus objetivos, a validação do mesmo passa sempre pela avaliação da incerteza global do método. Comumente, a incerteza é facilmente associada à validade dúbia de uma medição. Contudo, mediante a Química Analítica, a incerteza da medição corresponde a um parâmetro associado ao resultado de uma medição, caracterizando a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos à mensuranda (grandeza que se pretende medir). [35-37] Desta forma, a incerteza acaba por conferir confiança na validade dessa medição.

A estimativa da incerteza é determinada com base na norma ISO 11352:2012, na qual é especificado um conjunto de procedimentos que permite aos laboratórios estimar a incerteza dos resultados utilizando uma abordagem que considera os dados de validação e controlo de qualidade dos métodos analíticos.

A referida norma especifica a metodologia para a estimativa da incerteza da medida de métodos analíticos, realizados em laboratórios, tendo em conta os dados de validação e resultados de controlo de qualidade. A

quantificação depende das características de desempenho de um processo de medida e do seu controlo da qualidade interno e externo.

A incerteza do método é, assim, definida mediante a conjugação de duas componentes, a componente aleatória (precisão) e a componente sistemática (exatidão), que podem ser estimadas por várias abordagens. Na Anexo C consta um fluxo de decisão para a escolha adequada da abordagem para o cálculo de cada componente, dependendo do tipo de dados disponíveis. Após a sua seleção, as componentes podem ser estimadas e incluídas no cálculo da incerteza que é reportada como incerteza expandida do método.

2.4.1. Reprodutibilidade intralaboratorial

As estimativas das variações aleatórias (precisão) dos resultados das medições devem ser efetuadas sob as mesmas condições que são utilizadas quando a análise de rotina é realizada.

Para a estimativa da componente de incerteza da precisão (reprodutibilidade intralaboratorial), u_{Rw} , podem ser considerados, pelo menos, dois tipos de abordagens, como descrito na norma ISO 11352:2012:

- ✧ Padrões de controlo;
- ✧ Duplicados de amostras/amostras fortificadas.

2.4.1.1. Padrões de controlo

Como a componente da incerteza padrão a partir das cartas de controlo de amplitudes, $u_{r,range}$, normalmente apenas cobre a componente de repetibilidade, esta deve ser combinada com a incerteza padrão associada aos padrões de controlo, $u_{Rw,stand}$, para assim se obter uma estimativa real da reprodutibilidade intralaboratorial do laboratório, de acordo com a equação:

$$u_{Rw} = \sqrt{u_{Rw,stand}^2 + u_{r,range}^2} \quad (2.31)$$

em que $u_{Rw,stand}$ corresponde à componente de incerteza associada aos padrões de controlo e $u_{r,range}$ à componente de incerteza das cartas de controlo de amplitudes.

2.4.1.2. Duplicados de amostras/amostras fortificadas

Para além dos padrões de controlo, podem utilizar-se os duplicados de amostras ou de amostras fortificadas estimando a componente da incerteza através da média das amplitudes dos mesmos. Neste caso, deverá ser combinada uma incerteza associada às variações dos duplicados, \mathbf{u}_{R_w} , que se reflete na equação abaixo:

$$\mathbf{u}_{R_w} = \sqrt{\mathbf{u}_{r,range}^2 + \mathbf{u}_{R_w,bat}^2} \quad (2.32)$$

em que $\mathbf{u}_{r,range}$ é componente de incerteza das cartas de controlo das amplitudes de duplicados de amostras e $\mathbf{u}_{R_w,bat}$ é a componente de incerteza resultante da variabilidade entre duplicados.

2.4.2. Efeito sistemático do método e do laboratório

A veracidade do método corresponde à componente da incerteza dos efeitos sistemáticos (exatidão). A tendência sistemática é muito variável, dependendo da matriz e da concentração do analito. Esta componente pode ser estudada utilizando materiais de referência da matriz, ensaios interlaboratoriais, ensaios de recuperação, entre outras ferramentas de controlo de qualidade. [37]

Considerando a determinação da incerteza em ensaios de recuperação, a incerteza padrão associada ao efeito sistemático do método, \mathbf{u}_b , é determinada com base em:

$$\mathbf{u}_b = \sqrt{\mathbf{b}_{rms}^2 + \mathbf{u}_{add}^2} \quad (2.33)$$

em que \mathbf{b}_{rms} corresponde à raiz quadrada da média dos desvios dos ensaios de recuperação e \mathbf{u}_{add} à incerteza na concentração do analito adicionado. \mathbf{b}_{rms} é obtido a partir de:

$$\mathbf{b}_{rms} = \sqrt{\frac{\sum \mathbf{b}_i^2}{n_\eta}} \quad (2.34)$$

onde \mathbf{b}_i é o desvio do ensaio de recuperação completo e n_η é o número de ensaios de recuperação.

A incerteza na concentração do analito adicionado, \mathbf{u}_{add} , consiste em duas componentes: a incerteza do volume adicionado, \mathbf{u}_v , e a incerteza na concentração da solução adicionada, \mathbf{u}_{conc} :

$$\mathbf{u}_{add} = \sqrt{\mathbf{u}_v^2 + \mathbf{u}_{conc}^2} \quad (2.35)$$

Muitas vezes, a incerteza do volume adicionado, u_V , pode ser estimada a partir de informações fornecidas pelos fabricantes de material de laboratório volumétrico. Os erros sistemáticos e aleatórios (repetibilidade) devem ser considerados. Quando a informação disponível é insuficiente, é necessário utilizar uma distribuição retangular e ser assumido que a componente da incerteza padrão sistemática do volume, $u_{V,b}$, a ser adicionada é dada por:

$$u_{V,b} = \frac{\varepsilon_{V,max}}{\sqrt{3}} \quad (2.36)$$

sendo $\varepsilon_{V,max}$ o desvio máximo do volume do valor especificado pelo produtor.

A componente de incerteza do volume adicionado, u_V , é frequentemente dada como um desvio-padrão, sendo expressa por:

$$u_V = \sqrt{u_{V,b}^2 + u_{V,rep}^2} \quad (2.37)$$

em que $u_{V,b}$ é a componente da incerteza sistemática do volume adicionado e $u_{V,rep}$ é a componente de incerteza aleatória do volume adicionado (condições de repetibilidade).

2.4.3. Incerteza padrão combinada

A determinação da incerteza padrão combinada consiste na combinação entre a incerteza padrão de precisão e a incerteza padrão de exatidão caso não sejam consideradas outras fontes de incerteza. ^[37] Esta é expressa segundo:

$$u_c = \sqrt{u_{R_w}^2 + u_b^2} \quad (2.38)$$

em que u_{R_w} corresponde à incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial e u_b à incerteza associada à componente do efeito sistemático.

2.4.4. Incerteza expandida

A incerteza expandida, U , corresponde à determinação global da incerteza, sendo o produto entre um fator de expansão, k , igual a 2, a um nível de confiança de 95%, e a incerteza padrão combinada. ^[37]

$$U = k u_c = 2u_c \quad (2.39)$$

Análise de óleos, gorduras e hidrocarbonetos por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

A determinação de óleos, gorduras e hidrocarbonetos é efetuada recorrendo à espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier*, baseado no método 5520-C do “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” e tendo em atenção a escolha do solvente de extração a utilizar.

3.1. Óleos e gorduras

Os óleos e as gorduras (OG) encontram-se amplamente distribuídos na natureza. São essencialmente formados por compostos lipídicos, cujas características assentam na sua insolubilidade em água e na sua solubilidade em solventes não polares. Para além disso, constituindo uma classe de lípidos, estes repelem a água, tem a capacidade de armazenamento de energia e são utilizados como componentes estruturais.

No caso específico dos óleos e gorduras, eles resultam da união de três moléculas de ácidos gordos e uma molécula de álcool (geralmente, glicerol) – Figura 3.1.

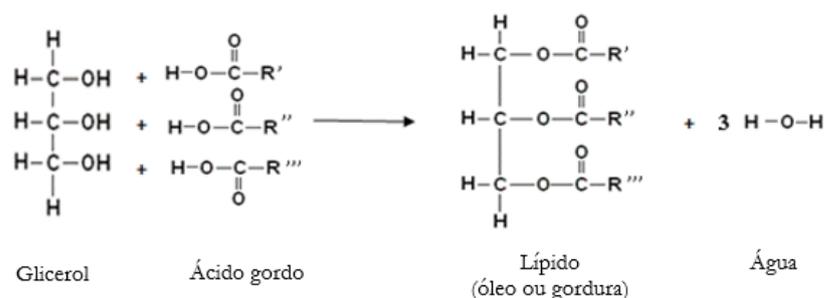


Figura 3.1 – Exemplo da reação que origina um lípido (óleo ou gordura). (adaptado de [38])

A diferença entre os óleos e as gorduras está no radical (R) que deriva do ácido gordo. Se pelo menos dois dos radicais do ácido gordo forem saturados (com ligações simples entre os carbonos), estamos perante gorduras, que se apresentam na fase sólida em condições ambientais. Caso esses mesmos radicais sejam insaturados (com ligações duplas entre os carbonos), temos a presença de um óleo, que se torna líquido à temperatura ambiente.

3.2. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos (HDE) são compostos químicos formados unicamente por átomos de carbono e hidrogénio, existindo apenas formação de ligações carbono-carbono e carbono-hidrogénio. Como são compostos apolares, dissolvem-se somente em solventes apolares ou fracamente polares, fator importante na separação de OG e HDE.

Existem três tipos de ligações carbono-carbono: ligações covalentes simples, duplas e triplas. Este tipo de ligações afetam as propriedades do hidrocarboneto de que fazem parte. Um hidrocarboneto saturado contém na sua cadeia carbonada apenas ligações covalentes simples. Já um hidrocarboneto insaturado possui ligações covalentes duplas ou triplas.

Os hidrocarbonetos podem dividir-se em dois grupos (Figura 3.2): os hidrocarbonetos aromáticos (possuem pelo menos um anel benzénico) e os hidrocarbonetos alifáticos (podem ser formados por cadeias carbonadas abertas – lineares e ramificadas – ou fechadas).^[39]

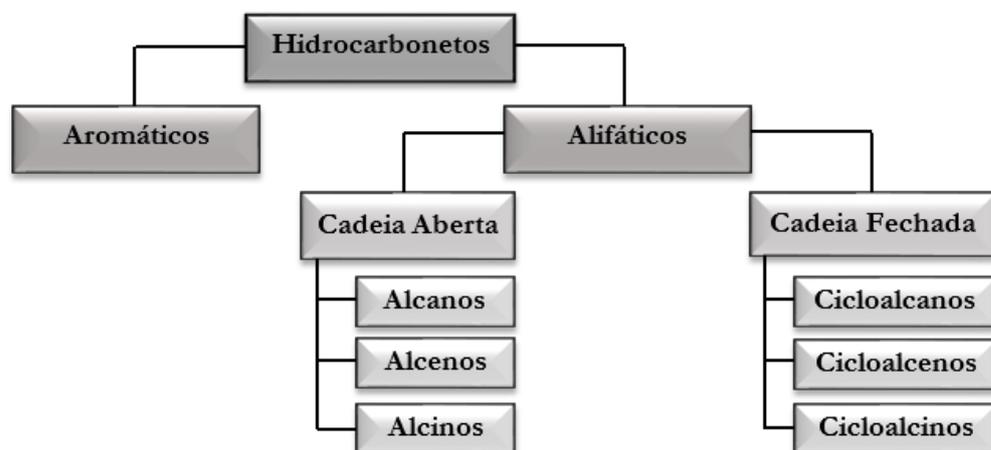


Figura 3.2 – Classes e sub-classes dos hidrocarbonetos.

3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier*

A espectroscopia compreende o estudo da interação eletromagnética com a matéria, pretendendo a determinação dos níveis de energia (estados eletrônicos) e transições de espécies atômicas e moleculares.^[40]

Devido à existência de ligações químicas nas moléculas, estas possuem energia rotacional e vibracional. As transições rotacionais são obtidas recorrendo à radiação eletromagnética na região do micro-ondas ou na região do infravermelho longínquo, nos quais as energias associadas são mais baixas. Geralmente, existe uma associação entre transições vibracionais e radiação eletromagnética na região de Infravermelho, com níveis de energia de 1-15 kcal/mol. ^[41, 42]

A energia designada por infravermelho corresponde à região do espectro eletromagnético situada entre 14290 e 200 cm^{-1} (Tabela 3.1). A região de interesse para análises químicas apresenta-se entre os números de onda 4000-400 cm^{-1} , sendo conhecida como infravermelho médio ou região fundamental. A região de alta (4000 cm^{-1} até à região visível) e baixa (600-200 cm^{-1}) frequência corresponde, respetivamente, ao infravermelho próximo e ao infravermelho longínquo. ^[41]

Tabela 3.1 - As várias regiões de infravermelho. (adaptado de ^[41])

Região Infravermelho	Número de onda / (cm^{-1})	Comprimento de onda / (μm)	Fenómenos
Próximo	14290 – 4000	0,7 – 2,5	Sobretons de absorção de C-H
Médio	4000 – 650	3,5 – 2,5	Vibrações e dobras
Longínquo	650 - 200	15 - 100	Espécies de baixa energia

Para se dar absorção de radiação infravermelha é necessário existir uma variação do momento dipolo elétrico da molécula, devido ao seu momento rotacional e vibracional. O momento dipolo elétrico depende da magnitude da diferença de carga e da distância entre dois centros de carga. Apenas nesta situação, o campo elétrico interage com a molécula, mediante variação da radiação incidente, originando os espectros. Isto é, quando existe transição entre dois níveis vibracionais. ^[41]

A espectroscopia infravermelho determina grupos funcionais de uma amostra, dando-se a absorção de cada grupo numa frequência característica. Por sua vez, essas frequências apresentam vibrações específicas, que podem ser de estiramento (deformação axial) ou de deformação angular, correspondendo a níveis de energia da molécula. ^[40] Desta forma se compreende a não rigidez de ligações covalentes em moléculas, visto que se assemelham a molas, por terem a capacidade de esticar ou dobrar. Existem então dois tipos de vibrações moleculares (Figura 3.3):

- ✧ *Stretching* (estiramento/deformação axial) – corresponde a uma vibração de movimento rítmico ao longo da ligação entre dois átomos, existindo aumento ou diminuição da distância interatômica, tal como uma mola.
- ✧ *Bending* (deformação angular) – corresponde a uma vibração que consiste na variação do ângulo entre duas ligações, que podem ocorrer no plano ou fora do plano da molécula.

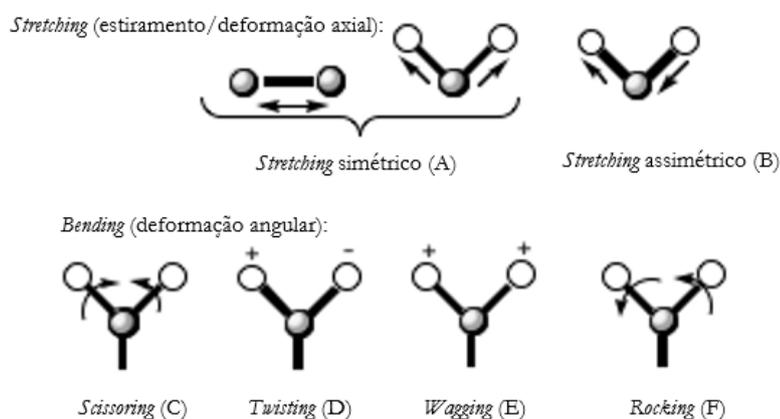


Figure 3.3 – Representação esquemática dos vários tipos de vibrações moleculares. (adaptado de ^[43])

Na Figura 3.3 é visível a representação esquemática dos diversos tipos de vibrações moleculares. Em (A) e (B) encontram-se representados o estiramento simétrico e assimétrico, onde as ligações se encolhem e se estendem de forma simétrica e coordenada ou de forma assimétrica e descoordenada, respetivamente. Relativamente à deformação angular, (C) exhibe deformação em tesoura (no plano), pois é similar ao movimento de uma tesoura. Em (D) e (E) é visível a torção das ligações (fora do plano), cuja movimentação das ligações se dá de uma forma descoordenada e coordenada, respetivamente. Os sinais + e – indicam os movimentos perpendiculares ao plano da página. ^[43] Por último, em (F) verifica-se o balanço das ligações (no plano) no mesmo sentido. ^[44]

A base da espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR) é o método interferométrico de *Michelson* (Figura 3.4), que consiste num *beamsplitter* (“semi-espelho”, conhecido como divisor de feixes) e em dois espelhos ortogonais (um fixo e um móvel). Neste sistema, a radiação provem de uma fonte monocromática e é dividida em dois feixes no *beamsplitter*, contendo idealmente cada feixe 50% do original. Após a passagem pelo divisor de feixes, um dos feixes (A) segue em direção ao espelho de posição fixa, no qual é refletido de volta para o divisor de feixes, sendo uma parte deste feixe refletido de volta para a fonte e a outra parte passa pela amostra e segue para o detetor. O outro feixe (B) parte do *beamsplitter* em direção ao espelho de posição móvel, no qual é refletido de volta, uma parte para a fonte e a outra parte passa pela amostra e segue para o detetor. Se a posição do espelho móvel for tal que o feixe A percorra a mesma distância que o feixe B antes de

chegar ao detetor, então os dois feixes encontram-se em fase, reforçando-se simultaneamente (interferência construtiva), sendo máxima a energia que chega ao detetor. Contudo, devido à posição do espelho móvel, se as distâncias forem diferentes, os feixes encontrar-se-ão fora de fase, havendo um cancelamento parcial e simultâneo dos feixes, sendo mínima a energia que chega ao detetor. [44-48]

Desta forma, existindo variação da distância percorrida pelos dois feixes, é possível obter interferências construtivas e destrutivas obtidas sequencialmente e, conseqüentemente, a variação da intensidade da radiação que chega ao detetor, dando origem a um interferograma, uma vez que é feito o varrimento da região do espectro a partir de uma fonte de luz monocromática. O interferograma contém toda a informação fornecida pelo espectrómetro, no entanto, o modo como a apresenta não é suficientemente útil. Contudo, através da transformada de *Fourier*, é possível converter essa mesma informação num espectro que relacione as intensidades com as respectivas frequências, sendo mais vantajoso para a análise. [44-48]

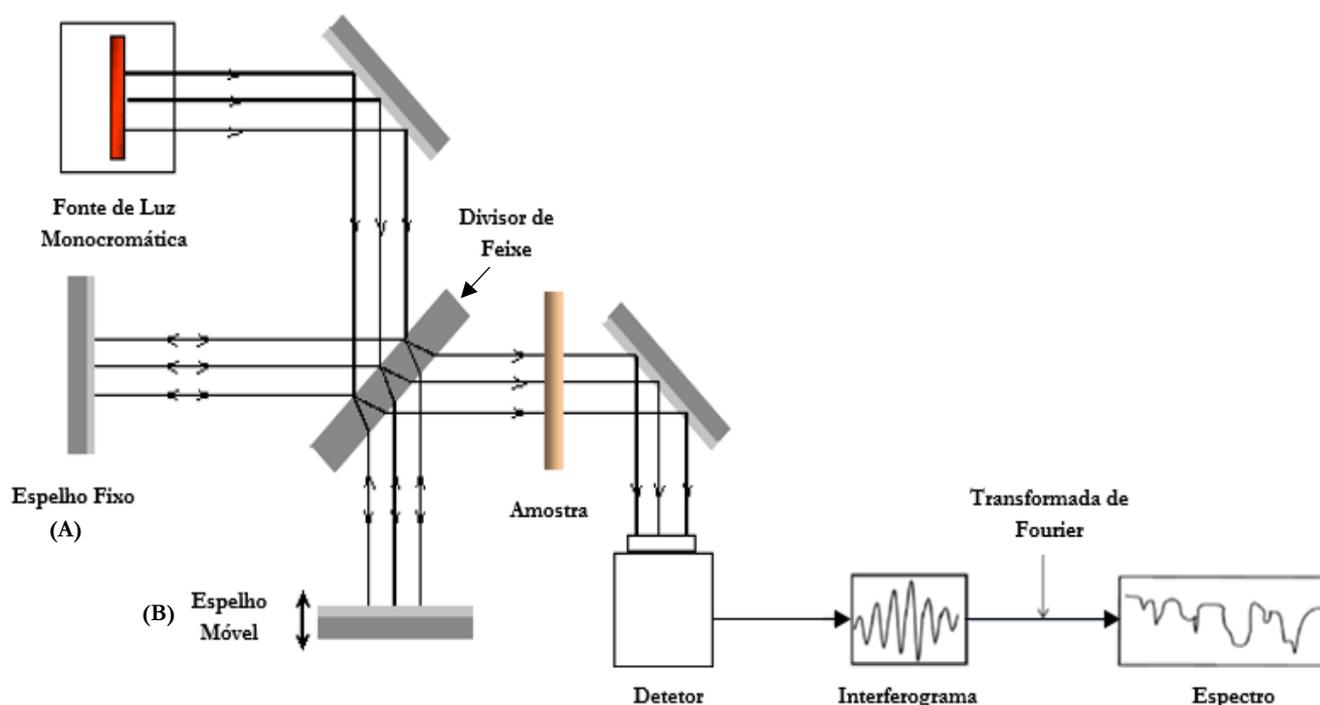


Figure 3.4 – Esquema referente ao funcionamento do FTIR, representando o interferômetro de *Michelson* e a conversão do interferograma num espectro de absorção. (adaptado de [41])

O interferograma mais simples corresponde ao de uma radiação monocromática, ou seja, ao espectro que representa uma única frequência. Já os espectros que resultam de múltiplas frequências, correspondentes a interferogramas complexos, são comumente analisados.

3.4. Escolha do solvente de extração

Durante um longo período, um CFC, o conhecido Freon-113, tornou-se no solvente de eleição na técnica de FTIR graças à sua estabilidade, às suas propriedades atóxicas e à ausência de ligações de carbono-hidrogénio no mesmo. Contudo, e embora a sua maior vantagem seja ser quimicamente estável, tal pode tornar-se no seu maior defeito, resultando na sua proibição, uma vez que atualmente é um potencial poluidor e um contributo significativo para a destruição da camada de ozono. Desta forma, a proibição do uso de Freon-113 conduziu à necessidade de encontrar um substituto com capacidade de extração e propriedades semelhantes, mas incapaz de provocar semelhantes danos ambientais.

A escolha do solvente de extração é assim uma etapa de extrema importância na determinação de OG e HDE. Esta escolha é determinada mediante diversos fatores, nomeadamente, custo, qualidade espectral, eficiência de extração, toxicidade e disponibilidade.

3.4.1. Tetracloroetileno

A escolha do solvente passa pela avaliação das suas propriedades físico-químicas, de modo a que a sua utilização neste método seja suficientemente viável. Para tal, o solvente extrator deve satisfazer dados requisitos:

- ✧ na sua composição não podem existir ligações carbono-hidrogénio (C-H);
- ✧ apresentar um elevado poder de extração de compostos orgânicos;
- ✧ existir imiscibilidade com a água;
- ✧ ter um grau de pureza apropriado para espectroscopia de infravermelho.

Também é de considerar todos os critérios de segurança que estão inerentes ao solvente de extração escolhido, bem como os aspetos financeiros, nomeadamente o seu custo. No mercado, existem alguns solventes possivelmente adequados para o uso neste método analítico, tais como:

- ✧ Tetracloroeto de carbono;
- ✧ S-316;
- ✧ Tetracloroetileno.

O tetracloroeto de carbono, embora reúna todos os critérios necessários, encontra-se atualmente no grupo IV das ODS e possui um potencial de empobrecimento da camada de ozono. Este facto faz com que este solvente não possa ser uma alternativa viável pois, tal como o Freon-113, a sua utilização é proibida para extrações, de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1005/2009, de 16 de Setembro.

O S-316, cuja fórmula química é $\text{CClF}_2\text{CClFCClFCClF}_2$ (dímero/trímero do cloro-trifluoretileno), é um solvente desenvolvido pela empresa *Horiba*. Apresenta todos os requisitos necessários, bem como um grande poder de extração e uma toxicidade muito reduzida. Em contrapartida, S-316 implica um avultado custo de aquisição.

O tetracloroetileno não possui ligações C-H, envolve um custo de aquisição inferior ao do Freon-113, tem um grande poder de extração, com capacidade de extrair desde os hidrocarbonetos mais leves aos mais pesados. Contudo, o tetracloroetileno é extremamente tóxico, desenvolvendo alguns efeitos a curto/médio prazo na saúde humana, estando ainda a ser efetuados testes no que diz respeito ao potencial cancerígeno deste solvente. Embora o tetracloroetileno seja um composto com elevada toxicidade, tal característica não lhe permite deixar de ser o solvente de eleição para a substituição do Freon-113, sendo então utilizado como solvente extrator na extração de óleos, gorduras e hidrocarbonetos.

Na Figura 3.5 encontra-se representado o espectro de absorção de IV de tetracloroetileno que permite observar a efetiva ausência de ligações C-H na região de interesse (zona verde: $3100 - 2800 \text{ cm}^{-1}$).

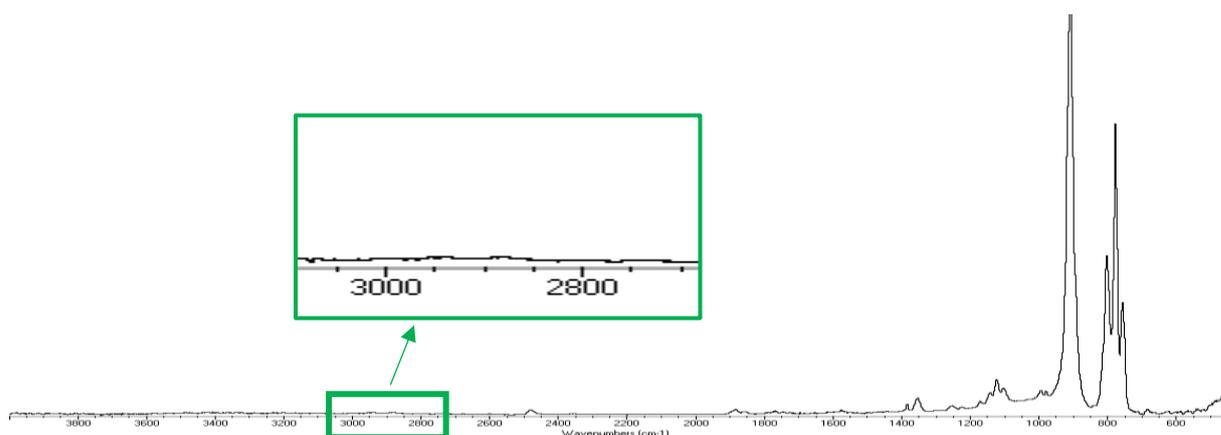


Figura 3.5 – Espectro de absorção de IV de tetracloroetileno.

— Zona entre $3100 - 2800 \text{ cm}^{-1}$

3.5. Princípio do método

Através da instrumentação de FTIR, o método de determinação de OG e HDE consiste na determinação da energia eletromagnética na região do infravermelho que é absorvida pelas ligações C-H presentes na amostra.

O princípio deste método resulta do elevado número de ligações C-H que os óleos, gorduras e hidrocarbonetos possuem. O processo de extração usado baseia-se no método de extração líquido-líquido, no qual o solvente de extração tem de ser imiscível com a amostra de modo a proporcionar a separação de fases. Este solvente deve encontrar-se isento de ligações C-H para que não haja interferência com a concentração real do analito presente na amostra.

O processo de determinação de OG inicia-se numa ampola de decantação, na qual é colocada um volume conhecido da amostra. Após o processo de transferência da amostra para a ampola de decantação, é colocada a primeira quantidade de tetracloroetileno e iniciado o processo de agitação vigoroso durante 2 minutos, para aumentar a área de contato das fases que são imiscíveis (amostra aquosa e tetracloroetileno). Posteriormente, é colocada a ampola num suporte de ampolas adequado para que repouse até se dar a separação de fases. Quando a separação de fases for visível, a parte inferior (contendo o solvente e os OG e HDE) é drenada através de um funil contendo sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para um balão de diluição de 25 mL. A função do sulfato de sódio anidro consiste na remoção da humidade (H_2O) que a fase do solvente drenado possa conter, sendo assim um agente dessecante. Este processo de extração líquido-líquido é repetido mais duas vezes. Finalizadas todas as extrações, o Na_2SO_4 é lavado com solvente extrator, visando a limpeza do analito em análise, sendo feita posteriormente a aferição do balão de diluição. Posto isto, a determinação dos óleos, gorduras e hidrocarbonetos presentes na amostra é realizada através da análise do extrato (analito + solvente de extração) num equipamento FTIR, com recurso a uma célula de quartzo, com 1 cm de percurso ótico.

Para efetuar a determinação de hidrocarbonetos presentes na amostra é necessário adicionar sílica gel ao balão de diluição e agitar para promover o contato entre a sílica gel e o extrato. A sílica gel tem a capacidade de remover compostos polares tais como os óleos e gorduras, deixando apenas os compostos apolares como os hidrocarbonetos. O extrato contendo a sílica é então filtrado através de fibra de vidro e analisado no equipamento FTIR. ^[49]

Caso a separação de fases não seja conseguida num período de tempo razoável, ou seja, se se der a formação de uma emulsão, sistema disperso em que as fases são líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis, a solução passa por aumentar a quantidade de solvente a adicionar, passando a extração a ser feita para um balão de diluição de 50 mL. Desta forma, há uma diminuição do fator entre o volume de amostra e o volume de solvente de extração adicionado (250:50), promovendo a facilidade de separação de fases.

Como referido anteriormente, a instrumentação de FTIR tem a capacidade de varrer a zona de infravermelho do espectro eletromagnético. É aqui que ocorre a absorção correspondente às ligações C-H. A Figura 3.6 demonstra que a mistura de 37,5% de hexadecano, 25,0% de benzeno e 37,5% de isooctano dá

origem a um espectro de absorção característico de um óleo de referência, apresentando também a gama de comprimentos de onda absorvidos referentes às ligações C-H (2927 cm^{-1}).

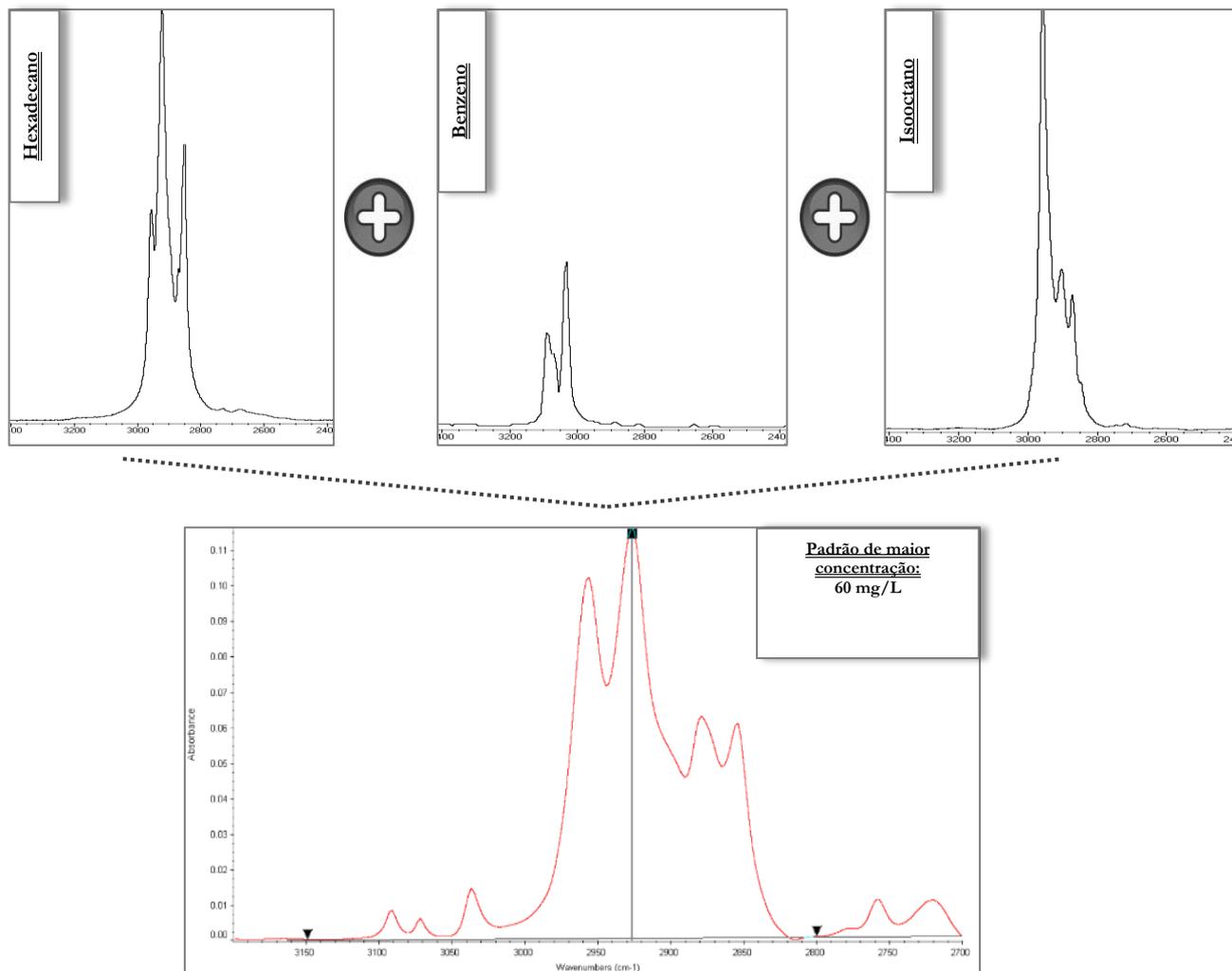


Figura 3.6 – Espectro FTIR realizado numa solução de óleos de referência (Padrão de maior concentração: 60 mg/L) representativa dos comprimentos de onda absorvido pelas ligações C-H. (adaptado de [50])

A Tabela 3.2 apresenta detalhadamente os comprimentos de onda absorvidos pelas ligações C-H.

Tabela 3.2 – Bandas de comprimento de onda associadas ao infravermelho, representativas da absorção por parte das ligações. (adaptado de [51])

Comprimento de onda / (cm^{-1})	Tipos de vibração	Intensidade	Grupo Funcional
3080-3010	=C-H estiramento vibracional	Média	=C-H (aromático)
2975-2950	C-H estiramento vibracional simétrico	Média-Grande	-CH ₃
2940-2915	C-H estiramento vibracional assimétrico	Média-Grande	-CH ₂ -
2870-2840	C-H estiramento vibracional simétrico	Média	-CH ₂ -
2885-2865	C-H estiramento vibracional simétrico	Média	-CH ₃

Desta forma, a determinação do analito é realizada através de *scans*, no intervalo de comprimento de onda que compreende os 3100 cm^{-1} e os 2800 cm^{-1} , e a determinação do analito realizada através do registo da absorvância (em altura) no comprimento de onda de 2927 cm^{-1} . Este comprimento de onda é utilizado, pois as ligações -CH₂- estão presentes em maior quantidade nos óleos, gorduras e hidrocarbonetos.

3.6. Material e método

3.6.1. Materiais, equipamento e reagentes

Para a realização do método em validação foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- ✧ Espectrómetro de Infravermelho (Nicolet iS10, *Thermo Scientific*);
- ✧ Computador com *software Omnic*;
- ✧ Células de 1cm × 1cm;
- ✧ Balança analítica - capacidade de efetuar pesagens até 0,01 g (*PJ Precisa junior 2000C*);
- ✧ Funis de vidro;
- ✧ Ampolas de decantação – 250 mL;
- ✧ Balões volumétricos – 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL;
- ✧ Pipetas graduadas – 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL;
- ✧ Pipetas volumétricas – 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL;
- ✧ Provetas – 250 mL;
- ✧ Papel de filtro (90 mm, *Filtres Fioroni*);
- ✧ Fibra de vidro – lã de vidro, *Supelco*;

- ✧ Microseringas – 50, 100, 250 µL.

Relativamente aos reagentes, foram utilizados:

- ✧ Ácido clorídrico, >95%, *Fisher Chemical* ;
- ✧ Tetracloroetileno, 99,8%, Panreac;
- ✧ Sulfato de sódio anidro – 99,5%, Panreac, purificado por aquecimento na mufla a 200-250 °C durante 24 horas;
- ✧ Sílica gel, *Fisher Scientific* – purificada por aquecimento na mufla a 230 °C durante 24 horas;
- ✧ Óleos de referência – mistura, em volume, de 37,5% de isooctano, 37,5% hexadecano e 25% benzeno.

3.6.2. Método

A determinação da concentração do analito presente no extrato, através do equipamento FTIR, é feita inicialmente com a realização da leitura do solvente de extração (branco/“zero” do analito), com o objetivo de registar o espectro de absorção correspondente ao mesmo, uma vez que o solvente de extração é isento de ligações de C-H. Toda a quantidade de energia eletromagnética absorvida acima desse valor representa a presença de óleos, gorduras e hidrocarbonetos. A análise quantitativa inicia-se com a elaboração da calibração com uma solução de hexadecano, isooctano e benzeno (compostos de referência descritos no método 5520-C) que, mais tarde, é comparada com a absorvância obtida na análise do extrato. A calibração é efetuada com base no método de diluições, numa gama de trabalho experimental de 6mg/L – 60 mg/L.

Realizado o processo de extração e preparação do equipamento, a concentração presente na amostra pode então ser determinada através da equação:

$$C_{amostra} = \frac{C_{lida} \cdot D_{ext} \cdot V_{ext}}{V_{amostra}} D_{amostra} \quad (3.1)$$

onde, $C_{amostra}$ corresponde à concentração presente na amostra, C_{lida} à concentração determinada através da absorvância obtida em FTIR por interpolação das curvas de calibração realizadas, V_{ext} ao volume total de extrato, $V_{amostra}$ ao volume final da amostra, D_{ext} ao fator de diluição utilizado, enquadrando a absorvância do extrato dentro da gama de trabalho, e $D_{amostra}$ ao fator de diluição utilizado, caso seja necessário diluir a amostra antes desta ser extraída.

3.6.3. Interferências/Limitações do método

Os solventes orgânicos têm a capacidade de dissolver óleos e gorduras, mas também outras substâncias orgânicas que não estas. Para além dos OG e HDE, existem inúmeras substâncias que possuem ligações C-H que acabam por ser também quantificadas, visto que não é conhecido nenhum solvente capaz de extrair seletivamente somente óleos, gorduras e hidrocarbonetos. Esta quantificação traduz-se numa interferência positiva, pois existem compostos na amostra que, embora não sejam óleos e gorduras, são quantificados. Contudo, existem interferências negativas, nomeadamente no caso de resíduos mais pesados de petróleo que podem conter quantidades significativas de materiais que dificultam a sua extração, provocando a retenção destes compostos na amostra. [49]

Análise de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno por micro-extração em fase sólida em cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa

A análise de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno é efetuada com base em micro-extração em fase sólida por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa, tendo em atenção o cumprimento do DL n.º 306/2007.

4.1. Trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno

Durante a cloração da água existe formação de trihalometanos (THM) pela interação de ácidos orgânicos que, geralmente, se encontram presentes em águas superficiais. [52]

Em águas de consumo (Figura 4.1), os THM mais encontrados são clorofórmio (ou também conhecido por triclorometano), bromodiclorometano (BDCM), dibromoclorometano (DBCM) e bromofórmio (ou tribromometano). Para além da análise dos THM, no âmbito do estágio também se procedeu à análise de tricloroetileno (TriCE) e tetracloroetileno (TetraCE).

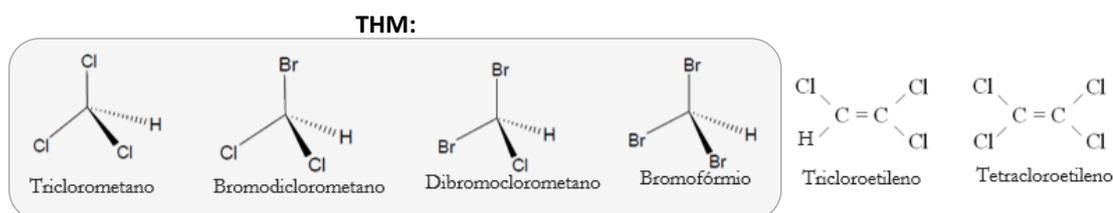


Figura 4.1 – Representação da estrutura molecular dos principais THM, tricloroetileno e tetracloroetileno.

Os THM são compostos voláteis que apresentam relativamente baixa solubilidade em água, que são considerados carcinogênicos e reconhecidos como potencialmente perigosos para a saúde humana, daí o monitoramento da sua concentração ser muito importante. São compostos por apenas um carbono, cuja fórmula geral é CHX_3 , onde X representa um halogênio (flúor, bromo, cloro ou iodo). O clorofórmio é um solvente comumente utilizado em química orgânica, considerado como um composto carcinogênico, pois existe uma ligação entre a exposição a THM específicos com tumores. Segundo estudos epidemiológicos, existe efetivamente uma ligação entre a exposição a água clorada, seja por ingestão, por adsorção endérmica ou por inalação, e o desenvolvimento de cancro na bexiga, aborto espontâneo e outras consequências reprodutivas adversas. [53]

O tricloroetileno e o tetracloroetileno são hidrocarbonetos clorados sintéticos conhecidos pelas suas excelentes propriedades de solvente. São muito utilizados em limpeza a seco e desengorduramento de materiais, bem como em solventes para ceras, resinas, gorduras, borrachas, óleos e vernizes, pintura em setores público e privado.

Numa água de consumo humano, e segundo o DL n.º 306/2007, o valor paramétrico para a soma das concentrações dos THM é 100 µg/L e para a soma das concentrações de tri- e tetracloroetileno é 10 µg/L.[6]

4.2. Cromatografia

O conceito de cromatografia foi pela primeira vez utilizado por *Tswett*, nos inícios do século XX, com o objetivo de separar substâncias coradas, que apareceram como bandas coloridas na coluna, dando curiosamente origem ao nome escolhido para o método (do grego *chroma*, que significa “cor”, e *graphein*, que significa “escrever”), embora o processo não dependa da cor.

Cromatografia é, então, um termo que designa um conjunto de métodos de separação, nos quais os componentes de uma mistura são distribuídos entre duas fases: uma estacionária, FE, (sólida ou líquida, aderente a um meio-suporte sólido poroso) com grande área superficial e permanentemente imóvel ao longo de todo o processo, outra móvel, FM, (fluido) que contata com a primeira. A separação é o resultado das diferenças de velocidades dos componentes arrastados pelo solvente móvel, mediante as diferentes interações com a fase estacionária. [54]

As fases são escolhidas com o intuito de que, em cada fase, os componentes possuam diferentes solubilidades. Ou seja, um componente solúvel na fase estacionária leva mais tempo a percorrê-la do que um componente insolúvel. As substâncias que têm maior afinidade com a fase estacionária são retidas durante mais

tempo, deslocam-se mais lentamente, e, conseqüentemente, separadas daquelas que têm menor interação. Contrariamente, quanto menor a afinidade para a fase móvel mais rapidamente as substâncias se deslocam. É devido a esta diferença de velocidades que os compostos químicos podem ser separados uns dos outros e identificados pela velocidade a que se movem, em condições específicas. É também por isso que o grande valor dos métodos cromatográficos reside nos objetivos analíticos de separação, identificação e quantificação, que podem ser frequentemente conseguidos simultaneamente.

O processo de eluição consiste na passagem de líquidos ou gases através de uma coluna cromatográfica. O fluido que entra na coluna e transporta os componentes de uma mistura através da fase estacionária é designado por eluente e o que emerge a partir da extremidade da coluna, ou seja, a fase móvel que deixa a coluna, é chamado de eluato. [55]

É, assim, importante o conceito de tempo de retenção (t_R), que se traduz pelo tempo decorrido desde a injeção de um componente na coluna até à sua deteção à saída do sistema. Em termos gráficos, o tempo de retenção corresponde ao tempo medido desde o instante de injeção da amostra até ao máximo do pico do componente, refletindo o tempo de permanência do composto na coluna (Figura 4.2). Como o tempo de retenção depende 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, as condições cromatográficas adotadas devem ser constantes e bem definidas. [56-61]

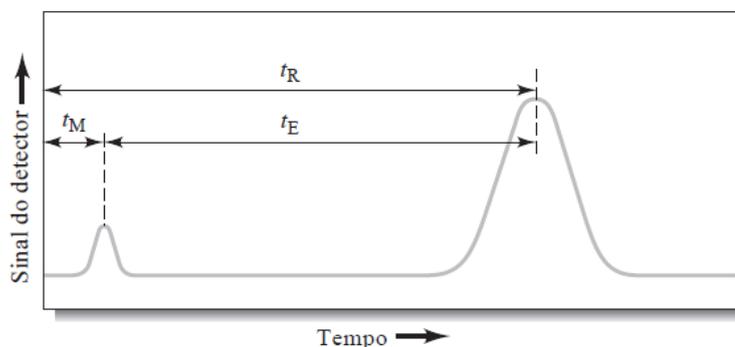


Figure 4.2 – Cromatograma típico para uma mistura de dois componentes. (adaptado de [55])

Segundo a Figura 4.2, t_R corresponde ao chamado tempo de retenção, t_E ao tempo de permanência do analito na fase estacionária e t_M ao tempo morto ou tempo de retenção da fase móvel (tempo necessário para que um soluto não retido passe através da coluna cromatográfica; todos os componentes permanecem por esse intervalo de tempo na fase móvel). Assim, o tempo de retenção é dado por: [55]

$$t_R = t_E + t_M \quad (4.1)$$

Mediante a análise cromatográfica, os dados obtidos são adquiridos por um computador, dando origem a um cromatograma – representação gráfica que relaciona a resposta do detetor em função do tempo de eluição. Se a separação for bem conseguida, cada pico irá corresponder a um componente da mistura separada, a área dos mesmos possibilita uma medida quantitativa do teor de analito em solução e o t_R apresenta uma segurança na identificação do analito. Trata-se de uma propriedade física da substância a analisar e depende das condições de separação: temperatura, taxa de fluxo e composição química da fase estacionária. A análise da solubilidade da substância na fase estacionária baseia-se na energia das interações intermoleculares entre o analito e a fase estacionária, sendo o fator mais importante na determinação do tempo de retenção. A quantidade de analito presente na amostra é determinada com base na área do pico obtida e na quantidade de amostra injetada, de acordo com a calibração analítica efetuada, que utiliza vários padrões para cada componente.

Em termos de deteção, o detetor consiste na medição contínua de propriedades físico-químicas da amostra, ou da solução que a contém, enviando um sinal para registo, que é geralmente e diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. O detetor ideal é aquele que: ^[54, 62]

- ✧ possui alta sensibilidade para detetar pequenas quantidades de amostra;
- ✧ é estável e insensível a variações de temperatura e de fluxo, no caso de eluições com gradiente;
- ✧ o sinal deve manter uma reação linear com a concentração da amostra;
- ✧ deve efetuar uma leitura contínua.

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

4.2.1. Cromatografia Gasosa

A análise química acabou por se revolucionar com a introdução de mais uma técnica: cromatografia gasosa (GC). Este método cromatográfico envolve uma fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida, e uma fase móvel, que é um gás transportador da amostra e que passa sobre a fase estacionária. Este gás é designado por gás de arraste e estabelece o transporte do analito na fase de vapor ao longo da coluna. Trata-se de um gás que deve ser inerte relativamente à amostra e à fase estacionária, atóxico, de custo reduzido, de elevada pureza e com grande eficiência de transporte, com o mínimo alargamento dos picos (apesar de normalmente ser usado Hélio, também pode ser utilizado hidrogénio ou nitrogénio).

A cromatografia gasosa exige que a amostra seja suficientemente volátil, para que possa passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente, para que não ocorra decomposição em condições de separação. A sua volatilidade pode ser crescente derivando os compostos ou aumentando a temperatura de trabalho, cujo limite é aproximadamente 400 °C.

Existem dois tipos de colunas que são utilizados em cromatografia gasosa: coluna de enchimento e coluna capilar. Na técnica abordada, verifica-se a utilização de uma coluna capilar ou tubular aberta, sendo utilizado o hélio como gás de arraste. [56-61]

O tipo de coluna, as propriedades da amostra e a sensibilidade analítica necessária relacionam-se e determinam o tipo de entrada e a técnica de injeção. Geralmente, as amostras são injetadas diretamente na extremidade da coluna. Se se tratarem de colunas capilares, geralmente, as amostras são injetadas numa câmara separada da coluna, vaporizadas e transferidas para a coluna na fase de vapor.

Nesta técnica cromatográfica, existem dois tipos de injeção: injeção *split* e injeção *splitless*. O conceito da injeção *split* baseia-se na ideia de que a amostra injetada é rapidamente vaporizada, misturada homogeneamente com o gás de transporte e separada, de tal forma que uma fração conhecida da mistura é transferida rapidamente para a coluna e a restante segue para o lixo. É um processo muito rápido, que dá origem a picos cromatográficos muito definidos. A amostra injetada é vaporizada no interior de um *liner*, utilizado com o objetivo de proporcionar um espaço inerte. Já o termo de injeção *splitless* consiste no fecho da separação de ventilação antes e durante a injeção, permanecendo fechada durante algum tempo após a injeção. Tal permite que quase toda a amostra injetada vaporize e entre na coluna. A abertura da separação de ventilação remove qualquer amostra restante à entrada.

Em GC, a variável mais importante a controlar é a temperatura, daí a coluna encontrar-se dentro de um forno de temperatura programada (termostatizado). Ambos (forno e coluna) devem ser de massa térmica baixa, para que seja proporcionado um rápido aquecimento e arrefecimento. Ao longo da análise, o forno pode funcionar em dois modos: isotérmico e de temperatura programada, ou seja, com um aumento linear da temperatura.

A amostra sujeita a análise pode ser um líquido ou um gás. No caso de um líquido, a injeção é feita de alguns microlitros de amostra na câmara de injeção, que se encontra a uma temperatura suficientemente alta, para passar a amostra para a fase gasosa. Se a amostra for um gás, pode ser feita a introdução de um volume maior de amostra na câmara de injeção. O transporte da amostra vaporizada é feito através de uma corrente de gás, que passa pela coluna capilar, também conhecida por coluna cromatográfica, na qual se encontra a fase

estacionária, através da qual os componentes da amostra se deslocam a velocidades influenciadas pelo grau de interação de cada componente com a fase estacionária.

A escolha da coluna cromatográfica deve ser baseada na eficiência da coluna, tendo em atenção a complexidade da amostra que se pretende analisar e a afinidade entre a fase estacionária e as substâncias a separar.

Após a amostra ter sido separada no GC, é necessário ter associado um instrumento com a capacidade de quantificar os compostos, conhecido por detetor. Este instrumento deve ser altamente sensível (entre 10^{-8} e 10^{-15} g) e ter um tempo de resposta rápido. Existem diversos tipos de detetores que podem ser acoplados ao sistema GC, tais como, por exemplo: detetor de ionização por chama (FID), detetor de captura eletrónica (ECD), detetor de espectrometria de massa (MS), entre outros. No âmbito do estágio, o detetor utilizado é o MS.

A técnica de GC é de facto poderosa, uma vez que envolve uma rápida análise, tipicamente minutos, é eficiente, proporcionando alta resolução, é sensível, não é destrutiva, possibilitando o acoplamento a outra técnica, apenas requer pequenas quantidades de amostra (μL), é confiável, relativamente simples e de custo moderado. Em contra partida, é uma técnica cuja aplicação se limita a amostras voláteis. [63]

4.2.2. Cromatografia gasosa associada ao detetor MS

Em Química Analítica, a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa é conhecida como GC-MS e demonstra ser um processo com grande potencial, permitindo a análise qualitativa e quantitativa de uma amostra num único instrumento. É uma técnica que, para além de permitir a separação dos componentes de uma mistura complexa, ainda recolhe o espectro de massa de cada componente, tendo a capacidade de 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 relaciona-se com as propriedades químicas específicas das moléculas presentes na amostra (volatilidade, polaridade, presença de grupos funcionais específicos), enquanto o peso molecular é indicador da composição atómica.[56-61] Num sistema de GC-MS, é necessário um sistema complexo de vácuo para manter a pressão baixa. Os compostos químicos provenientes do cromatógrafo gasoso são ionizados pela fonte de iões ou interface e entram no espectrómetro de massa.

A técnica de GC-MS tem a possibilidade de empregar dois métodos de ionização: ionização por impacto eletrónico (E_i) e ionização química (C_i). Na ionização por impacto eletrónico o analito de interesse, em fase

gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia. As moléculas do analito absorvem esta energia, dando-se a remoção de um elétron por parte das moléculas que não recebem energia suficiente para fragmentar, contribuindo para a formação de 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 equipamento 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 elétrons, à semelhança da ionização por impacto eletrónico. Uma vez que o gás reagente se encontra em excesso em relação ao analito, acaba assim por ser ionizado quase exclusivamente, passando a ocorrer reações entre os iões em fase gasosa e as moléculas neutras de analito. Trata-se de um processo de energia relativamente baixa, no qual a fragmentação praticamente não é observada.

Posteriormente (Figura 4.3), os iões são encaminhados para o analisador, que corresponde à zona do espectrómetro onde são definidas as características da determinação, ou seja, onde é efetuada a seleção e separação dos iões de acordo com os valores de massa/carga (m/z). Os iões separados atingem, mais tarde, um multiplicador de elétrons que tem como função aumentar o sinal dos iões sendo depois contabilizados num detetor de iões e, após contabilização, é produzido um gráfico que representa a intensidade do sinal gerado pelo ião em função dos valores de m/z . Em GC-MS, os analisadores de massa mais utilizados são: analisador de massa de setor magnético, quadrúpolos, aprisionamento de iões (*Ion Trap*) e analisador do tempo de voo (TOF). No âmbito do estágio foi utilizado um analisador de massas do tipo *Ion trap*.

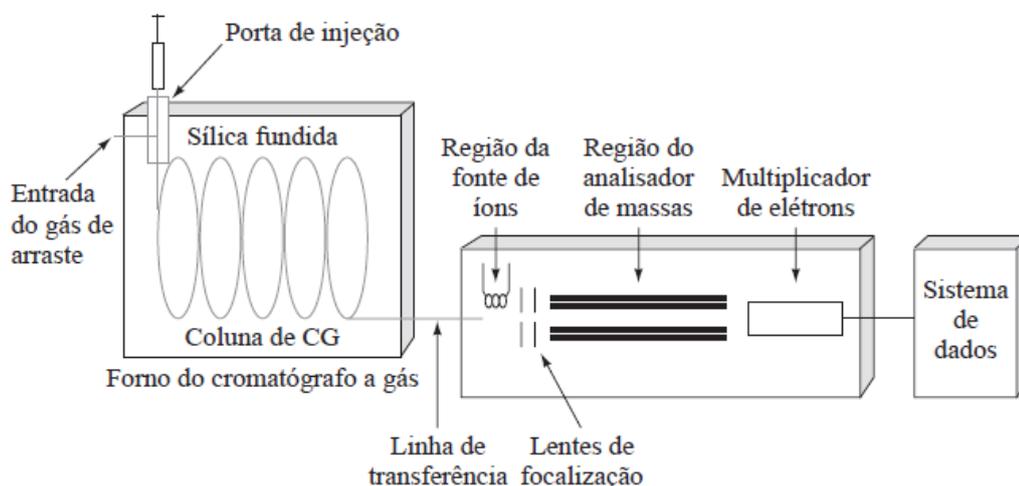


Figura 4.3 – Esquema de um instrumento GC-MS típico capilar. (adaptado ^[55])

Os valores (m/z) de cada ião de quantificação de cada composto são obtidos através da fragmentação dos mesmos. Para uma melhor compreensão, toma-se a molécula de CO_2 como exemplo. Na Figura 4.4, encontra-se representado o espectro de massas da molécula de CO_2 , em que muitos iões de fragmentos se encontram presentes. Quando se dá a quebra de uma ligação C-O no ião molecular ($m/z=44$), observa-se a formação de CO^+ ($m/z=28$) e O^+ ($m/z=16$). A perda de dois átomos de oxigénio leva a C^+ ($m/z=12$).^[55] O mesmo tipo de estudo é feito para os compostos de análise (THM, tri- e tetracloroetileno), tendo em conta os picos de maior intensidade, pois corresponderão aos iões dos fragmentos (Anexo D).

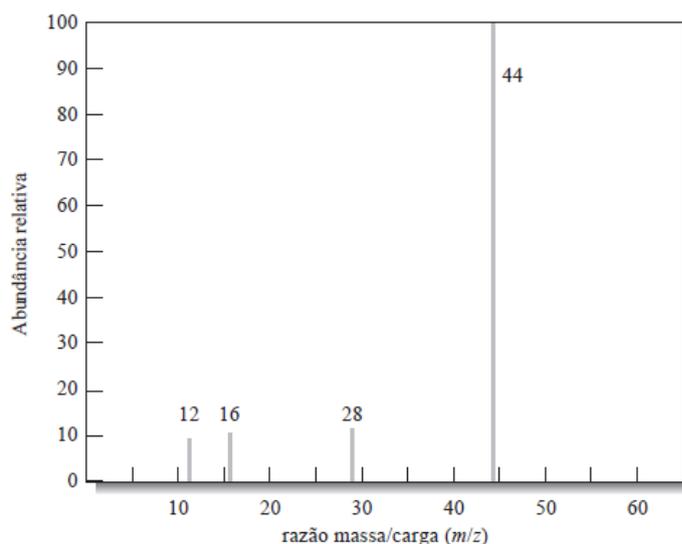


Figura 4.4 – Espectro de massas de CO_2 , em que o ião molecular aparece na razão $m/z=44$ ($\text{C}=12$, $\text{O}=16$) e os iões de fragmentos aparecem a valores de $m/z=28$, 16 e 12, que correspondem a CO^+ , O^+ e C^+ , respetivamente.

4.3. Micro-extração em fase sólida, SPME

Na técnica de GC-MS utilizada na análise de THM, tri- e tetracloroetileno é necessário um processo de extração para retirar os analitos da amostra a analisar. Neste caso, foi utilizada a micro-extração em fase sólida (SPME) que consiste numa microtécnica de extração de amostras, tanto pelas dimensões do suporte de extração empregue, como pelos volumes de matriz e de solvente necessários. É utilizada uma fibra ótica de sílica fundida, revestida com um filme fino de um polímero, como o polidimetilsiloxano (PDMS), ou com um adsorvente adequado. A mesma encontra-se acondicionada dentro de uma agulha num amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta apenas no momento da extração.^[59, 60]

O método de extração por SPME (Figura 4.5) pode ser efetuada por imersão da fibra diretamente na matriz ou através da exposição no espaço confinante, designado por *headspace*, onde a fibra entra em contato apenas com os vapores do analito que são libertados da matriz por aquecimento. Realizada a extração, a fibra

é retirada da amostra e inserida num injetor do cromatógrafo gasoso, onde os analitos são termicamente desadsorvidos, sob fluxo do gás de arraste, e transportados para a coluna cromatográfica. Segundo esta técnica, extraem-se pequenas quantidades de analito, o que facilita a sua desadsorção e subsequente separação cromatográfica.

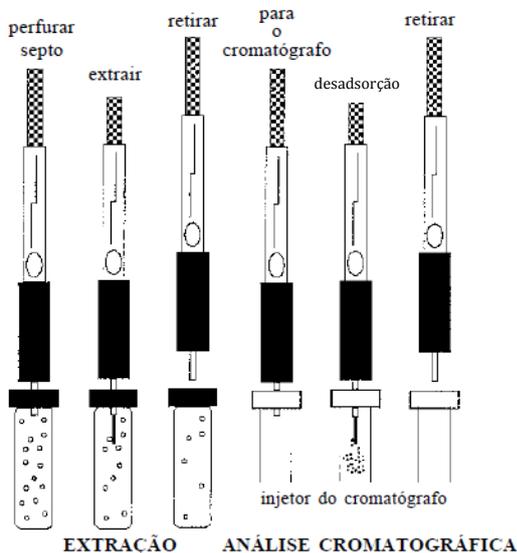


Figura 4.5 – Uso do amostrador de SPME para o processo de extração e o de desadsorção do material extraído para análise por GC. (adaptado [52])

4.4. Princípio do método

Na análise de THM, tri- tetracloroetileno, é utilizado um espectrómetro de massa com ionização por impacto electrónico e analisador *ion trap*. 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 *ion trap*, 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. Com o aumento da voltagem da radiofrequência, há um aumento da amplitude do movimento oscilatório induzido dos iões até ao momento em que saem da câmara. Em consequência deste aumento, existe uma destabilização dos 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. Após serem ejetados da câmara, vão ser detetados por um multiplicador electrónico. 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, isto é, enquanto os iões são pulsados para a armadilha para a análise, a maior parte

das moléculas neutras são retiradas através do vácuo. Desta forma, 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 espectros comparáveis com as livrarias de MS reconhecidas.

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

Resumidamente, 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 da TIC, o registo da abundância dos iões de uma massa específica *versus* tempo, o qual se designa por perfil de corrente iónica extraída (PCIE). Segundo a análise da TIC, obtém-se informação sobre o tempo de retenção e a área de cada pico. A identificação dos diversos componentes da amostra é efetuada com base nos tempos de retenção e na análise dos espectros de massa correspondentes a cada pico, sendo processado o sinal obtido através do *software* do equipamento.

4.5. Material e método

4.5.1. Materiais, equipamento e reagentes

Para a realização do método em validação foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos:

- ✧ Frascos para recolha das amostras – frascos de vidro âmbar de 50 mL, com tampa de rosca e septo de Teflon;
- ✧ Frascos do automostrador – frascos de vidro (*vials*) de 20 mL com tampa de alumínio e septo de silicone com face de Teflon;
- ✧ Fibras de SPME de PDMS de 100 µm;
- ✧ Microseringas de vidro para GC com certificado de calibração – 50, 100, 250 µL;
- ✧ Pipetas de *Pasteur*;
- ✧ Pipetas graduadas – 0,5 mL;
- ✧ Pipetas volumétricas – 0,5 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL;
- ✧ Balões volumétricos – 20 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL e 200 mL;

- ✧ Balança analítica – capacidade de efetuar pesagens rigorosas até 0,0001 g;
- ✧ Computador com *software Xcalibur*;
- ✧ Cromatógrafo de gás associado a espectrómetro de massa com possibilidade de utilizar colunas capilares e de programar a temperatura do forno;
- ✧ Automostrador – com seringa adequada a SPME e um tabuleiro com 54 posições para frascos de 20 mL;
- ✧ Coluna cromatográfica – coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de fraca polaridade de 0.25 mm x 30 m e 0.25 µm de espessura de filme.

Todo o material de vidro volumétrico destinado a medições rigorosas de volume é certificado. O cromatógrafo de gás deve ter associado um sistema de injeção “split/splitless”. O espectrómetro de massa deve ter um analisador de massas *ion trap* quadrupolar com uma gama de massas de 10 a 900 u.m.a e modo de colisão por dissociação induzida (CID). O *software* utilizado (*Xcalibur*) controla o funcionamento do GC-MS e do automostrador, e efetua a medição das áreas dos picos e os respectivos tempos de retenção.

Relativamente aos reagentes, foram utilizados:

- ✧ Água ultrapura (condutibilidade elétrica $\leq 1 \mu\text{S}/\text{cm}$);
- ✧ Tiosulfato de sódio pentahidratado – 99,5%, Riedel-de Haën;
- ✧ Sulfato de sódio anidro – 99,5%, Panreac, purificado por aquecimento na mufla a 400°C durante 4 horas;
- ✧ Metanol – LiChrosolv, 99,9%, Merck;
- ✧ Fluorobenzeno (Padrão interno) – 99,7%, Fluka;
- ✧ Padrão de referência certificado – EPA 551A Halogenated Volatiles Mix, Supelco;
- ✧ Padrões analíticos dos seguintes compostos:
 - Clorofórmio – Oekanal, RIEDEL-de Haën;
 - Bromodiclorometano – Oekanal, Riedel-de Haën;
 - Dibromoclorometano – Oekanal, Riedel-de Haën;
 - Bromofórmio – Oekanal, Riedel-de Haën;
 - Tricloroetileno – Fluka;
 - Tetracloroetileno – Fluka.

A água ultrapura é água desionizada, purificada num sistema Milli-Q plus, para que não apresente interferentes que condicionem a determinação dos analitos em análise.

4.5.2. Método

A determinação de THM, triCE e tetraCE em águas de consumo, realizada através da instrumentação SPME-GC-MS, inicia-com a colocação de uma porção da amostra/padrão a analisar num *vial* de 20 mL, juntamente com um padrão interno, sendo posteriormente fechado com uma cápsula de alumínio e um septo de silicone com face de teflon. A introdução do padrão interno (PI) permite controlar a extração e injeção dos analitos no GC. Para além de ser mais um ponto de controlo do ensaio, o PI permite também a amortização de pequenas oscilações nestas duas fases. O PI utilizado neste ensaio foi o fluorbenzeno, tendo sido adicionado com uma concentração fixa conhecida, tanto aos padrões como às amostras a analisar.

Após preparação dos *vials* contendo a amostra/padrão, estes são então colocados a incubar durante um determinado intervalo de tempo e a uma determinada temperatura. Este processo é designado de “período de incubação”. Uma vez que a amostra não ocupa o espaço total do *vial*, criando-se um espaço vazio situado acima do nível da água (*headspace*). O aumento de temperatura estabelece, na parte superior do *vial* (*headspace*), o equilíbrio entre a fase de vapor e a amostra. Posteriormente, é realizada a extração da fase de vapor através do contato entre o *headspace* e a fibra de micro-extração em fase sólida (SPME). Após o período de extração, a fibra contendo os analitos adsorvidos é introduzida no injetor do cromatógrafo onde são desadsorvidos termicamente, sendo libertados no *liner*. Os compostos são então arrastados pelo hélio para a coluna capilar, onde são separados pelos respetivos tempos de retenção, sendo detetados quando chegam ao detetor de massas.

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*). Algebricamente, a equação da reta é dada por:

$$\frac{\text{Área}}{\text{Área PI}} = b + m \times c \quad (4.2)$$

onde *PI* é o padrão interno, *b* é a ordenada na origem, *m* é o declive da reta e *c* é a concentração do analito.

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

$$c = \frac{(\text{Área}/\text{Área PI}) - b}{m} \quad (4.3)$$

Caso a amostra tenha sido diluída, o valor obtido é multiplicado pelo fator diluição.

Em cada dia de trabalho é feita uma curva de calibração e realizado o respetivo controlo de qualidade, sendo controlada a área do padrão interno, a concentração das amostras fortificadas, duplicados e padrões de controlo de calibração. A calibração é obtida através do método de diluições, numa gama de trabalho de 2 µg/L – 30 µg/L para THM e 0,5 µg/L – 7,5 µg/L para tricloroetileno e tetracloroetileno, sendo controlada logo após ter sido obtida através de padrões externos de calibração. A sessão de trabalho é controlada no final e/ou a cada 20 determinações através de um padrão de calibração com concentração correspondente ao limite de quantificação, de um padrão com concentração correspondente ao meio da gama de trabalho e outro padrão com concentração correspondente ao máximo da gama de trabalho.

4.5.3. Interferências/Limitações do método

A determinação de THM, triCE e tetraCE por SPME-GC-MS podem envolver eventuais interferências produzidas pela contaminação de solventes, reagentes e material de vidro, dando origem a um maior número de picos e subidas da linha de base nos cromatogramas. Podem ainda dever-se a contaminações efetuadas, tanto na fase de amostragem como na análise. Desta forma, é muito importante que todo o material que entre em contato com as amostras se encontre isento de quaisquer interferentes.

Ainda como fonte de contaminação, pode ser considerado o ambiente do laboratório onde se executa a preparação das amostras e dos padrões. Também por isso, a seringa e o sistema cromatográfico devem ser rigorosamente descontaminados, com o objetivo de minimizar as possíveis interferências.

Resultados e Discussão

5.1. Implementação e validação da determinação de óleos, gorduras e hidrocarbonetos em águas residuais por FTIR

A água, imprescindível à vida, é utilizada em diversas atividades humanas, o que resulta numa água poluída designada por água residual. Neste tipo de águas, como um dos maiores problemas no seu tratamento, é apontada a presença de óleos e gorduras, pelo risco que representam tanto para o ambiente como para os processos de tratamento.

A implementação e validação da determinação de óleos, gorduras e hidrocarbonetos baseia-se na readaptação de um método *standard* 5520-C: “*Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*”. Este refere-se a um método de partição por infravermelho, que recomenda a utilização de Freon-113 como solvente de extração. Contudo, como se verificou anteriormente, a sua utilização passou a ser proibida, tendo surgido o tetracloroetileno como solvente de extração para esta determinação.

5.1.1. Identificação

A determinação de óleos, gorduras e hidrocarbonetos é realizada recorrendo à utilização da técnica FTIR, após o analito ter sido extraído da amostra recorrendo a uma extração líquido-líquido (com tetracloroetileno como solvente de extração). Com este tipo de extração pretende-se a separação de duas fases líquidas (amostra *versus* solvente de extração), visando a passagem do analito para o solvente utilizado. Posteriormente, o extrato (contendo o solvente que contém o analito) é analisado através da técnica de FTIR. Neste ensaio, o analito

acaba por ser uma mistura de vários analitos, uma vez que a determinação se baseia na comparação das absorvâncias obtidas no extrato extraído da amostra com as absorvâncias obtidas através da calibração com óleos de referência.

É de referir que os resultados apresentados se focam apenas na análise de óleos e gorduras pela técnica de FTIR, uma vez que não foi possível realizar todas as etapas do processo na análise de hidrocarbonetos.

5.1.2. Especificidade e Seletividade

Os parâmetros de especificidade e seletividade permitem determinar a existência de possíveis interferências e a sua influência nos resultados, recorrendo à avaliação de extratos de brancos, brancos fortificados, amostras e amostras fortificadas. Esta determinação deve garantir boa resolução de espectros de Infravermelho obtidos pela técnica FTIR, bem como perfis marcados que os caracterizem. Assim, os espectros obtidos para padrões, brancos e amostras devem ser verificados, visando a correta identificação dos compostos em estudo.

A determinação da especificidade e seletividade é conseguida através de testes de recuperação em brancos fortificados (Tabela 5.1), cujas percentagens devem apresentar valores entre 70-130% para que o método analítico seja considerado específico e seletivo.

Tabela 5.1 – Dados obtidos nos testes de recuperação de amostras fortificadas, na análise de OG.

Conc. Real / (mg/L)	Conc. Padrão adicionado / (mg/L)	Volume padrão adicionado / (mL)	Conc. Medida / (mg/L)	% Recuperação
0,510	9490	0,05	2,280	100,7
0,520		0,10	3,100	97,9
0,120		0,05	1,960	98,9
0,020		0,075	3,090	94,9
15,660			18,660	103,0
0,540			3,120	89,2
0,670			3,760	93,4
1,700			4,430	89,8
4,900			8,000	109,8
61,580			64,185	89,2
2,830			5,190	89,6
61,090			64,760	114,1

Segundo a análise da tabela anterior, verifica-se que o método analítico é específico e seletivo, uma vez que os valores da percentagem de recuperação se encontram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos, ou seja, entre 70% e 130%.

5.1.3. Sensibilidade

A sensibilidade de um método analítico consiste na capacidade de distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Neste método, a curva de calibração é definida por um modelo linear, o que se reflete na constante sensibilidade ao longo de toda a gama de trabalho. Consequentemente, pode-se considerar que a sensibilidade corresponde ao declive da reta de calibração, tomando, assim, o valor de 0,0018 (ver equação 5.1). Este valor traduz a linearidade entre os valores obtidos ao longo da reta de calibração, apresentando um valor de coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9997, o que revela a boa qualidade da reta de calibração (Gráfico 5.1). A equação da reta de calibração é dada por:

$$y = 0,0018x + 0,0033 \quad (5.1)$$

em y corresponde à absorvância medida de cada um dos padrões de calibração, em termos de altura, e x corresponde à concentração dos mesmos.

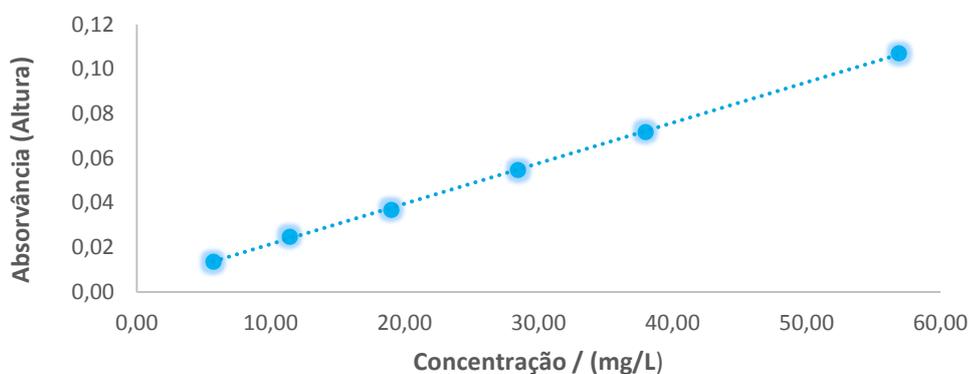


Gráfico 5.1 – Representação da curva de calibração: absorvância, em altura, em função da concentração de cada padrão de calibração.

5.1.4. Limiares analíticos

A partir do limite de quantificação e de deteção é possível traçar os limiares analíticos alcançáveis com o método que se pretende utilizar. Estes limites correspondem às menores concentrações da curva de calibração, que correspondem aos limites inferiores da curva de calibração.

5.1.4.1. Limite de quantificação

É necessário determinar o limite de quantificação que corresponde à menor concentração medida, a partir da qual é possível quantificar o analito, com uma dada exatidão e precisão. Neste passo, são avaliados os brancos fortificados, uma vez que os mesmos envolvem a etapa de extração líquido-líquido, o que leva ao real valor do LQ. Para tal, e idealmente, o valor do coeficiente de variação dos brancos fortificados da gama de trabalho deveria ser inferior a 10%. Contudo, como o método analítico utilizado envolve uma etapa de extração, que é suficiente para influenciar o valor de CV, então este valor pode ser aceite mesmo que se apresente relativamente superior a 10%.

Na tabela abaixo (Tabela 5.2), encontram-se os dados relativos aos brancos fortificados.

Tabela 5.2 – Avaliação do limite de quantificação: brancos fortificados.

	Conc. Medida / (mg/L)
	0,630
	0,580
	0,740
	0,680
	0,630
	0,670
	0,490
	0,666
	0,605
	0,506
Média	0,620
Desvio padrão	0,078
CV (%)	12,57

Através da análise da Tabela 5.2, observa-se que a análise de brancos fortificados com concentração correspondente à do padrão de menor concentração da gama de trabalho permite obter um valor médio igual a 0,620 mg/L. Este resultado confirma a aceitação do LQ estipulado (0,6 mg/L).

5.1.4.2. Limite de deteção

Assim que o limite de quantificação seja considerado válido, procede-se ao cálculo do limite de deteção, com base na equação 2.4. Desta forma, o limite de deteção definido, em termos de equipamento é de 0,632 mg/L e, em termos experimentais, é 0,176 mg/L.

5.1.5. Linearidade e gama analítica

5.1.5.1. Linearidade – Teste de *Mandel*

A melhor forma para avaliar a linearidade da gama analítica passa por recorrer ao teste de *Mandel*. Este teste consiste no ajuste dos valores experimentais com um polinómio de primeiro grau (*P01*) por comparação com os referentes obtidos através do ajuste dos valores experimentais com um polinómio de segundo grau (*P012*).

Na tabela abaixo (Tabela 5.3), encontram-se os dados obtidos para efetuar o teste de *Mandel*, bem como a sua análise.

Tabela 5.3 – Resultados obtidos para os ajustes dos valores experimentais aplicando *P01* e *P012* de OG.

	<i>P01</i>	<i>P012</i>
SS	1,64x10 ⁻⁶	1,11x10 ⁻⁶
Ndf	4	3
VarFit	4,10x10 ⁻⁷	3,68x10 ⁻⁷
Valor teste F (<i>TV</i>)	1,45	
Valor crítico F	34,12	
pH₀	0,31	

Segundo os resultados obtidos na tabela anterior, verifica-se que o valor de *TV* é inferior ao valor crítico de F e que, o valor de prova da hipótese nula, $pH_0 > 0,05$, o que confirma que a hipótese nula, H_0 , é aceite, portanto ambos os modelos se ajustam de forma similar aos valores experimentais. Contudo, o modelo *P01*, o modelo linear, apresenta-se como o melhor modelo, uma vez que possui um maior número de graus de liberdade.

5.1.5.2. Gama analítica - Teste de homogeneidade das variâncias

A gama analítica é avaliada segundo um teste de homogeneidade de variâncias, quando o método envolve a representação gráfica de uma curva de calibração que deve ter, no mínimo, cinco pontos distribuídos de forma equitativa. O teste de homogeneidade de variâncias consiste na análise de dez réplicas independentes do primeiro e último padrão, com o objetivo de verificar se existe diferença significativa entre as variâncias, nos limites da gama de trabalho (Tabela 5.4). Esta averiguação passa pela comparação entre o valor teste de F (*TV*) e o valor crítico de F.

Tabela 5.4 – Avaliação da gama analítica segundo o teste de homogeneidade de variâncias.

Réplicas	Padrão 1 [extrato] / (mg/L)	Padrão 6 [extrato] / (mg/L)
1	5,83	55,81
2	5,94	56,06
3	6,38	57,72
4	5,88	55,51
5	6,10	56,62
6	5,83	57,72
7	6,32	57,17
8	5,72	57,72
9	6,05	58,27
10	5,44	57,72
Valor teste F (TV)	5,39	
Valor crítico F	6,54	
pH_0	0,02	

Através da comparação entre o valor teste de F (TV) e o valor crítico de F apresentados na Tabela 5.4 verifica-se que o primeiro é inferior ao segundo, traduzindo-se assim na aceitação da hipótese nula. Tal significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias e, portanto, há homogeneidade de variâncias. Esta conclusão também é retirada pela avaliação do valor de prova da hipótese nula. Contudo, neste caso, poder-se-ia tornar numa situação dúbia porque pH_0 não é superior a 0,03, levando à rejeição da H_0 , mas a comparação entre os valores teste e crítico permitem refutar essa possibilidade, existindo assim homogeneidade de variâncias. Assim, e mediante o resultado obtido, a gama de trabalho instrumental utilizada, em termos de equipamento, encontra-se entre as 6 – 60 mg/L. Contudo, devido a um fator de 10, associado ao volume de amostra utilizado e o volume de extrato, em termos experimentais, a gama de trabalho pode encontrar-se entre 0,6 – 6 mg/L.

5.1.6. Precisão

A avaliação da precisão do método pode ser realizada segundo o parâmetro de repetibilidade e precisão intermédia. Ainda assim, a sua análise pode ser feita de acordo com duplicados de amostras (Tabela 5.5), cujo desvio deve ser inferior a 20%.

Tabela 5.5 – Avaliação da precisão do método analítico com base nos duplicados das amostras, em termos de desvios.

Duplicados	% Desvio
A	1,36
B	15,97
C	3,55
D	9,84
E	6,90
F	10,39
G	6,23
H	3,41
I	5,30
J	1,21

Mediante a análise da Tabela 5.5, verifica-se que existe precisão do método analítico, uma vez que, em duplicados de amostras, foram obtidos valores de desvios inferiores a 20%.

5.1.6.1. Repetibilidade

A determinação da repetibilidade (Tabela 5.6) de um método intralaboratorial efetua-se numa série de medições (≥ 10) sobre um mesmo padrão. Este procedimento poderá ser repetido em inúmeros padrões com diferentes níveis de concentração, sendo satisfatória apenas a determinação da repetibilidade nos extremos da gama de trabalho, pois são os padrões que mais facilmente sofrem desvios.

Para o nível de confiança de 95%, o Δr corresponde à diferença absoluta entre dois resultados obtidos em ensaio independentes. Além do Δr , para o estudo de repetibilidade também é importante considerar o CV de repetibilidade, que corresponde ao quociente entre o desvio-padrão de repetibilidade e a média dos resultados.

Tabela 5.6 – Avaliação da repetibilidade: média, desvio-padrão, coeficiente de variação (CV_r) e limite (Δr) de repetibilidade.

	Padrão 1: [extrato] / (mg/L)	Padrão 6: [extrato] / (mg/L)
	5,83	57,72
	5,94	56,06
	6,38	57,72
	5,88	57,72
	6,10	56,62
	5,83	57,72
	6,32	57,17
	5,72	57,72
	6,05	58,27
	5,44	57,72
Média	5,95	57,44
Desvio-padrão	0,28	0,65
CV_r (%)	4,70	1,13
Δr	0,89	2,08

Mediante a análise dos resultados da Tabela 5.6, o sistema apresenta boa repetibilidade para a análise de OG, uma vez que o CV_r é suficientemente baixo ($< 10\%$). Quanto menor for o CV_r , melhor é a repetibilidade. O facto do padrão 1 apresentar um CV_r superior ao do padrão 6, pode estar relacionado com a pequena quantidade de analito presente no padrão 1 (padrão de menor concentração), bem como um maior número de erros aleatórios associados ao seu processo de medição.

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

5.1.6.2. Precisão intermédia

A precisão também pode ser avaliada recorrendo ao parâmetro precisão intermédia (Tabela 5.7), que consiste na análise dos padrões de controlo utilizados, com concentrações e intervalos temporais diferentes.

Tabela 5.7 – Avaliação da precisão intermédia: média, desvio-padrão e coeficiente de variação (**CV**).

	Padrão controlo 1: 5,806 mg/L		Padrão controlo 4: 29,028 mg/L		Padrão controlo 6: 58,056 mg/L	
	Conc. Medida / (mg/L)	Desvio (%)	Conc. Medida / (mg/L)	Desvio (%)	Conc. Medida / (mg/L)	Desvio (%)
	4,63	-20,2	26,23	-9,6	59,15	1,9
	4,75	18,2	24,83	-14,5	55,07	-5,1
	6,21	7,0	28,27	-2,6	55,07	0,4
	6,99	20,4	28,00	-3,5	58,27	2,3
	7,04	21,3	27,67	-4,7	59,37	-2,5
	4,67	-19,6	28,66	-1,3	56,62	-1,5
	4,45	-23,4	28,22	-2,8	57,17	2,3
	4,89	-15,4	28,82	-0,7	59,37	5,1
	5,88	1,3	30,26	4,2	61,03	2,3
	5,61	-3,4	30,86	6,3	59,37	-0,6
	4,73	-18,5	31,31	7,9	57,72	5,1
	4,95	-14,8	25,85	-11,0	54,41	-7,2
	4,78	-17,7	29,71	2,3	53,86	0,4
	5,33	-8,2	25,96	-10,6	58,27	-8,2
	4,84	-16,7	29,26	0,8	61,58	0,4
	4,56	-21,5	30,59	5,4	58,82	6,1
	4,62	-20,5	29,26	0,8	57,93	1,3
Média	5,23		28,46		58,13	
Desvio-padrão	0,83		1,89		2,36	
CV (%)	15,89		6,62		4,06	

Mediante a análise dos resultados da Tabela 5.7, o método apresenta boa precisão intermédia para a análise de OG, uma vez que o **CV** é suficientemente baixo (<10%). O facto do padrão 1 apresentar um **CV** superior a 10%, pode estar relacionado com a pequena quantidade de analito presente no padrão 1 (padrão de menor concentração), bem como um maior número de erros aleatórios associados ao seu processo de medição.

5.1.7. Exatidão

A exatidão do método foi estimada através de ensaios de recuperação.

5.1.7.1. Testes de recuperação

Os testes de recuperação das amostras fortificadas permitem avaliar a exatidão do método analítico, constando essa informação na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 – Dados obtidos nos testes de recuperação de amostras fortificadas, na análise de OG.

Média	97,56
Desvio-padrão	8,28
CV (%)	8,49

Após análise da tabela anterior, e de acordo com os dados apresentados na Tabela 5.1, verifica-se que o método analítico apresenta boa exatidão, uma vez que os valores da percentagem de recuperação, em média, se encontram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos, ou seja, entre 70% e 130%. Para além disso, obtém-se um valor de coeficiente de variação inferior a 10%, como seria desejado.

5.1.8. Robustez

A avaliação da robustez do método consiste em averiguar a capacidade deste produzir o mesmo resultado, mantendo o seu desempenho analítico inalterável mediante mínimas alterações das condições experimentais. Na técnica de FTIR, as condições utilizadas são sempre as mesmas, por isso só faz sentido estudar a robustez do método com base no fator tempo, com o objetivo de averiguar se este afeta ou não a exatidão e precisão do mesmo. Esta avaliação é feita segundo 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 que se situe a meio da gama analítica. Os resultados obtidos encontram-se sistematizados na tabela abaixo (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 – Resultados do teste *ANOVA* fator único.

Valor teste F (TV)	0,01
Valor crítico F	1,92
pH₀	1,00

Segundo a análise efetuada, observa-se que o valor teste de F é inferior ao valor crítico de F. Desta forma, pode-se concluir que o método é robusto, uma vez que a H₀ é aceite, não existindo efeito do fator tempo, comprovado pelo valor de prova que é superior a 0,05.

5.1.9. Coerência

A coerência de um método analítico visa a avaliação da sua capacidade em conduzir sempre ao mesmo resultado, em instantes diferentes. Tendo-se verificado que o método analítico é robusto, ou seja, que não existe qualquer efeito sobre os dados obtidos, então o mesmo apresenta uma boa coerência dos resultados ($CV < 10\%$), como é possível observar na Tabela 5.10, com exceção do padrão de controlo 1 que apresenta um CV superior a 10%.

Tabela 5.10 – Avaliação da coerência do método analítico.

	Padrão controlo 1	Padrão controlo 4	Padrão controlo 6
Média	5,23	28,46	58,13
Desvio-padrão	0,83	1,89	2,36
CV (%)	15,89	6,62	4,06

5.2. Implementação e validação do método analítico de análise de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno em águas de consumo por SPME-GC-MS

O interesse pela implementação e validação do método analítico de análise de THM, tricloroetileno e tetracloroetileno em águas por SPME-GC-MS surge em consequência de uma avaria do equipamento GC-ECD. A determinação qualitativa já era efetuada em SPME-GC-MS, no entanto ainda não existia método quantitativo neste equipamento. As técnicas GC-ECD e SPME-GC-MS distinguem-se essencialmente pelo detetor que utilizam: a primeira faz uso de um detetor de captura eletrónica e a segunda utilizada como detetor um espectrómetro de massa. A utilização do espectrómetro de massas permite a qualificação dos analitos com maior grau de confiança.

5.2.1. Identificação

Com a injeção de uma mistura de substâncias no cromatógrafo gasoso, cada uma delas pode interagir com a fase estacionária da coluna e distribuir-se de uma forma específica. Esta interação, se existir, permite a retenção de cada substância na coluna em diferentes tempos, o que possibilita a sua distinção.

Acoplado ao cromatógrafo de gás encontra-se um espectrómetro de massa (MS). Trata-se de um detetor que permite, de uma forma rápida, a identificação qualitativa dos analitos pela comparação do seu espectro de massa com espectros de compostos conhecidos existentes na literatura.

A Figura 5.1 representa o perfil de corrente iónica total e os respetivos picos relativos à abundância de todos os iões no detetor em função do tempo. A partir do TIC, o *software* utilizado deve permitir o registo da abundância dos iões de uma massa específica em função do tempo, o que se designa por perfil de corrente iónica extraída (PCIE).

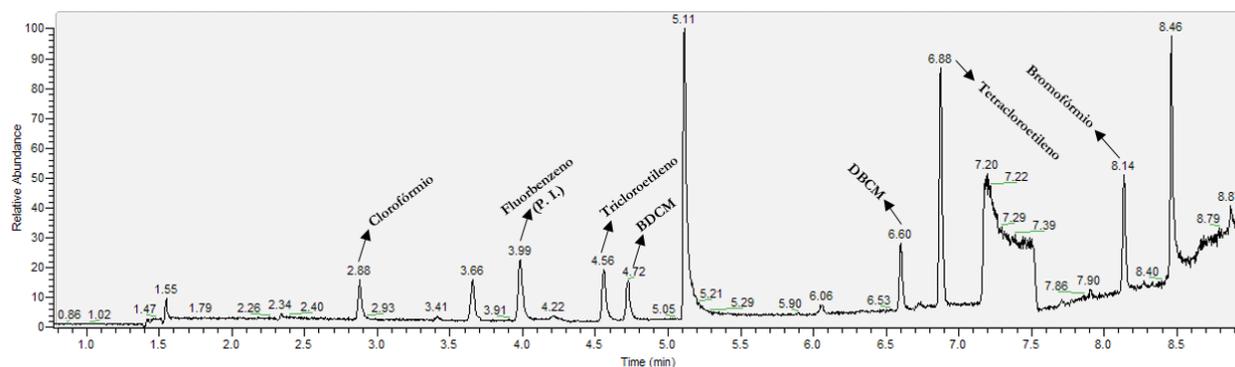


Figura 5.1 – Representação dos picos correspondentes à abundância de todos os iões no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado (*Full scan*).

Realizado o estudo por *Full scan*, é possível determinar os iões de quantificação dos vários analitos analisados, que se encontram representados na Tabela 5.11, de acordo com os espectros de massas representados no Anexo D.

Tabela 5.11 – Representação da sequência de eluição (tempos de retenção) e número de massa dos iões de quantificação dos vários analitos.

Composto	t_R / (min)	Ião 1 (m/z)	Ião 2 (m/z)	Ião 3 (m/z)	Ião 4 (m/z)
Clorofórmio	2,88	83	85	-	-
Fluorbenzeno	3,99	96	-	-	-
TriCE	4,56	95	97	130	132
BDCM	4,72	83	85	129	-
DBCM	6,60	127	129	131	207
TetraCE	6,88	129	131	164	166
Bromofórmio	8,14	91	171	173	175

5.2.2. Resolução

Na otimização de métodos de análise como a cromatografia, uma das etapas passa pelo equilíbrio entre o menor tempo de análise e uma melhor resolução. A resolução, R_S , corresponde a uma medida quantitativa da separação de dois picos adjacentes, sendo determinada pela equação:

$$R_S = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{(w_1 + w_2)} \quad (5.2)$$

onde t_R corresponde aos tempos de retenção de cada pico e w à respetiva largura na linha de base.

O valor deste parâmetro reflete o grau de perfeição com que dois picos são separados. Preferencialmente pretende-se $R_s \geq 2$, pois garante a separação completa e bem definida entre os picos. No entanto, $R_s \geq 0,8$ ainda pode ser aceite como razoável.

Após a determinação dos tempos de retenção de cada um dos analitos (Tabela 5.11), confirmada com o espetro de massas por *Full scan* (Anexo D), os mesmos são otimizados em termos de um modo SIM (Figura 5.2).

Partindo da aplicação da equação 5.2, os cromatogramas (Figuras 5.3-5.8) representados abaixo têm identificada a correspondente resolução, determinada entre cada dois picos adjacentes e considerando o modo SIM.

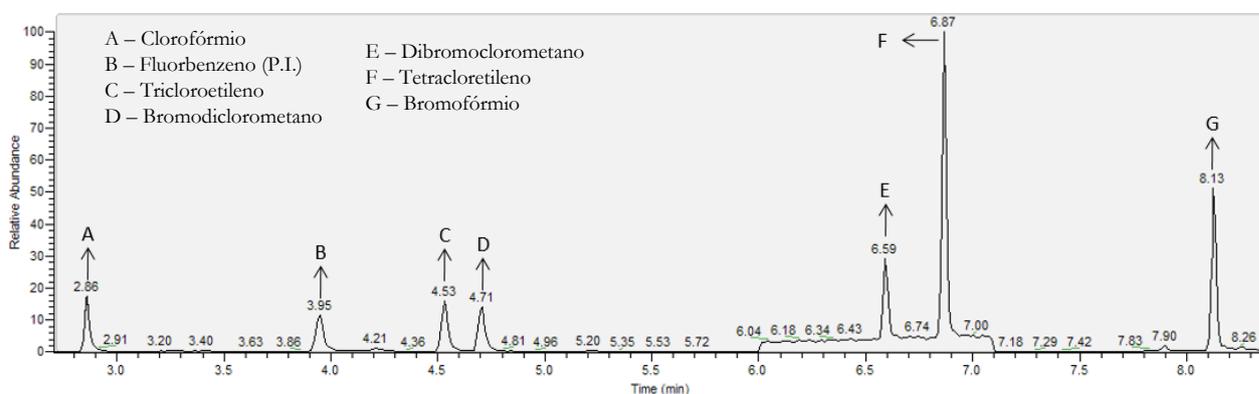


Figura 5.2 – Representação dos picos correspondentes à abundância de todos os iões no detetor, por monitorização seletiva de iões (SIM), em função do tempo, do padrão mais concentrado.

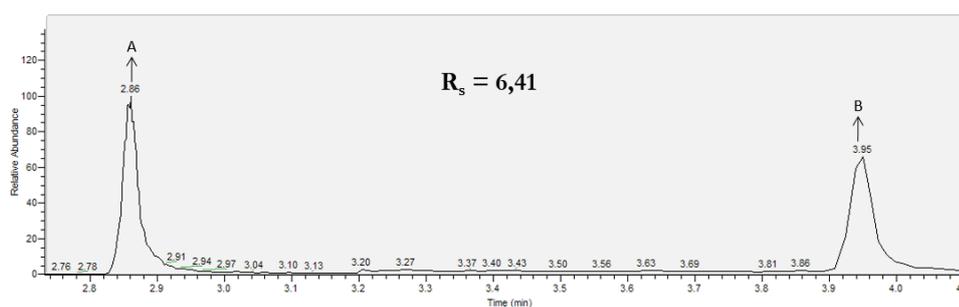


Figura 5.3 – Representação dos picos correspondentes à abundância dos iões A e B no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado, com respetivo valor de resolução.

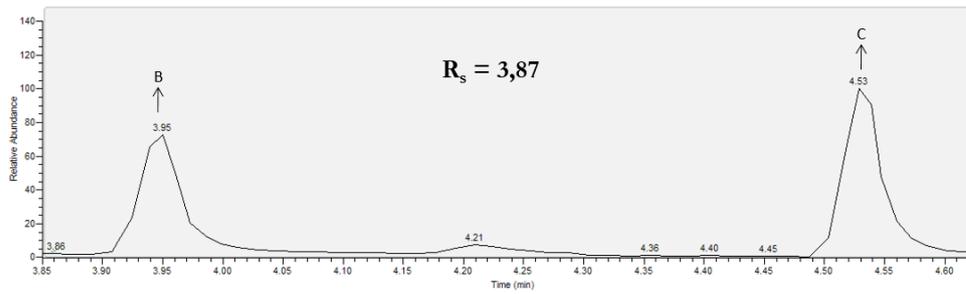


Figura 5.4 – Representação dos picos correspondentes à abundância dos íons B e C no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado, com respectivo valor de resolução.

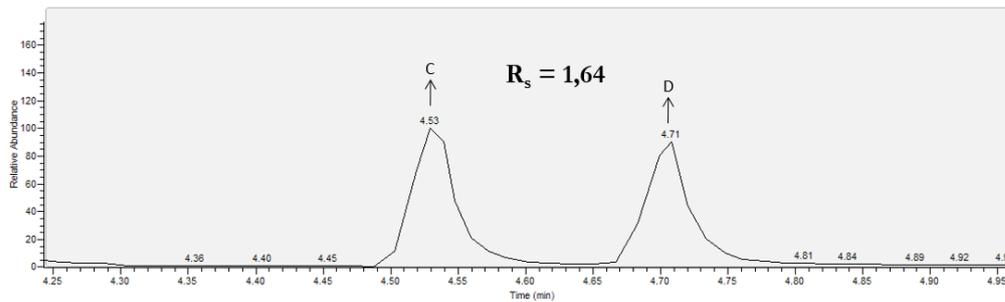


Figura 5.5 – Representação dos picos correspondentes à abundância dos íons C e D no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado, com respectivo valor de resolução.

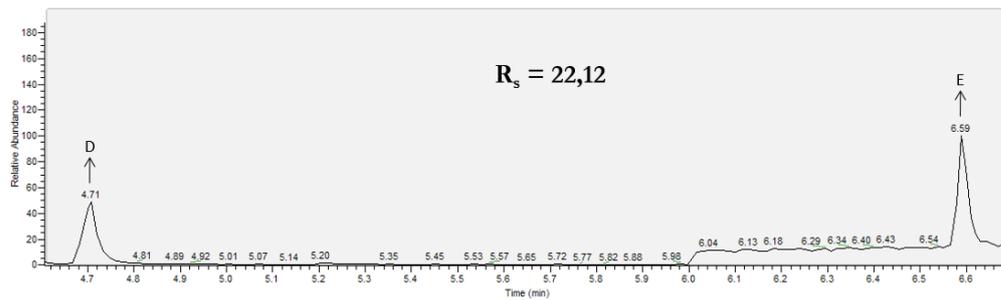


Figura 5.6 – Representação dos picos correspondentes à abundância dos íons D e E no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado, com respectivo valor de resolução.

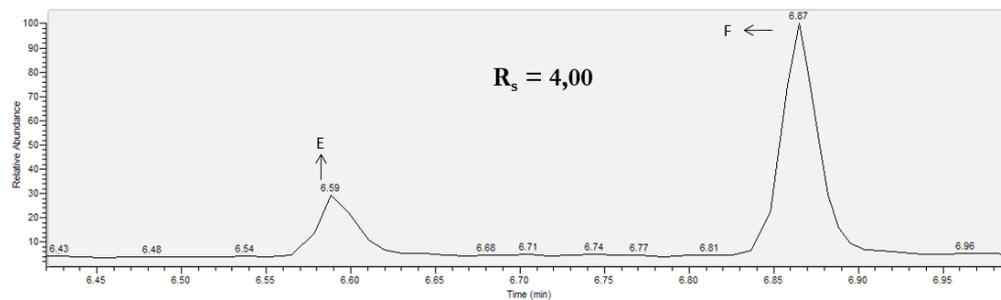


Figura 5.7 – Representação dos picos correspondentes à abundância dos íons E e F no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado, com respectivo valor de resolução.

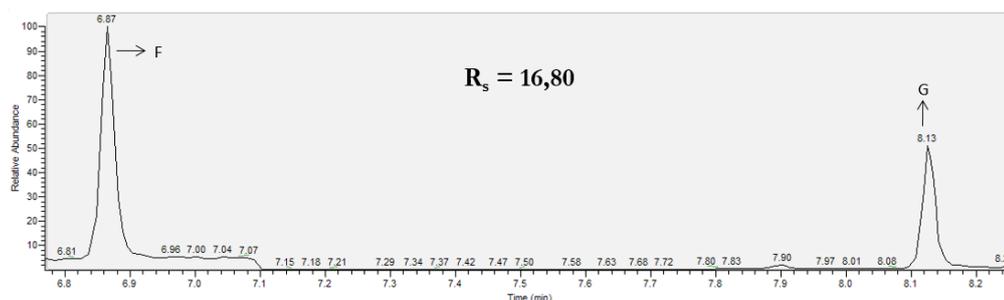


Figura 5.8 – Representação dos picos correspondentes à abundância dos íons F e G no detetor em função do tempo, do padrão mais concentrado, com respectivo valor de resolução.

Tabela 5.12 – Valores obtidos para a resolução de picos adjacentes.

Picos	R_s
A - B	6,41
B - C	3,87
C - D	1,64
D - E	22,12
E - F	4,00
F - G	16,80

De uma forma geral, através dos resultados obtidos, verifica-se que os picos correspondentes à abundância relativa de todos os íons no detetor, do padrão mais concentrado, apresentam uma excelente resolução, uma vez que o seu valor é superior a 2, tal como desejado. Apesar da resolução entre os picos C e D não ter obtido um valor igual ou superior a 2, obteve uma resolução de 1,67 que indica uma resolução satisfatória entre os mesmos.

5.2.3. Avaliação do padrão interno

A avaliação do padrão interno é um passo muito importante neste estudo, uma vez que o mesmo dita alguma influência sob o resultado, tendo a função de amortizar as variações que ocorrem nas extrações/injeções realizadas. Para qualquer padrão ou amostra, a área do padrão interno não deve variar mais de 30% em relação à obtida para os padrões de calibração avaliados, num mesmo dia de trabalho (Tabela 5.13). Também por isso a análise atenta dos PCIE é relevante, uma vez que os picos do PI nos padrões e amostras devem ser semelhantes.

Tabela 5.13 – Valores das áreas dos padrões de calibração, com respectiva média e margem de variação para um dos ensaios realizados.

Padrões de calibração	Área PI
P 1	35692
P 2	34551
P 3	35472
P 4	34432
P 5	33134
P 6	34937
Média	34703
Média - 30%	24292
Média + 30%	45114

5.2.4. Especificidade e Seletividade

A avaliação da especificidade e seletividade dos analitos (clorofórmio, tricloroetileno – TriCE, bromodiclorometano – BDCM, tetracloroetileno – TetraCE, dibromoclorometano – DBCM e bromofórmio) em cromatografia iônica é realizada com base em testes de recuperação em amostras fortificadas, cujas percentagens devem apresentar valores entre 75-125%.

Na Tabela 5.14 são apresentados os dados relativos aos testes de recuperação nas amostras fortificadas para cada analito em estudo.

Tabela 5.14 – Percentagem de recuperação obtida nos testes de recuperação de amostras fortificadas para cada um dos analitos em estudo.

Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
-	96,8	82,0	99,1	82,8	88,2
85,3	94,3	82,3	99,5	86,3	83,0
-	108,1	-	111,5	123,0	118,6
-	108,9	119,6	114,9	112,4	111,9
112,9	109,9	123,8	113,0	116,4	123,6
102,2	106,8	107,7	107,8	106,4	112,5
99,0	106,7	115,2	104,6	116,5	124,6
88,5	97,4	105,5	99,1	103,2	120,4
-	117,7	-	118,4	-	-
108,7	109,0	117,9	113,7	119,9	-
98,8	83,8	104,5	88,6	103,5	108,0
107,5	91,5	120,1	91,6	117,2	119,8
111,8	90,5	99,9	79,0	100,6	105,6
109,2	93,9	99,5	87,7	101,5	96,5
89,7	93,3	93,9	78,4	93,1	86,7
100,3	88,2	101,9	86,2	100,7	96,7
103,2	88,7	103,4	90,2	100,5	106,2
117,6	94,0	106,8	85,6	116,8	-

Através da análise de Tabela 5.14, verifica-se que o método é específico e seletivo para os analitos em questão, uma vez que a percentagem de recuperação obtida se encontra dentro dos critérios de aceitação estabelecidos para este método.

5.2.5. Sensibilidade

Tratando-se de um método cujo modelo é linear (ver secção 2.1.3), a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho, correspondendo ao declive da reta de calibração para cada analito em estudo.

Na Tabela 5.15 encontram-se os dados relativos ao declive da reta (sensibilidade) de cada analito em estudo, bem como o respetivo coeficiente de correlação (**R**). Este coeficiente estabelece a interdependência de dados entre o sinal medido e a concentração do padrão correspondente, refletindo o tipo de correlação que se pretende aplicar.

Tabela 5.15 – Valores do declive da reta (sensibilidade) e do valor de coeficiente de correlação (R) de cada um dos analitos em estudo, mediante a presença (Gráfico 5.2) ou ausência do PI (Gráfico 5.3).

Sensibilidade	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
Com P. I.	0,0576	0,2947	0,057	1,0136	0,0669	0,1307
R	0,9984	0,9960	0,9982	0,9962	0,9974	0,9971
Sem P. I.	$2,3660 \times 10^3$	$1,2122 \times 10^4$	$2,3458 \times 10^3$	$4,1528 \times 10^4$	$2,7472 \times 10^3$	$5,3669 \times 10^3$
R	0,9939	0,9997	0,9969	0,9995	0,9998	0,9989

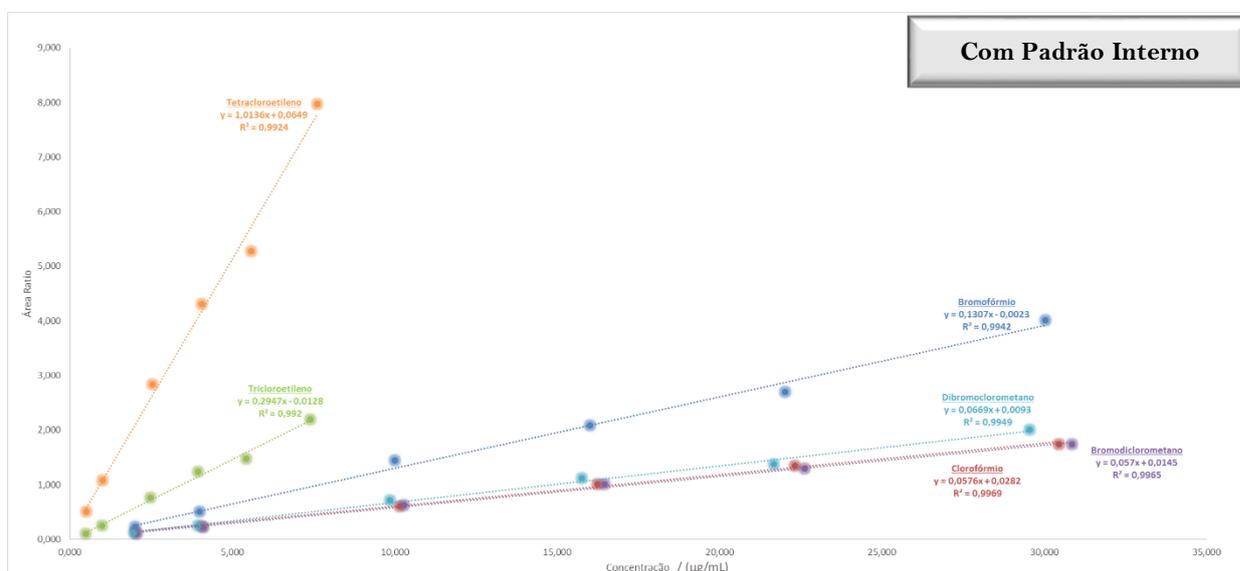


Gráfico 5.2 – Representação gráfica da área ratio de cada analito em função da respetiva concentração, na presença de padrão interno.

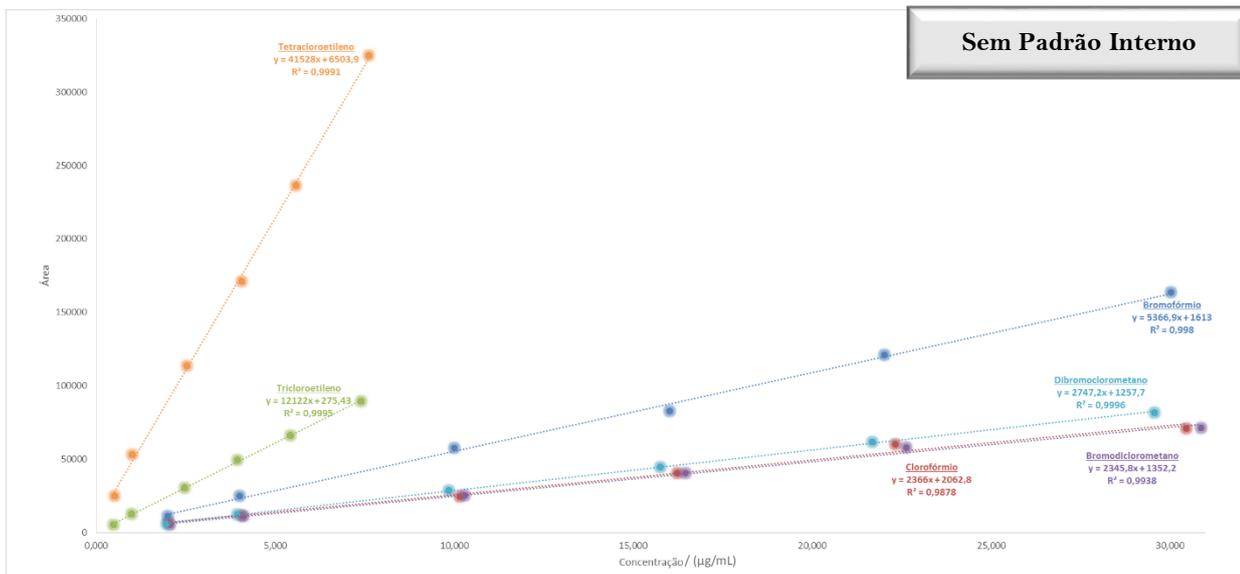


Gráfico 5.3 – Representação gráfica da área de cada analito em função da respectiva concentração, na ausência de padrão interno.

5.2.6. Limiares analíticos

5.2.6.1. Limite de quantificação

A determinação do limite de quantificação é um passo de extrema importância, pois corresponde à menor concentração medida que permite quantificar dado analito. Para tal, há que garantir, em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, que o coeficiente de variação do padrão de menor concentração da gama de trabalho seja inferior a 10%.

Na Tabela 5.16 encontram-se os dados relativos ao padrão de menor concentração da curva de calibração, bem como a avaliação do limite de quantificação.

Tabela 5.16 – Avaliação do LQ de cada analito, segundo o padrão de menor concentração (Padrão1).

Padrão 1 / (µg/L)						
	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
	1,760	0,451	1,877	0,433	1,777	2,123
	1,814	0,483	1,884	0,493	2,031	2,002
	1,753	0,450	1,929	0,418	1,783	2,272
	2,089	0,443	1,891	0,493	1,988	2,253
	1,747	0,446	1,833	0,419	1,877	2,162
	2,167	0,514	2,263	0,483	1,927	2,076
	1,892	0,572	1,978	0,485	2,000	2,339
	2,228	0,485	1,956	0,414	2,144	2,552
	1,701	0,505	1,828	0,430	1,941	2,184
	2,189	0,474	2,054	0,503	2,047	2,253
Média	1,934	0,482	1,950	0,457	1,952	2,222
Desvio-padrão	0,210	0,040	0,130	0,037	0,116	0,153
CV (%)	10,88	8,28	6,66	8,11	5,95	6,90

Após análise dos resultados obtidos, verifica-se que, na maioria, todos os compostos cumprem o critério pré-estabelecido ($CV < 10\%$), sendo assim aceite o limite de quantificação estabelecido para cada um dos compostos (2 µg/L para THM e 0,5 µg/L para tri- e tetracloroetileno).

5.2.6.2. Limite de detecção

O limite de detecção é facilmente influenciado pelo sistema cromatográfico usado e também pelas condições em que se encontra no momento da sua determinação, nomeadamente da coluna, do detetor e do sistema de injeção. A verificação deste limite deve ser realizada com o sistema cromatográfico tão estável quanto possível e após a obtenção de bons resultados para os padrões externos de controlo e para as amostras fortificadas.

Após garantir que o LQ para cada analito está válido, calcula-se o limite de detecção, segundo a equação 2.4. Assim, o LD definido para cada analito encontra-se na tabela abaixo (Tabela 5.17).

Tabela 5.17 – Limite de detecção de cada analito.

Limite de detecção / (µg/L)					
Clorofórmio	BDCM	DBCM	Bromofórmio	TriCE	TetraCE
0,476	0,293	0,262	0,347	0,090	0,084

De acordo com o descrito no D.L. n.º 306/2007, em águas de consumo, o valor paramétrico para a soma das concentrações dos THM é 100 µg/L e para a soma das concentrações de tri- e tetracloroetileno é 10 µg/L. No anexo IV do mesmo D.L., constam os parâmetros de desempenho mínimo dos métodos analíticos, nomeadamente, referentes aos THM totais e ao tricloroetileno e tetracloroetileno. Estes parâmetros devem, no mínimo, ser capazes de medir concentrações iguais ao valor paramétrico com a exatidão, a precisão e os limites de deteção especificados. ^[6]

Desta forma, no caso dos THM totais, o limite de deteção deve corresponder a 10% do seu valor paramétrico e as características de desempenho dos métodos de análise aplicam-se a cada um dos THM como 25% do V.P. que consta no anexo I do DL. n.º 306/2007. De uma forma simplificada: como o V.P. dos THM totais é de 100 µg/L, cada um deles (clorofórmio, BDCM, DBCM e bromofórmio) poderá apresentar um valor de 25 µg/L (o que corresponde a 25% do V.P.). Visto que o LD corresponde a 10% deste valor, então equivale a um valor de 2,5 µg/L. De forma análoga, para tricloroetileno e tetracloroetileno, as características de desempenho dos métodos de análise aplicam-se a cada um deles como 50% do V.P. que consta no mesmo anexo. Assim sendo, como o V.P. da soma de tricloroetileno e tetracloroetileno é de 10 µg/L, cada um deles poderá exibir um valor de 5 µg/L (o que equivale a 50% do V.P.). Como o LD também corresponde a 10% deste valor, então este pode tomar o valor de 0,5 µg/L. ^[6]

Em suma, segundo o D.L. referido, o LD para cada THM seria de 2,5 µg/L e seria 0,5 µg/L tanto para tricloroetileno como para tetracloroetileno. Estabelecendo a comparação com os valores obtidos a nível experimental (Tabela 5.17), verifica-se que os valores de LD legislados estão muito acima do que aquilo que é possível praticar neste método, o que evidencia a qualidade do mesmo.

Posto isto, ainda é possível efetuar outro tipo de análise: comparação entre LQ experimental e LD teórico. Mediante os resultados obtidos anteriormente (ver seção 5.2.6.1), observou-se que o LQ corresponde a 2 µg/L para THM e 0,5 µg/L para tri- e tetracloroetileno. Em termos comparativos, estes valores encontram-se, respetivamente, abaixo e iguais aos valores de LD ditados pela legislação. Isto significa, que o método analítico utilizado faz uso de um LQ, bem como de um LD, que se encontra muito abaixo do que é previsto pela legislação, o que permite demonstrar a sua capacidade de utilizar limiares analíticos muito abaixo do que é descrito no D.L..

5.2.7. Linearidade e gama analítica

5.2.7.1. Linearidade – Teste de *Mandel*

A linearidade da gama analítica é determinada segundo o teste de *Mandel*, testando o ajuste dos valores experimentais com *P01* e comparando-os com os referentes obtidos por *P012*.

Na tabela abaixo (Tabela 5.18), encontram-se os dados obtidos para efetuar o teste de *Mandel*, bem como a sua análise.

Tabela 5.18 – Resultados obtidos para os ajustes dos valores experimentais aplicando *P01* e *P012* para cada analito.

	Clorofórmio		TriCE		BDCM		TetraCE		DBCM		Bromofórmio	
	<i>P01</i>	<i>P012</i>	<i>P01</i>	<i>P012</i>	<i>P01</i>	<i>P012</i>	<i>P01</i>	<i>P012</i>	<i>P01</i>	<i>P012</i>	<i>P01</i>	<i>P012</i>
SS	0,006	0,002	0,025	0,024	0,007	0,002	0,296	0,291	0,013	0,013	0,058	0,057
Ndf	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4	3
VarFit	0,002	0,001	0,006	0,008	0,002	0,001	0,074	0,097	0,003	0,004	0,015	0,019
Valor teste F (<i>TV</i>)	8,16		0,11		7,99		0,05		0,10		0,08	
Valor crítico F	34,12		34,12		34,12		34,12		34,12		34,12	
pH₀	0,06		0,77		0,07		0,84		0,77		0,80	

Através dos resultados obtidos na tabela anterior, verifica-se que, para todos os compostos, o valor de *TV* é inferior ao valor crítico de F e que $pH_0 > 0,05$, o que confirma a aceitação da hipótese nula e, conseqüentemente, permite afirmar que ambos os modelos se ajustam de forma similar aos valores experimentais. Contudo, o modelo *P01*, o modelo linear, apresenta-se como o melhor modelo, pois possui um maior número de graus de liberdade.

5.2.7.2. Gama analítica - Teste de homogeneidade das variâncias

Com 99% de confiança, o teste de *Fisher* (F) permite verificar a existência de homogeneidade de variâncias, onde se assume que H_0 corresponde a variâncias obtidas estatisticamente equivalentes e H_1 corresponde a variâncias estatisticamente diferentes.

O teste de homogeneidade de variâncias foi realizado através da análise de dez leituras do padrão de concentração mais baixa e dez 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.

Na Tabela 5.19 constam os valores obtidos para a avaliação da gama analítica através do teste de homogeneidade de variâncias.

Tabela 5.19 – Avaliação da gama analítica segundo o teste de homogeneidade de variâncias.

Réplicas	Concentração de Padrões 1 e 6, P1 e P6 / (µg/L)											
	Clorofórmio		TriCE		BDCM		TetraCE		DBCM		Bromofórmio	
	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]
1	1,760	30,394	0,451	7,683	1,877	32,908	0,433	7,980	1,777	30,639	2,123	32,034
2	1,814	30,820	0,483	7,544	1,884	32,935	0,493	7,793	2,031	30,591	2,002	32,180
3	1,753	30,409	0,450	7,450	1,929	32,567	0,418	7,839	1,783	30,605	2,272	31,546
4	2,089	29,750	0,443	7,711	1,891	33,015	0,493	7,976	1,988	30,843	2,253	31,515
5	1,747	30,498	0,446	7,613	1,833	32,442	0,419	7,789	1,877	31,074	2,162	32,210
6	2,167	30,114	0,514	7,480	2,263	32,341	0,483	7,986	1,927	30,732	2,076	31,537
7	1,892	30,852	0,572	7,548	1,978	32,602	0,485	7,979	2,000	30,827	2,339	31,714
8	2,228	30,930	0,485	7,611	1,956	32,997	0,414	7,939	2,144	31,057	2,552	32,189
9	1,701	30,310	0,505	7,464	1,828	32,969	0,430	7,990	1,941	31,283	2,184	32,239
10	2,189	31,065	0,474	7,501	2,054	32,885	0,503	8,007	2,047	30,972	2,253	32,421
Valor teste F (TV)	3,75		5,20		3,77		5,40		3,97		5,04	
Valor crítico F	6,54		6,54		6,54		6,54		6,54		6,54	
pH₀	0,06		0,02		0,06		0,02		0,05		0,02	

Através da comparação entre o valor teste (TV) e o valor crítico de F apresentados na Tabela 5.19, para todos os compostos se verifica que o primeiro valor é inferior ao segundo, o que resulta na aceitação da hipótese nula. Tal significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias, existindo assim homogeneidade de variâncias. Para além disso, ainda se comprova que as gamas analíticas estabelecidas são adequadas (2 µg/L – 30 µg/L para THM e 0,5 µg/L – 7,5 µg/L para tricloroetileno e tetracloroetileno).

Este tipo de conclusões pode ainda ser comprovado pelo valor de prova (pH_0), que deve ser superior a 0,05, tal como no caso do clorofórmio, BDCM e DBCM. Nos restantes compostos o mesmo não se verifica, mas tal não significa que a hipótese nula seja rejeitada, uma vez que entre 0,01 e 0,05 existe uma zona dúbia, aceitando H_0 para valores de prova superiores a 0,03 e rejeitando valores de prova inferiores a 0,03. Contudo, como valor teste é efetivamente inferior ao valor tabelado, a H_0 é aceite e assume-se que existe homogeneidade de variâncias entre os extremos da curva de calibração.

5.2.8. Precisão

A precisão do método pode ser avaliada através do parâmetro repetibilidade e precisão intermédia. Contudo, para além disso, pode ainda ser avaliada segundo duplicados de amostras (Tabela 5.20), cujo desvio deve ser inferior a 20%, como observado na tabela baixo.

Tabela 5.20 – Avaliação da precisão do método analítico com base em duplicados de amostras.

% Desvio					
Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
9,61	-	1,31	-	9,51	-
6,01	2,54	0,23	0,41	3,42	6,07
8,55	-	2,23	-	7,87	-
-	0,75	5,14	3,05	7,06	5,80
2,30	-	6,49	-	3,25	-
5,69	2,85	9,53	4,73	7,16	9,34
6,27	-	4,85	-	6,22	-
6,28	9,14	6,31	5,35	9,75	3,39
7,48	7,71	5,07	-	3,56	-
13,70	-	12,13	4,05	10,46	10,22
4,45	8,82	5,66	-	3,28	-
5,27	3,66	10,20	3,42	10,29	10,34
1,83	5,61	0,39	10,49	0,95	8,99
8,52	5,80	8,09	9,46	7,90	10,95
13,07	-	3,24	5,27	14,99	16,21

Mediante a análise da Tabela 5.20, verifica-se que existe precisão do método analítico, uma vez que foram obtidos valores de desvios inferiores a 20%.

5.2.8.1. Repetibilidade

Um método analítico pode ver a sua precisão avaliada através do parâmetro repetibilidade (Tabela 5.21). Este baseia-se num dos padrões de calibração de cada analito (padrão de maior concentração, P6). O valor obtido para a precisão, em termos de CV, deve ser inferior a 6% para as áreas dos picos, inferior a 10% para as concentrações dos analitos e inferior a 0,2% para os tempos de retenção.

Tabela 5.21 – Avaliação da repetibilidade do padrão de maior concentração (padrão 6), em termos de área, concentração e tempo de retenção: média, desvio-padrão, limite (Δr) e coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r).

Réplicas	Clorofórmio			TriCE			BDCM		
	Área	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	t_R /(min)	Área	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	t_R /(min)	Área	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	t_R /(min)
1	71206	30,394	2,86	87714	7,683	4,53	76169	32,908	4,70
2	75640	30,820	2,85	88450	7,544	4,53	75679	32,935	4,71
3	71397	30,409	2,85	91518	7,450	4,53	79364	32,567	4,70
4	60420	29,750	2,85	90615	7,711	4,53	75064	33,015	4,71
5	74296	30,498	2,85	91197	7,613	4,53	77594	32,442	4,71
6	69693	30,114	2,84	87405	7,480	4,53	73469	32,341	4,70
7	70254	30,852	2,85	86760	7,548	4,54	72897	32,602	4,70
8	70499	30,930	2,86	85163	7,611	4,54	73848	32,997	4,70
9	67560	30,310	2,85	89873	7,464	4,53	72133	32,969	4,71
10	72199	31,065	2,85	87279	7,501	4,53	75050	32,885	4,70
Média	70316	30,514	2,85	88597	7,560	4,53	75127	32,766	4,70
Desvio-padrão	4158	0,408	$4,00 \times 10^{-3}$	2111	0,091	$3,00 \times 10^{-3}$	2204	0,252	$2,00 \times 10^{-3}$
Δr	13290	1,303	0,01	6748	0,291	0,01	7047	0,806	0,01
CV_r (%)	5,91	1,34	0,14	2,38	1,21	0,07	2,93	0,77	0,05

Réplicas	DBCM			TetraCE			Bromofórmio		
	Área	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	t_R /(min)	Área	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	t_R /(min)	Área	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	t_R /(min)
1	80231	30,639	6,59	317664	7,980	6,87	163013	32,034	8,13
2	82272	30,591	6,59	318662	7,793	6,86	168184	32,180	8,12
3	86248	30,605	6,59	327151	7,839	6,86	172754	31,546	8,13
4	78573	30,843	6,60	321251	7,976	6,87	165067	31,515	8,13
5	86902	31,074	6,59	331240	7,789	6,86	171399	32,210	8,13
6	81636	30,732	6,60	322481	7,986	6,87	163710	31,537	8,13
7	80600	30,827	6,60	317157	7,979	6,87	163554	31,714	8,13
8	81281	31,057	6,59	315877	7,939	6,87	163972	32,189	8,13
9	80038	31,283	6,60	310801	7,990	6,87	161208	32,239	8,13
10	82660	30,972	6,59	324885	8,007	6,87	159110	32,421	8,13
Média	82044	30,862	6,59	320717	7,928	6,87	165197	31,959	8,13
Desvio-padrão	2665	0,231	$6,00 \times 10^{-3}$	5971	0,086	$3,00 \times 10^{-3}$	4329	0,344	$3,00 \times 10^{-3}$
Δr	85167	0,737	0,02	19084	0,275	0,01	13836	1,101	0,01
CV_r (%)	3,25	0,75	0,08	1,86	1,09	0,05	2,62	1,08	0,03

Segundo a análise dos resultados da Tabela 2.21, o método analítico apresenta boa repetibilidade para a determinação dos diferentes analitos, uma vez que o CV_r é suficientemente baixo. Quer para a área do pico, ou para a concentração do analito ou para os tempos de retenção, o valor do coeficiente de variação cumpre os valores estabelecidos para qualquer um dos analitos, sendo respectivamente inferior a 6%, 10% e 0,2%. Quanto menor for o CV_r , melhor é a repetibilidade.

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

5.2.8.2. Precisão intermédia

Outro parâmetro que permite a determinação da precisão é a precisão intermédia (Tabela 5.22), que se baseia na análise dos padrões utilizados, com concentrações e intervalos temporais diferentes.

Tabela 5.22 – Avaliação da precisão intermédia, em padrões de menor e maior concentração (P1 e P6): média, desvio padrão, coeficiente de variação (*CV*).

Réplicas	Concentração de Padrões 1 e 6, P1 e P6 / (µg/L)											
	Clorofórmio		TriCE		BDCM		TetraCE		DBCM		Bromofórmio	
	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]	[P 1]	[P 6]
1	2,091	34,656	0,580	8,038	2,538	33,756	0,616	8,215	1,934	33,107	2,181	34,796
2	1,760	30,394	0,451	7,683	1,877	32,908	0,433	7,980	1,777	30,639	2,123	32,034
3	1,814	30,820	0,483	7,544	1,884	32,935	0,493	7,793	2,031	30,591	2,002	32,180
4	1,753	30,409	0,450	7,450	1,929	32,567	0,418	7,839	1,783	30,605	2,272	31,546
5	2,089	29,750	0,443	7,711	1,891	33,015	0,493	7,976	1,988	30,843	2,253	31,515
6	1,747	30,498	0,446	7,613	1,833	32,442	0,419	7,789	1,877	31,074	2,162	32,210
7	2,167	30,114	0,514	7,480	2,263	32,341	0,483	7,986	1,927	30,732	2,076	31,537
8	1,892	30,852	0,572	7,548	1,978	32,602	0,485	7,979	2,000	30,827	2,339	31,714
9	2,228	30,930	0,485	7,611	1,956	32,997	0,414	7,939	2,144	31,057	2,552	32,189
10	1,701	30,310	0,505	7,464	1,828	32,969	0,430	7,990	1,941	31,283	2,184	32,239
11	2,189	31,065	0,474	7,501	2,054	32,885	0,503	8,007	2,047	30,972	2,253	32,421
12	1,832	32,633	0,559	6,491	2,030	34,485	0,460	5,442	2,363	33,444	2,280	34,422
13	1,719	34,179	0,433	7,699	2,108	34,334	0,456	7,136	1,670	34,956	1,682	33,177
Média	1,922	31,278	0,492	7,526	2,013	33,095	0,470	7,698	1,960	31,548	2,181	32,460
Desvio-padrão	0,200	1,554	0,051	0,348	0,1994	0,681	0,055	0,723	0,175	1,380	0,201	1,057
CV (%)	10,38	4,97	10,32	4,62	9,90	2,06	11,62	9,39	8,95	4,37	9,23	3,26

Através da análise dos resultados da Tabela 5.22, o método apresenta boa precisão intermédia para a análise dos vários analitos, uma vez que o *CV* é suficientemente baixo. Em qualquer um dos analitos, o valor de CV é maior no padrão de menor concentração (P1), o que pode representar uma consequência de ser utilizada uma pequena quantidade de analito, bem como um maior número de erros aleatórios associados ao seu processo de medição.

5.2.9. Exatidão

O parâmetro exatidão foi estimada através de ensaios de recuperação.

5.2.9.1. Testes de recuperação

Os testes de recuperação das amostras fortificadas permitem avaliar a exatidão do método analítico, constando essa informação na Tabela 5.23.

Tabela 5.23 – Dados obtidos nos testes de recuperação de amostras fortificadas.

	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
Média	102,5	98,9	105,2	98,3	105,9	106,8
Desvio-padrão	9,7	9,6	12,4	12,9	11,7	13,8
CV (%)	9,44	9,70	11,80	13,14	11,06	12,94

Através da análise da tabela anterior, e tendo em conta a Tabela 5.14, verifica-se que o método analítico apresenta boa exatidão, uma vez que os valores da percentagem de recuperação se encontram dentro dos critérios de aceitação estabelecidos, ou seja, entre 75% e 125%. Para além disso, a percentagem de CV obtida é consideravelmente baixa.

5.2.10. Robustez

Em técnicas cromatográficas as condições são sempre as mesmas, apenas tem sentido estudar a robustez do método com base no fator tempo, com o objetivo de verificar se este afeta ou não a exatidão e precisão do mesmo. Desta forma, recorre-se à ferramenta *ANOVA* fator único, tendo em conta os valores dos padrões externos de controlo da curva de calibração, do padrão de controlo do limite de quantificação e num padrão de calibração situado a meio da gama analítica. Na Tabela 5.24 encontram-se os resultados obtidos relativamente à robustez.

Tabela 5.24 – Resultados do teste *ANOVA* fator único.

	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
Valor teste F (TV)	0,009	0,341	0,015	0,355	0,017	0,052
Valor crítico F	4,066	4,757	4,066	4,757	4,066	4,066
pH ₀	0,999	0,797	0,997	0,788	0,997	0,983

Após a análise efetuada, observa-se que, em todos os casos, o valor teste de F é inferior ao valor crítico de F. Desta forma, pode-se concluir que o método é robusto, uma vez que a H₀ é aceite, não existindo efeito do fator tempo, comprovado pelo valor de prova que é superior a 0,05.

5.2.11. Coerência

A coerência foca-se na avaliação da capacidade de um método analítico conduzir ao mesmo valor estimado, sem qualquer alteração das condições experimentais. Dessa forma, o estudo da robustez permite evidenciar que o fator tempo não exerce qualquer efeito sobre os dados obtidos, refletindo assim a boa coerência dos resultados do método para qualquer um dos analitos em estudo. Tal pode ser ainda confirmado pela avaliação do CV (%) de cada padrão de controlo para cada analito (Tabela 5.25).

Tabela 5.25 – Avaliação da coerência do método analítico.

[Padrão controle 1] / (µg/L)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
Média	1,921	1,763	2,266	1,824	2,063	1,793
Desvio-padrão	0,277	0,117	0,508	0,243	0,276	0,341
CV (%)	14,43	6,66	22,42	13,30	13,40	19,02

[Padrão controle 2] / (µg/L)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
Média	6,158	5,753	6,312	5,616	6,712	5,408
Desvio-padrão	0,454	0,380	0,607	0,301	0,631	0,318
CV (%)	7,38	6,61	9,61	5,35	9,41	5,89

[Padrão controle 3] / (µg/L)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
Média	20,705	19,590	20,586	18,960	22,451	18,091
Desvio-padrão	0,956	0,713	0,945	0,933	1,549	3,191
CV (%)	4,62	3,64	4,59	4,92	6,90	17,64

Como o valor de CV (%) deve ser inferior a 10%, então efetivamente o método analítico apresenta boa coerência, sobretudo para os padrões de controle 2 e 3 que cumprem os requisitos estabelecidos. O padrão de controle 1 apresenta valores relativamente maiores, uma vez que se trata de um padrão de menor concentração.

5.2.12. Incerteza

A incerteza é provavelmente dos parâmetros que levanta maior desentendimento entre a comunidade analítica, visto que existem inúmeras formas de alcançar a sua determinação. Ainda assim, é dos critérios que confere maior confiança na validade do resultado obtido. Neste caso, a determinação da incerteza (Tabela 5.26) foi realizada com base na norma ISO 11352:2012, recorrendo a ensaios de recuperação e segundo as equações apresentadas na secção 2.4.

Tabela 5.26 – Avaliação da incerteza do método: incerteza associada à reprodutibilidade intralaboratorial (u_{R_w}), raiz quadrada da média dos desvios dos ensaios de recuperação (b_{rms}), incerteza associada ao efeito sistemático (u_b), incerteza na concentração do analito adicionado (u_{add}), incerteza padrão combinada (u_c) e incerteza expandida (U).

	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
u_{R_w} (%)	11,95	11,31	11,00	12,48	10,91	12,22
b_{rms}	9,10	9,72	12,20	12,36	11,35	12,94
u_b	9,09	9,73	12,20	12,36	11,35	12,94
u_{add}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00
u_c	15,02	14,91	16,42	17,57	15,74	17,80
U (%)	30,04	29,83	32,85	35,13	31,48	35,80

Após a observação da Tabela 5.26, os valores de incerteza expandida obtidos para cada um dos analitos são aceitáveis. Tal também se deve ao facto dos valores, em percentagem, de u_{R_w} e u_b serem inferiores a 25%, como descrito no DL n.º 306/2007. Ou seja, quer para a precisão quer para a exatidão, o valor de incertezas obtidas para cada um dos parâmetros deve ser inferior a 25%. Verifica-se ainda que o valor de u_{add} é tão pequeno que acaba por não influenciar significativamente o valor de u_b , podendo até ser considerado como desprezável.

5.2.13. Conservação de amostras

Uma fase muito importante que antecede a própria análise das amostras é a sua conservação, no que se refere ao prazo e aos conservantes, eventualmente, utilizados. É essencial que os conservantes usados não interfiram na amostra e que sejam concentrados, uma vez que assim a quantidade necessária para adicionar à amostra será inferior quando comparado com a quantidade necessária de um conservante diluído. No caso da análise de trihalometanos, tricloroetileno e tetracloroetileno o conservante utilizado é tiosulfato de sódio. Para além do uso de conservantes, a conservação também pode ser garantida em conjunto com a refrigeração a temperaturas adequadas.

Neste caso, o principal objetivo não passa pela avaliação do conservante utilizado, mas sim pela confirmação do prazo de conservação das amostras estimado. O ensaio para verificação da conservação realizado (Tabela 5.27) consiste na avaliação da concentração de cada analito no primeiro dia de colheita e após 14 dias de conservação das amostras, ou seja, pretende-se verificar se a concentração obtida ao fim de 14 dias de conservação é a mesma que a analisada no dia da colheita, considerando um desvio de 20%.

Tabela 5.27 – Avaliação do prazo de conservação das amostras.

Amostra I	Conc. / (µg/L)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
	1º dia	16,81	0,00	10,18	0,00	5,25	0,00
	14º dia	20,51	0,00	9,73	0,00	4,27	0,00
	Média	18,66	0,00	9,96	0,00	4,76	0,00
	Desvio (%)	19,81	-	4,47	-	20,53	-

Amostra II	Conc. / (µg/L)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
	1º dia	12,86	0,00	8,73	0,00	4,43	0,00
	14º dia	12,15	0,00	7,92	0,00	3,84	0,00
	Média	12,51	0,00	8,33	0,00	4,13	0,00
	Desvio (%)	5,64	-	9,78	-	14,18	-

Amostra III	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
	1º dia	12,07	0,00	7,18	0,00	4,15	0,00
	14º dia	12,90	0,00	7,64	0,00	3,82	0,00
	Média	12,48	0,00	7,41	0,00	3,99	0,00
	Desvio (%)	6,67	-	6,20	-	8,22	-

Amostra IV	Conc. / ($\mu\text{g/L}$)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
	1º dia	12,71	0,00	7,75	0,00	3,91	0,00
	14º dia	14,94	0,00	9,14	0,00	4,46	0,00
	Média	13,82	0,00	8,44	0,00	4,18	0,00
	Desvio (%)	16,15	-	16,46	-	13,11	-

Amostra V	Conc./ ($\mu\text{g/L}$)	Clorofórmio	TriCE	BDCM	TetraCE	DBCM	Bromofórmio
	1º dia	10,16	0,00	6,67	0,00	3,69	0,00
	14º dia	14,40	0,00	7,98	0,00	4,19	0,00
	Média	12,28	0,00	7,33	0,00	3,94	0,00
	Desvio (%)	34,51	-	17,81	-	12,74	-

Através da análise da Tabela 5.27, verifica-se que podem ser considerados 14 dias para o prazo de conservação das diferentes amostras, uma vez que, para os diferentes analitos em diferentes amostras, foram obtidos valores de desvios inferiores a 20%, com exceção de DBCM na amostra I e de clorofórmio na amostra V. A inexistência de valores para tricloroetileno, tetracloroetileno e bromofórmio deve-se ao facto destes analitos não terem sido detetados nas diferentes amostras.

Deste ensaio conclui-se que a quantidade de cada analito no dia da colheita é aproximadamente igual à quantidade encontrada ao fim de 14 dias de conservação.

Conclusão

O objetivo inicial centrou-se essencialmente na integração de atividades do Laboratório de Cromatografia da AEMITEQ, bem como o enquadramento com a documentação utilizada no laboratório, sobretudo a nível de controlo de qualidade, tal como com as competências desenvolvidas no manuseio de equipamentos e materiais ou reagentes de laboratório. Desta forma, mais tarde, a validação de métodos analíticos foi mais fácil e rápida.

A familiarização com diferentes técnicas analíticas foi um ponto muito importante para adquirir mais conhecimento sobre temas diversificados, embora o trabalho elaborado se foque na validação de métodos analíticos como: a determinação de OG e HDE por FTIR e a análise de THM, tricloroetileno e tetracloroetileno por GC-MS. Para além disso, o facto de se realizar a validação de duas técnicas tão distintas, permitiu o contato com diferentes tipos de águas: águas residuais e águas de consumo, respetivamente.

Neste caso, o cumprimento da legislação (D.L. n.º 306/2007) e o seguimento de normas (por exemplo, Norma ISO 17025) ou de métodos *standards* (5520-C) são um grande reflexo das boas práticas laboratoriais, bem como um excelente auxílio na realização de cada método, seja ele interno ou não.

A determinação de OG e HDE pela técnica de FTIR baseia-se num método interno, que resulta da análise do método 5520-C, sendo feita a substituição do solvente de extração (Freon-113 substituído por tetracloroetileno), obtendo bons resultados para a gama de trabalho definida. Já a determinação de THM, tricloroetileno e tetracloroetileno pela técnica de GC-MS é também realizada com sucesso, tendo em conta a readaptação de um procedimento de análise de GC-MS e a determinação de compostos orgânicos voláteis através de GC-ECD, pretendendo a quantificação destes analitos.

Um parâmetro comum entre as duas técnicas estudadas assenta na utilização de tetracloroetileno, em que em GC-MS é utilizado como um soluto e em FTIR é utilizado como um solvente, daí a necessária precaução a nível de contaminações. Ou seja, em GC-MS é determinada a quantidade de tetracloroetileno (bem como outros analitos) existente numa água de consumo e em FTIR é utilizado tetracloroetileno como solvente porque apresenta as melhores características para extrair o analito pretendido (OG e HDE) de águas residuais, visto que uma exibe grande imiscibilidade com os compostos orgânicos em questão.

Neste momento, a nível do âmbito da acreditação, ainda não foi conseguida a acreditação das técnicas estudadas. Contudo, mesmo num âmbito não acreditado, mas comprovado pela sua validação, tratam-se de técnicas que apresentam bons resultados e que permitem retirar claras ilações, o que confere fiabilidade nos métodos.

Realizada a validação dos diferentes métodos analíticos, o laboratório dever efetuar um controlo constante da sua execução, garantindo que as condições de validade destes métodos não são alteradas. Isto porque a ocorrência de manipulações suscetíveis de acumular erros é muito frequente, quer a nível de erros sistemáticos quer a nível de erros aleatórios, o que pode influenciar significativamente o resultado final.

Em termos pessoais, o estágio realizado na AEMITEQ revelou a oportunidade de desenvolver as minhas competências a nível laboratorial, adquirindo novos conhecimentos em diferentes áreas e permitindo alcançar desafios diários. Tudo isto deu origem a uma nova visão do mundo laboral, tendo em consideração o necessário rigor e organização de um laboratório.

Bibliografia

- [1] B. Barraqué, *As Políticas da Água na Europa*, 1995.
- [2] Direção Geral do Ambiente, Comissão Europeia, *A Directiva-Quadro da Água*, Luxemburgo: Serviço das Publicações Oficiais das Comunidades Europeias, 2002.
- [3] E. R. Alley, *Water Quality Control Handbook*, New York: McGraw-Hill Professional, 2000.
- [4] J. Pato, *História das políticas públicas de abastecimento e saneamento de águas em Portugal*, Lisboa: Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, 2011.
- [5] 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.
- [6] *Decreto-Lei n.º 306/2007*.
- [7] 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.
- [8] *Decreto-Lei n.º 243/2001*.
- [9] J. M. G. Jesus, *Qualidade do Serviço de Abastecimento de Água na Madeira*, Coimbra, 2009.
- [10] ÁguaGlobal – Internacionalização do Setor Português da Água, *Sector Português da Água*.
- [11] C. I. P. Coelho, *Controlo de Qualidade e Gestão Ambiental aplicados a uma Indústria Energética – PEGOP*, Coimbra, 2010.
- [12] Regulamento Geral de Acreditação (DRC001), IPAC, 2012.
- [13] Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração (ISO/IEC 17025:2005), International Standard Organization, 2010.
- [14] G. M. S. R. Valentini, *Validação de Métodos Analíticos*, 2007.
- [15] Guia interpretativo da NP EN ISO/IEC 17025: *Technical report*, Instituto Português de Acreditação, IPAC, 2012.
- [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 Relacre 13 – Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Lisboa: Relacre, 2000.

- [24] Guia para a acreditação de laboratórios químicos (OGC 002), IPAC, 2011.
- [25] *Water Quality – Guidance on analytical quality control for chemical and physicochemical water analysis* (ISO/TS 13530), International Standard Organization, 2009.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions (ISO 5725 - 1), International Standard Organization, 1994.
- [29] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (ISO 5725 - 2), International Standard Organization, 1994.
- [30] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parte 3: Intermediate measures of the precision of a standard measurement method (ISO 5725 - 3), International Standard Organization, 1994.
- [31] Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values (ISO 5725 - 6), International Standard Organization, 1994.
- [32] *Validation of Compendial Methods*, United States Pharmacopeia, 2006.
- [33] Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025 (OGC 001), IPAC, 2010.
- [34] Guia Relacre 3 – Validação de resultados em laboratórios químicos, Lisboa: Relacre, 1996.
- [35] Avaliação da incerteza da mediação em calibração (OGC 010), IPAC, 2015.
- [36] Handbook for calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, NORDTEST Technical Report 537, 2012.
- [37] Water Quality – Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data (ISO 11352), International Standard Organization, 2012.
- [38] J. M. Berg, J. L. Tymoczko e L. Stryer, *Bioquímica*, New York: W H Freeman, 2002.
- [39] J. McMurry, *Organic Chemistry*, Brooks Cole, 2012.
- [40] M. C. P. P. Oliveira, *Espectrofotometria no Infravermelho – por metodologia FTIR (Fourier Transform Infrared): Validação da análise do teor de ureia e de outros parâmetros de qualidade do leite*, Belo Horizonte: Escola Veterinária da UFMG, 2011.
- [41] D. Wishart, *Pharm570-IR Lecture #7 – Infrared Spectroscopy*, 2009.
- [42] B.H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Ltd., 2004.

- [43] R. M. Silverstein e F. X. Webster, *Identificação Espectrométrica de compostos orgânicos*, Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2000.
- [44] G. S. Nikolić, *Fourier Transforms – New Analytical Approaches and FTIR Strategies*. InTech, 2011.
- [45] J. Shamir, *Optical Systems and Processes*, Spie – The International Society of Optical Engineering, 1999.
- [46] D. D. Nolte, *Optical Interferometry for Biology and Medicine*, 2011.
- [47] B. C. Smith, *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, 2011.
- [48] A.F. Custódio, *Aplicação forense de espectroscopia de infravermelho na análise de toners pretos*, Universidade de Évora, 2011.
- [49] *Standard Methods for the Examination of Water and Waster*, American Public Health Association, Método 5520 – C, 2005.
- [50] C. Pinho, C. Mansilha, P. Gameiro, *Evaluation of the actual standard procedures for analysis of total extractable hydrocarbons in environmental water matrices*, Elsevier, 2011.
- [51] M. D. I. T. Ruiz, *A multivariate calibration approach for determination of petroleum hydrocarbons in water by means of IR spectroscopy*, Chemometrics, 2009.
- [52] A. L. P. Valente e F. Augusto, *Microextração por fase sólida*, Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas: Química Nova, 2000.
- [53] A. Alegria e I. J. de Sousa et. Al., *Tribalometanos – Análise da situação em Portugal*.
- [54] A. J. L. O. Pombeiro, *Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- [55] D.A. Skoog, West, F. J. Holler e S. T. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, Thomson, 2007.
- [56] D. A. Skoog, F. J. Holler e S. T. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, Brooks Cole, 2007.
- [57] N. Adam e G. Cooper, *Clake's Analytical Forensic Toxicology*, Londres, Chicago: Pharmaceutical Press, 2008.
- [58] H. Willard, L. Merritt e J. Dean, *Análise Instrumental*, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1974.
- [59] D. K. F. Fifeild, *Principles and Praticce of Analytical Chemistry*, Cambridge: Blackwell Science Ltd, 2000.
- [60] S. Ahuja e N. Jespersen, *Modern Instrumental Analysis in Comprhensive Analytical Chemistry*, Amsterdam: Elsevier, 2006.
- [61] D. C. Harris, *Quantitative Chemical Analysis*, W. H. Freeman, 2010.
- [62] J. M. A. Araújo, *Química de Alimentos: teoria e prática*, Viçosa: Editora UFV, 2004.
- [63] H. M. McNair e J. M. Miller, *Basic Gas Chromatography – Techniques in Analytical Chemistry*, 1997.

Anexos

Anexo A – Parâmetros avaliados em controlo de rotina (R1 ou R2) e controlo de inspeção (D.L. n.º 306/2007)

Frequência mínima de amostragem e de análise da água destinada para consumo humano fornecida por uma rede de distribuição, por fontanários, por um camião-cisterna ou fornecida para uma empresa da indústria alimentar

Tipos de controlo	Parâmetro	
Controlo de Rotina 1 (R1)	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	
	Bactérias coliformes	
	Desinfetante residual	
Controlo de Rotina 2 (R2)	Alumínio	Ferro
	Amónio	Manganês
	Número de colónias a 22°C	Nitratos
	Número de colónias a 37°C	Nitritos
	Condutividade	Oxidabilidade
	<i>Clostridium perfringens</i> , incluindo esporos	Cheiro
	Cor	Sabor
<i>pH</i>	Turvação	
Controlo de Inspeção	Antimónio	Merúrio
	Arsénio	Níquel
	Benzeno	HAP
	Benzo(a)pireno	Pesticidas individuais
	Boro	Pesticidas (total)
	Bromatos	Selénio
	Cádmio	Cloretos
	Cálcio	Tetracloroeteno e tricloroeteno
	Chumbo	Trihalometanos
	Cianetos	Sódio
	Cobre	Carbono orgânico total
	1,2 – dicloroetano	Sulfatos
	Dureza total	Cloreto de vinilo
	<i>Enterococos</i>	Epicloridrina
	Fluoretos	Acrilamida
Magnésio		

Anexo B – Tabelas: testes estatísticos

Valores críticos da **distribuição de Fisher – Snedcor unilateral** ($\alpha= 0,05$).

$\nu_1 \backslash \nu_2$	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** ($\alpha= 0,01$).

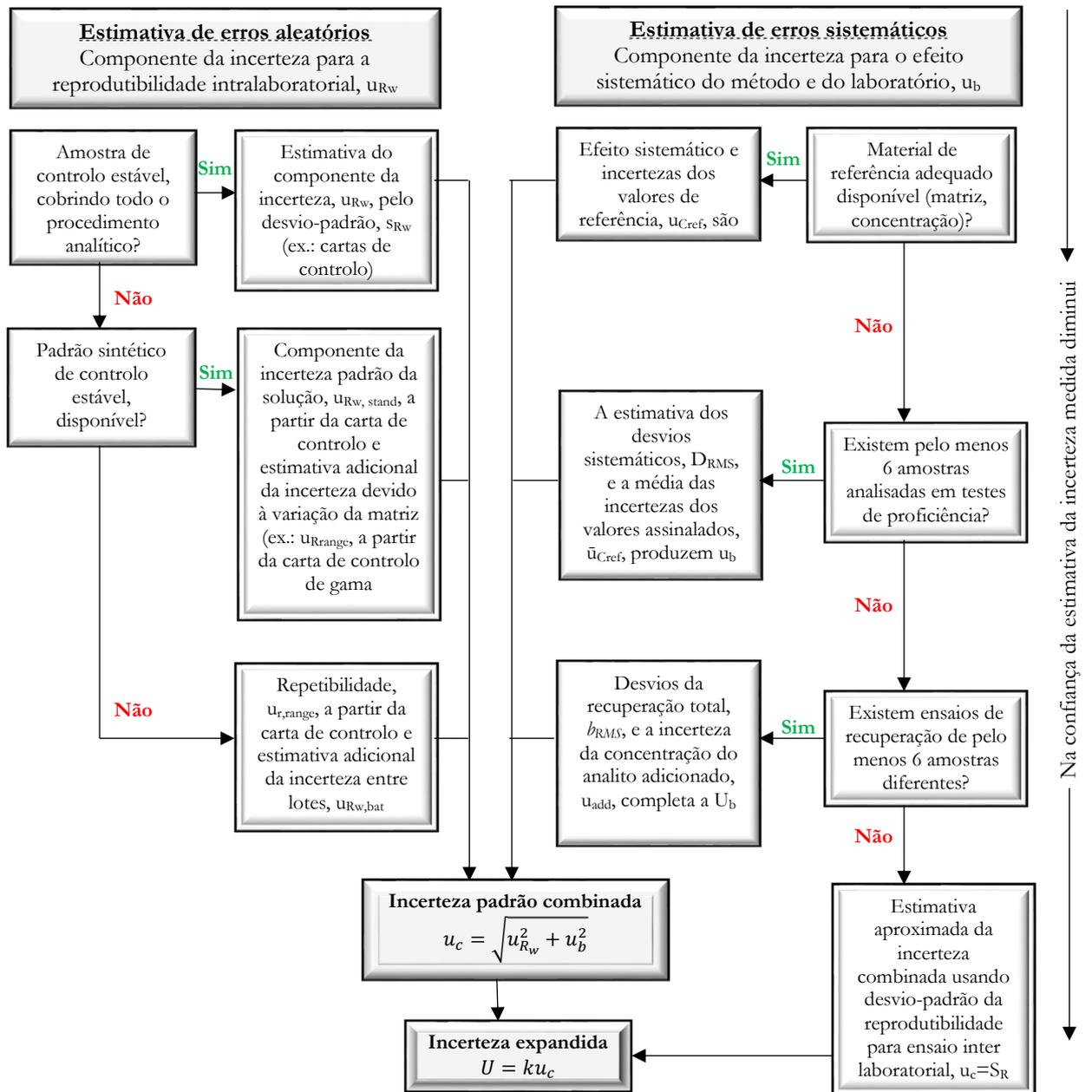
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	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

Valores críticos da **distribuição *t-student* bilateral**.

α					α					α				
ν	0.10	0.05	0.02	0.01	ν	0.10	0.05	0.02	0.01	ν	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

Os valores referentes à distribuição unilateral devem ser consultados através da coluna a 2α (por exemplo, teste a 5% de uma cauda $\rightarrow \alpha = 2 \times 0,05 = 0,10$).

Anexo C – Esquema do fluxo de decisão e do procedimento para a estimativa da incerteza medida



Anexo D – PCIE: Abundância relativa de cada analito em função do seu tempo de retenção, com respectivo espectro de massa (*Full scan*)

