



Sara Cristina Tavares Moreira

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE EM ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA

Mestrado em Química
Departamento de Química
FCTUC

Junho de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sara Cristina Tavares Moreira

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DE
MÉTODOS ANALÍTICOS EM
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÓMICA**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química

Doutora Ana Cristina Faria Ribeiro

Engenheiro Alain Lopes da Costa

Junho 2017

Universidade de Coimbra

Sabedoria para resolver, paciência para fazer.

– Homero –

Nada na vida é para ser temido, apenas sim para ser entendido.

– Marie Curie –

Agradecimentos

À minha orientadora do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, Doutora Ana Ribeiro, obrigada por me ter acolhido enquanto sua orientanda.

À Direção da ÆMITEQ, obrigada por me ter concedido a oportunidade de realizar o meu estágio curricular nas suas instalações.

À Clarisse Araújo, que embora formalmente não era minha orientadora foi com quem trabalhei diretamente nestes oito meses. Obrigada pela paciência, disponibilidade, ensinamentos, pela boa disposição no laboratório, e acima de tudo, pela amizade.

Às auxiliares do laboratório da ÆMITEQ, obrigada por ouvirem as minhas palavras, pela paciência e pela boa disposição.

À Carolina Carvalho, a melhor colega de casa de sempre. Como era bom saber que ao chegar a casa depois de um dia de trabalho estavas lá tu para me ouvir, quer tenha sido um bom ou mau dia de trabalho. Foste o meu grande apoio nestes meses. Muito obrigada pela paciência, por estares lá para mim quando eu precisava, por contribuíres para alguns parágrafos desta dissertação (certamente já és uma especialista em química por tudo o que já ouviste e leste), mas acima de tudo, estou eternamente agradecida ao destino por ter colocado alguém como tu na minha vida, uma excelente pessoa e amiga, que não esquecerei e que levo guardada no coração.

À Joana Teigão, obrigada por me teres acompanhado numa altura bastante crítica do meu percurso académico, obrigada por estes dois anos de mestrado (todas aquelas aulas só eram suportáveis porque estiveste sempre ao pé de mim!), obrigada pela tua amizade que sem dúvida levo comigo para a vida.

A todas as outras pessoas cujo caminho se cruzou com o meu nestes anos enquanto estudante e que fizeram dele um caminho com menos pedras, um obrigada.

E não menos importante, aos meus pais por todo o esforço que fizeram ao longo destes sete anos para tornar o meu sonho de estudar em Coimbra, uma realidade.

Índice

Resumo.....	i
Abstract	ii
Abreviaturas	iii
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1. Água	3
1.2. Legislação	4
1.3. Acreditação.....	5
1.4. Objetivo	6
Capítulo 2 – Validação de Métodos Analíticos.....	7
2.1. Avaliação Indireta	9
2.1.1. Especificidade e Seletividade	9
2.1.2. Quantificação	10
2.1.2.1. Curva de Calibração	10
2.1.2.2. Limiares Analíticos	13
2.1.2.3. Sensibilidade.....	15
2.1.3. Precisão.....	16
2.1.3.1. Repetibilidade.....	16
2.1.3.2. Reprodutibilidade	17
2.1.3.3. Precisão Intermédia	17
2.1.4. Robustez.....	18
2.1.5. Coerência	18
2.2. Avaliação Direta.....	18
2.2.1. Ensaio de Recuperação.....	18
2.2.2. Materiais de Referência Certificados.....	19
2.2.3. Ensaio Interlaboratorial	19
2.2.4. Metodologias para avaliação do desempenho	19
2.3. Controlo de Qualidade.....	20
2.3.1. Controlo de Qualidade Interno.....	21
2.3.1.1. Calibração Analítica.....	21
2.3.1.2. Brancos.....	21
2.3.1.3. Duplicados	22
2.3.1.4. Padrões de Controlo	22

2.3.1.5. Ensaio de Recuperação	23
2.3.1.6. Materiais de Referencia Internos.....	23
2.3.1.7. Cartas de Controlo	24
2.3.2. Controlo de Qualidade Externo	25
2.4. Estimativa da Incerteza	25
2.4.1. Quantificação da Incerteza associada à precisão (u_{R_w}).....	26
2.4.2. Quantificação da Incerteza associada à exatidão (u_b)	27
2.4.3. Incerteza Combinada (u_c) e Expandida (U)	28
Capítulo 3 – Análise de Metais por Espectrometria de Absorção Atómica	29
3.1. Metais	31
3.2. Espectrometria de Absorção Atómica	34
3.2.1. Atomização em Chama	37
3.2.2. Atomização em Câmara de Grafite	40
3.2.3. Interferências/Limitações.....	43
3.3. Materiais e Métodos	45
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	49
4.1. Estudo de Material Particulado	51
4.2. Especificidade e Seletividade.....	52
4.3. Gama Analítica e Linearidade.....	52
4.3.1. Gama Analítica – Homogeneidade de Variâncias	52
4.3.2. Linearidade – Teste de Mandel	54
4.4. Limiares Analíticos	56
4.4.1. Limite de Quantificação	56
4.4.2. Limite de Deteção	57
4.5. Sensibilidade.....	57
4.6. Precisão	60
4.6.1. Repetibilidade.....	63
4.6.2. Precisão Intermédia	64
4.7. Exatidão.....	65
4.8. Incerteza.....	68
Capítulo 5 - Conclusão	71
Bibliografia	75

Resumo

Para que a potabilidade da água não seja colocada em causa, tratando-se de um recurso essencial para a vida, é necessário que alguns parâmetros de qualidade sejam controlados. O Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto estabelece os requisitos obrigatórios de controlo de qualidade da água destinada ao consumo humano. Neste sentido, cabe aos laboratórios de análise o papel fundamental de assegurar o cumprimento destes requisitos. A AEMITEQ – Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, local onde foi desenvolvido o projeto desta dissertação, dispõe de laboratórios capazes de garantir o controlo de parâmetros químicos e físicos.

Os metais, quando solubilizados em água e em concentrações que excedem os limites definidos no Decreto-lei nº 306/2007, podem ter um efeito tóxico. A monitorização da concentração destes na água deve então ser feita de forma rigorosa, com recurso a métodos de análise fiáveis adaptados às características de cada composto.

Esta dissertação incidiu na implementação e validação de métodos analíticos para a quantificação de crómio, ferro, manganês, cobre e magnésio, exemplos de metais que podem apresentar um risco para a saúde se presentes em concentrações elevadas na água destinada ao consumo humano. O desenvolvimento de metodologias de quantificação foi realizado com recurso à Espectrometria de Absorção Atómica, uma técnica que se baseia na interação da luz ultravioleta ou visível com os átomos do elemento a ser analisado. Dada a elevada toxicidade do crómio, ferro e manganês e conseqüente perigosidade para a saúde, tendo em conta os valores paramétricos definidos no Decreto-Lei nº 306/2007, a validação de métodos de análise destes elementos foi realizada em Espectrometria de Absorção Atómica com atomização em câmara de grafite, técnica em que a deteção é possível na ordem dos microgramas por litro. Para os elementos cobre e magnésio, atendendo aos requisitos impostos, a validação foi realizada por Espectrometria de Absorção Atómica com atomização por chama, menos sensível e capaz de quantificar na ordem dos miligramas por litro.

Com este trabalho, o laboratório pretende solicitar a acreditação destes métodos ao Instituto Português de Acreditação, oferecendo ao cliente um maior leque de ensaios acreditados na área da Absorção Atómica.

Palavras – Chave: água; validação; metais; espectrometria de absorção atómica.

Abstract

In order to ensure that the potability of water is not put in question, as an essential resource for life, certain quality parameters must be controlled. Decree-Law No. 306/2007 of August 27th establishes the mandatory requirements for the quality control of the human consumption water. In this sense, ensure fulfill of these requirements is the fundamental role of the analytical laboratories. The AEMITEQ - Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade, where the project of this dissertation was developed, has laboratories able to guarantee the control of chemical and physical parameters.

Metals, when solubilized in water and in concentrations exceeding the limits defined in Decree-Law no. 306/2007, may have a toxic effect. The monitoring of their concentration in water must then be carried out rigorously, using reliable methods of analysis adapted to the characteristics of each compound.

This dissertation focused on the implementation and validation of analytical methods for the quantification of chromium, iron, manganese, copper and magnesium, examples of metals that may present a health risk if present in high concentrations in water intended for human consumption. The development of quantification methodologies was performed using Atomic Absorption Spectrometry, a technique that is based on the interaction of ultraviolet or visible light with the atoms of the element to be analyzed. Given the high toxicity of chromium, iron and manganese and consequent health risk, taking into account the parametric values defined in Decree-Law no. 306/2007, the validation of methods of analysis of these elements was carried out in Atomic Absorption Spectrometry with atomization in graphite chamber, technique in which the detection is possible in the order of micrograms per liter. For the elements copper and magnesium, taking into account the requirements imposed, the validation was performed by Atomic Absorption Spectrometry with flame atomization, less sensitive and able to quantify in the order of milligrams per liter.

With this work, the laboratory intends to request the accreditation of these methods to the Portuguese Accreditation Institute, offering the client a wider range of accredited tests in the area of Atomic Absorption.

Key – Words: water; validation; metals; atomic absorption spectrometry.

Abreviaturas

ÆMITEQ	Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade
b_{rms}	Raiz quadrada da média dos desvios dos ensaios de recuperação
CC	Concentração Característica
CQ	Controlo de Qualidade
CV	Coeficiente de variação
CVr	Coeficiente de variação de repetibilidade
DL	Decreto-Lei
EIL	Ensaio interlaboratoriais
EN	Norma Europeia
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ER	Erro Relativo
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
ETA	Estação de Tratamento de Água
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
FAAS	<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
F	Teste de <i>Fisher</i>
F_{crit}	Valor tabelado da distribuição F de <i>Fisher</i>
GFAAS	<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
GQ	Garantia da Qualidade
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IPQ	Instituto Português da Qualidade
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LAI	Limite de Aviso Inferior
LAS	Limite de Aviso Superior
LC	Limite Central
LCI	Limite de Controlo Inferior
LCO	Lâmpada de cátodo-oco
LCS	Limite de Controlo Superior
LD	Limite de Detecção
LDE	Lâmpada de Descarga de Eletrodos
LQ	Limite de Quantificação

MRC	Material de Referência Certificado
MRI	Material de Referência Interno
NP	Norma Portuguesa
P01	Polinómio de primeiro grau
P012	Polinómio de segundo grau
Ppb	Partes por bilião
Ppm	Partes por milhão
R	Coeficiente de correlação
R²	Coeficiente de determinação
u_{Rw}	Incerteza associada à precisão
SG	Sistema Gestão da Qualidade
STEW	<i>Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater</i>
VT	Valor Teste
U	Incerteza expandida
u_{add}	Incerteza na concentração do analito adicionado
u_b	Incerteza associada à exatidão
u_c	Incerteza combinada
UNT	Unidades Nefelométricas de Turbidez
Z	<i>z-score</i>

Capítulo 1

Introdução

1.1. Água

As primeiras formas de vida no planeta tiveram origem na água e mesmo ao fim de milhões de anos de evolução todas as espécies que habitam a Terra estão dependentes dela. Grande parte da superfície terrestre é ocupada por água, estimando-se um volume total de cerca de 1,41 bilhões m³.^[1] A Figura 1.1. apresenta um esquema representativo da percentagem de águas nos reservatórios naturais do planeta.

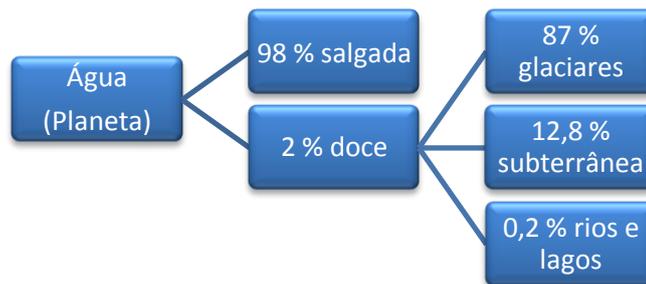


Figura 1.1 – Esquema alusivo à percentagem de água nos diferentes reservatórios do planeta.^[1]

O aumento da população mundial, que se projeta ser de aproximadamente 11 bilhões de habitantes em 2050, tem como grande consequência a escassez de recursos naturais.^[2] O aumento do consumo de água como consequência direta do aumento populacional pode colocar em risco a sustentabilidade da vida na Terra, uma vez que é um recurso finito e apenas 2% da sua totalidade é considerada potável. Com o crescimento demográfico vem o crescimento tecnológico e industrial, indispensáveis para a evolução da sociedade, por isso, não só o consumo mas também a qualidade da água é afetada (consequência indireta) – a descarga de produtos químicos tóxicos, a libertação de poluentes para a atmosfera a longo prazo e a contaminação de massas de água com substâncias que promovem o crescimento excessivo de algas, são algumas das principais causas de degradação da qualidade da água.^[3] É por isso essencial que sejam implementadas metodologias para tratamento e controlo da qualidade da água de modo a evitar contaminação dos recursos hídricos.

O conceito de “qualidade” da água é algo relativo e reflete características físicas, químicas e biológicas mensuráveis relativamente a um uso específico. Relativamente à água destinada para consumo humano, parâmetros como o sabor, cheiro, cor e presença de compostos orgânicos e inorgânicos em níveis que ponham em risco a saúde humana, são tidos como parâmetros indicadores da qualidade que devem ser analisados periodicamente em laboratórios especializados.^[4]

A AEMITEQ – Associação para a Inovação Tecnológica e Qualidade sediada em Coimbra é, desde 1991, uma entidade prestadora de serviços no âmbito da Química Analítica. Acreditada pelo IPQ (Instituto Português da Qualidade) em 2001, é especializada no controlo químico da qualidade, assegurando não só o controlo químico de matérias-primas e produtos mas também o controlo da qualidade de águas, prestando apoio às autarquias e empresas municipais no controlo de qualidade de águas de consumo e residuais e águas para recreio, bem como ao funcionamento de ETA's (Estações de Tratamento de Águas) e ETAR's (Estações de Tratamento de Águas e Resíduos).

1.2. Legislação

A rápida absorção pela água de substâncias naturais ou artificiais, produzidas pelo Homem, geralmente torna-a imprópria para consumo quando não sofre algum tratamento prévio. ^[5] Devido à importância que este bem essencial tem, é fundamental um controlo de qualidade rigoroso e em conformidade com normas legais, que garanta a sua potabilidade. Assim, a regulamentação de parâmetros de qualidade é estabelecida em Decretos-Lei.

O Decreto-Lei nº. 306/2007 de 27 de Agosto, que resulta da revisão do D.L. nº. 243/2001 de 5 de Setembro, estabelece o regime legal da qualidade da água destinada ao consumo humano. ^[6] Este decreto define as atribuições de competências das entidades gestoras dos sistemas de abastecimento público relativamente a:

- verificação das normas de qualidade da água/controlo (Artigo 10º.);
- parâmetros da qualidade da água a pesquisar e respetivas frequências (Artigos 11º., 12º. e Anexo II);
- circuitos de informação às entidades competentes e aos consumidores sobre os dados da qualidade da água, comunicação e tratamento de incumprimentos de valores paramétricos e divulgação dos resultados de ações corretivas desenvolvidas (Artigos 17º. e 18º.);
- garantia da melhoria contínua da qualidade da água fornecida, através da realização de programas de controlo operacional de todos os sistemas de distribuição (Artigo 22º.);
- tratamento da água destinada ao consumo humano (Artigo 9º.);
- utilização de materiais e produtos em contacto com a água (Artigo 21º.);
- critérios de aptidão dos laboratórios de ensaio (Capítulo V);
- elaboração, submissão à aprovação da Autoridade Competente (ERSAR) e implementação/execução do programa de amostragem e de análise a desenvolver, tendo em

vista a demonstração/verificação da conformidade da água distribuída com essas normas (Artigo 14º.), de acordo com os requisitos definidos no Anexo III.^[7] Estabelece também, no Anexo I, os valores paramétricos que a água destinada ao consumo humano deve respeitar – imposição legal que os laboratórios de análise devem ter em conta.

A ERSAR – Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos – regula e supervisiona os setores de abastecimento público de água às populações, de saneamento de águas residuais urbanas e de gestão de resíduos sólidos urbanos. Exerce funções de autoridade competente para a coordenação e a fiscalização do regime da qualidade da água para consumo humano, assegurando uma correta proteção dos utilizadores dos serviços de águas e resíduos, a fim de evitar possíveis abusos.^[8]

1.3. Acreditação

A acreditação consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efetuar atividades específicas de avaliação de conformidade, como por exemplo, ensaios, calibrações, certificações e inspeções.^[9] Em Portugal, o organismo nacional de acreditação nos termos do Regulamento (CE) nº 765/2008 é o Instituto Português de Acreditação (IPAC), que atua como agente regulador dos organismos de avaliação da conformidade, nomeadamente laboratórios de ensaio e calibração, organismos de inspeção e certificação.^[10] O IPAC tem como política adotar como critérios de acreditação os estabelecidos em normas. A norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 especifica os requisitos gerais de competência para realizar ensaios e/ou calibrações, incluindo a amostragem. Abrange os ensaios e as calibrações realizados segundo métodos normalizados, não normalizados e métodos desenvolvidos pelos próprios laboratórios e é aplicável a todos os laboratórios.^[11]

A acreditação pretende ser uma ferramenta que impõe uma melhoria contínua e um melhor desempenho nos processos, sendo também uma forma de estabelecer uma rede de reconhecimento de competências, no sentido em que um amplo conjunto de “clientes” reconhece a competência do “organismo avaliador” e por sua vez este reconhece a competência dos “laboratórios”.^[12]

O processo de acreditação, compreende uma fase de candidatura, com a abertura de um processo de candidatura junto ao Organismo Nacional de Acreditação, seguida de uma fase de avaliação e de decisão. O processo de acreditação fica concluído com a concessão da acreditação. Após a concessão da acreditação, o processo prossegue com a fase de manutenção

da acreditação, a qual inclui ações de acompanhamento e renovação. ^[10] A Figura 1.2 apresenta o fluxograma do processo de acreditação.

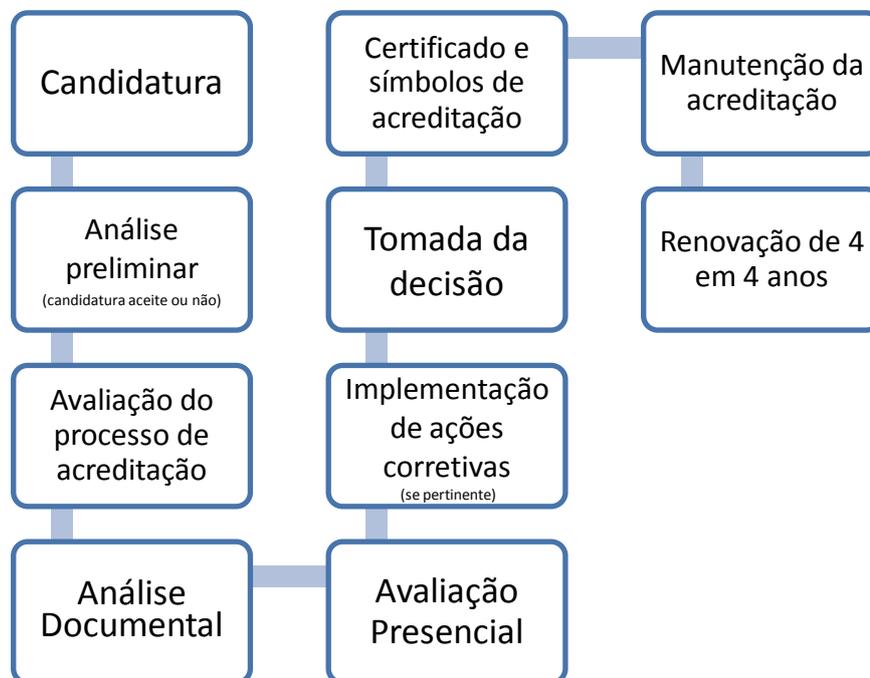


Figura 1.2 – Fluxograma do processo de acreditação. ^[10] ^[13]

1.4. Objetivo

A avaliação da qualidade da água que é consumida é de elevada importância para a saúde. A presença de compostos orgânicos e inorgânicos deve ser controlada pois, em determinadas quantidades, podem ter um efeito tóxico no organismo. Assim, devido ao grande impacto destes compostos, esta dissertação visa a implementação e a validação de métodos de análise quantitativa dos parâmetros crómio, ferro, manganês, cobre e magnésio, em águas destinadas ao consumo humano, por Espectrometria de Absorção Atómica com atomização por câmara de grafite e chama, com o intuito de, posteriormente, ser requerida ao IPAC a acreditação destes métodos.

Capítulo 2

Validação de Métodos Analíticos

O conceito de qualidade é algo abrangente pois pode ser definida de várias formas de acordo com a sua aplicabilidade: quando se refere à qualidade de um produto, serviço, da água que bebemos ou do ar que respiramos. Se para haver qualidade for necessário o cumprimento de determinadas condições/parâmetros, então ela deverá ser testada e comprovada por laboratórios analíticos acreditados que demonstram periodicamente o seu desempenho e prestação na mais correta análise e credibilidade dos resultados apresentados.

De forma a garantir a qualidade dos resultados fornecidos pelo laboratório, o método analítico utilizado para a aquisição desses mesmos resultados deverá ser alvo de um processo de validação. A validação de um método consiste na “confirmação, através de exame e apresentação de evidência objetiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização são cumpridos”.^[11] Implica que sejam estabelecidos os parâmetros de desempenho e limitações do método e identificação das interferências que podem alterar essas características.

A validação deve ser feita para métodos não-normalizados, métodos desenvolvidos internamente pelo laboratório, métodos normalizados utilizados fora do seu âmbito de utilização ou extensões, ou modificações de métodos normalizados, para confirmar se o método é adequado à utilização prevista.^[11]

O processo de validação do método pode ser dividido de acordo com dois tipos de avaliação, direta e indireta, o qual deve ser sempre sujeito a um controlo de qualidade, interno ou externo, e sempre que seja possível, a estimativa da incerteza associada a um resultado reportado deve ser determinada.

2.1. Avaliação Indireta

Este tipo de validação é executada através da determinação e evidência das características do método bem como pelo estudo dos parâmetros de desempenho – especificidade/seletividade, gama de trabalho e linearidade da curva de calibração, limiares analíticos, sensibilidade e precisão.

2.1.1. Especificidade e Seletividade

Os parâmetros seletividade e especificidade, muitas vezes considerados sinónimos, permitem-nos compreender se existem interferentes na matriz a ser analisada que possam adulterar os resultados da medição.

A especificidade define-se como a capacidade do método detetar o analito de interesse relativamente a outras substâncias, ou seja, oferece garantia de que a grandeza medida provém apenas do analito. ^[14]

A seletividade do método define-se como a capacidade deste identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes. ^[15] Para avaliar as possíveis interferências podemos seguir uma das três seguintes vias – realizar diluições múltiplas das amostras e verificar se há concordância nos resultados; analisar uma série de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de analito ao longo de toda a gama de trabalho e verificar se as recuperações obtidas estão de acordo com os critérios de aceitação do laboratório para esse método (amostras analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade); analisar padrões puros aos quais se adicionam quantidades conhecidas de possíveis interferentes, e comparar os valores medidos em cada caso.

2.1.2. Quantificação

Para que se possa interpretar as informações obtidas nos estudos e ensaios efetuados, podemos recorrer ao cálculo de alguns parâmetros, tais como, curva de calibração, limiares analíticos e sensibilidade.

2.1.2.1. Curva de Calibração

Entende-se por calibração de um método analítico a relação entre a resposta de um sistema analítico com a concentração ou quantidade conhecida de uma substância. Esta relação é apresentada por meio de um gráfico de dispersão XY – curva de calibração – que pode representar uma função polinomial de primeiro grau (reta) ou uma função polinomial de segundo grau (hipérbole). ^[15]

Antes de se poder iniciar a calibração de um método analítico, é necessário definir a gama de trabalho na qual vai ser efetuada a análise. A gama de trabalho é o intervalo entre a concentração mais baixa e mais alta, no qual o analito pode ser determinado experimentalmente com precisão e exatidão. A escolha da gama de trabalho deverá ter em conta a zona de concentrações que se espera encontrar nas amostras em análise, bem como deverá garantir que exista homogeneidade na variância associada aos valores medidos experimentalmente. Assim, recomenda-se a norma ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau. ^[15]

O **Teste de Homogeneidade de Variâncias** permite avaliar a gama analítica, caso a metodologia envolva uma curva de calibração. Segundo a ISO 8466-1^[16], são recomendados 10 pontos de calibração e efetuadas 10 leituras para o padrão de calibração de menor concentração, x_1 , e para o de maior concentração, x_N . As variâncias S_i^2 associadas a estes padrões, S_1^2 e S_N^2 , são dadas por:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (2.1)$$

sendo,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{ij}}{n_i} \quad (2.2)$$

onde,

i – número do padrão (de 1 a 10);

n – número de ensaios efetuados por padrão;

j – número de repetições efetuadas para cada padrão.

Para verificar se existe diferença estatística nas variâncias, é utilizado o teste F unilateral:

$$VT = \frac{S_N^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_N^2 > S_1^2 \quad (2.3)$$

$$VT = \frac{S_1^2}{S_N^2}, \text{ quando } S_N^2 < S_1^2 \quad (2.4)$$

Comparando o valor teste **VT** com o valor tabelado da distribuição F de *Fischer*, para **n-1** graus de liberdade,

- **VT ≤ F_{crit}**: a diferença nas variâncias não é significativa e a gama de trabalho está bem ajustada;
- **VT > F_{crit}**: a diferença entre as duas variâncias é significativa e a gama de trabalho de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias deixe de ter significado.

Após a seleção da gama de trabalho adequada, procede-se à calibração, para a qual é necessária a preparação de um mínimo de cinco padrões de calibração, de concentração de

analito conhecida, distribuídos equitativamente pela gama de trabalho, não incluindo o branco. A calibração deve ser efetuada no início da sessão de análise, devendo existir critérios definidos internamente pelo laboratório para aceitação da curva de calibração, nomeadamente, relativos à linearidade e estabilidade entre calibrações. ^[15]

Um parâmetro de desempenho do método que deve ser analisado é a linearidade, que se define como o intervalo de concentrações da gama de trabalho na qual a resposta é diretamente proporcional. Esta pode ser avaliada através de uma, ou ambas, as ferramentas:

♦ **Coeficiente de correlação da curva**

Obtido pela representação gráfica da curva de calibração, o **coeficiente de correlação (R)** permite-nos estabelecer o grau de dependência da resposta com a concentração. Este pode tomar valores entre -1 e 1, sendo que R=-1 representa uma correlação negativa (reta de declive negativo) e R=1 representa uma correlação positiva (reta de declive positivo). No entanto, se for utilizada esta ferramenta, o resultado deverá ser bem interpretado, pois o coeficiente de correlação é um bom indicador de correlação, mas não necessariamente de linearidade. ^[15] Assim, deve ser utilizado o **coeficiente de determinação (R²)**, que traduz a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais, para verificar a linearidade do método.

♦ **Teste de Mandel**

Com o Teste de *Mandel*, a avaliação da linearidade é feita estatisticamente, de acordo com a norma ISO 8466 -1 – a função de calibração linear, bem como os respetivos desvios-padrão residuais $S_{y/x}$ e S_{y^2} , são calculados a partir de um conjunto de pares ordenados (resposta vs concentração). A diferença das variâncias é calculada da seguinte forma:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y/x}^2 - (N - 3)S_{y^2}^2 \quad (2.5)$$

em que N corresponde ao número de padrões de calibração.

O valor teste (VT) é calculado da seguinte forma:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad (2.6)$$

Para obtermos uma resposta sobre a linearidade do método, o valor teste obtido é comparado com o valor tabelado para a distribuição F de *Fischer*:

- **VT ≤ F_{crit}**: a função calibração é linear;
- **VT > F_{crit}**: a função de calibração não é linear, devendo colocar-se a hipótese de reduzir a gama de trabalho ou, caso se justifique, ajustar com uma função de calibração não-linear (ISO 8466 – 2 ^[17]).

2.1.2.2. Limiares Analíticos

Os limiares analíticos, limite de deteção e limite de quantificação, são parâmetros de desempenho importantes de determinar, uma vez que permitem ao analista saber qual a concentração mais baixa que pode ser detetada e quantificada, respetivamente.

Dado que se referem à variável medida, as diluições efetuadas nas amostras terão de ser consideradas, e uma vez que dependem de vários fatores que variam no tempo (contaminações, tipo de amostra, equipamento, operador, etc.), devem ser reavaliados sempre que haja variação de equipamento, pessoal, critérios, quando se trabalha numa gama baixa de concentração. ^[18]

♦ Limite de deteção

O limite de deteção de um procedimento analítico é definido como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato, isto é, corresponde ao valor de concentração mais baixo em que o sinal da amostra pode ser distinguido do sinal do branco, com uma certa confiança estatística e, como tal, indicar se o analito está ou não presente. ^[19]

Para um correta definição do limite de deteção, é necessária a introdução de dois conceitos estatísticos importantes, o erro tipo I e o erro tipo II:

- erro tipo I (risco α): probabilidade de afirmar a presença do analito na amostra, quando de facto, este não está presente;

- erro tipo II (risco β): probabilidade de afirmar que o analito está ausente da amostra, quando de facto, ele está presente.

Para que a análise do limiar analítico seja feita da forma o mais correta possível, estes dois tipos de erros devem ser minimizados considerando $\alpha=\beta=5\%$.

O limite de deteção pode ser determinado de três formas:

- para o caso geral

$$LD = x_0 + ks_0 \quad (2.7)$$

em que x_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões de vestígio (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho e s_0 representa o desvio padrão associado a x_0 .

Caso se trate de uma distribuição normal de erros (gaussiana) e 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%.

- para o caso que envolve calibração linear

$$LD = \frac{[3,3 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (2.8)$$

em que $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da mesma.^[15]

♦ Limite de Quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser determinado quantitativamente com determinada precisão e exatidão, isto é, é o valor mínimo de concentração que marca a fronteira entre a zona de deteção qualitativa (cujo início é definido pelo LD) e as medições quantitativas (Figura 2.1).^[19]

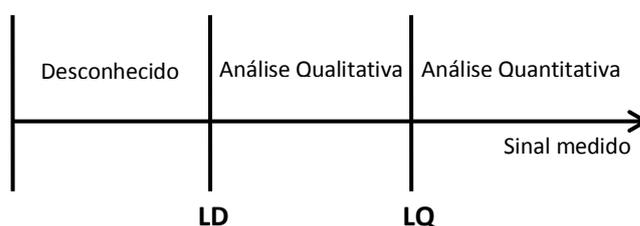


Figura 2.1 – Principais zonas analíticas.

O limite de quantificação pode ser determinado de três formas:

- para o caso geral

$$LQ = x_0 + 10s_0 \quad (2.9)$$

em que x_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários de vários dias de trabalho e s_0 representa o desvio padrão associado a x_0 .

- para o caso da utilização do padrão vestígio ou branco fortificado

São realizados estudos de exatidão e precisão (erro relativo em relação ao padrão vestígio e coeficiente de variação, respetivamente), sobre um conjunto de padrões vestígio ou brancos fortificados, em condições de precisão intermédia. A concentração utilizada é aceite como limite de quantificação, desde que os parâmetros acima referidos estejam em níveis aceitáveis (por exemplo, inferiores ou iguais a 10%).

- para o caso em que o método envolve calibração linear

$$LQ = \frac{[10 \cdot S_{y/x}]}{b} \quad (2.10)$$

em que $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e b é o declive da mesma.^[15]

2.1.2.3. Sensibilidade

A sensibilidade de um método (ou equipamento) entende-se como a capacidade deste em distinguir pequenas variações na concentração de analito. Para métodos que envolvam curva de calibração, a sensibilidade é definida como a derivada de primeira ordem da curva de calibração, e se esta for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive (m) da reta de calibração:

$$\text{Sensibilidade } (m) = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (2.11)$$

tal que ΔL é a variação do valor do sinal lido e ΔC a variação da concentração que levou à variação de sinal.

Se a curva de calibração for definida por uma função quadrática do tipo

$$y = cx^2 + dx + e \quad (2.12)$$

então a sensibilidade é dada pela derivada dessa função.^[15]

2.1.3. Precisão

A precisão é uma medida de proximidade entre várias réplicas de uma mesma amostra, ou seja, mede a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, dependente de erros aleatórios.^{[15] [20]}

É normalmente expressa como desvio-padrão (s),

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.13)$$

ou coeficiente de variação (CV),

$$CV \% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.14)$$

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

A precisão de um método pode ser determinada sob condições de repetibilidade, reprodutibilidade e precisão intermédia.

2.1.3.1. Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão do método quando são efetuados ensaios sobre a mesma amostra nas mesmas condições, como por exemplo, mesmo analista, laboratório, equipamento, mesmo tipo de reagentes e curto intervalo de tempo.

A repetibilidade pode ser determinada através de ensaios interlaboratoriais ou intralaboratoriais sendo que, para este último caso, são efetuadas no mínimo 10 medições sobre a mesma amostra, em que as condições não são alteradas.

O limite de repetibilidade, Δr , é o valor máximo admitido para a diferença absoluta entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade, determinado para um nível de confiança de 95 %, que é dado pela seguinte equação:

$$\Delta r = \sqrt{2} \times t_{0,05(m-1)}^b \times S_r \quad (2.15)$$

em que $t_{0,05(m-1)}^b$ é o valor crítico da distribuição de *t-student*, com $m-1$ graus de liberdade e nível de significância de 0,05, m é o número de réplicas e S_r o desvio-padrão das réplicas.

O coeficiente de variação de repetibilidade, CV_r , é igualmente importante de determinar, pela seguinte equação:

$$CV_r(\%) = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.16)$$

em que S_{ri} é o desvio-padrão de repetibilidade e \bar{x} é a média dos resultados obtidos.

2.1.3.2. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é uma medida de expressão da precisão de um método quando, sobre uma mesma amostra e utilizando o mesmo método, são alteradas as condições de medição, isto é, diferentes analistas, laboratórios e equipamentos. Assim, a reprodutibilidade apenas pode ser determinada com recurso a ensaios interlaboratoriais.

Quando a intenção passa pela validação de um método num laboratório de análises, a determinação deste parâmetro de desempenho do método não é de relativa importância, uma vez que o método será usado internamente, com o mesmo equipamento e em condições quase inalteradas. Caso a validação se devesse à implementação de um novo método de análise, a determinação da reprodutibilidade era de grande importância, pelo facto de ser necessário testar a precisão do método em diferentes condições.

2.1.3.3. Precisão Intermédia

A precisão intermédia, considerada como a mais representativa da variabilidade dos resultados e por isso a mais aconselhável de usar, refere-se à avaliação da precisão sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas em que se define exatamente as condições a variar (uma ou mais): diferentes analistas, equipamentos ou épocas.^[15]

A determinação deste parâmetro, baseada na dispersão entre ensaios, é feita com recurso a cartas de controlo de amplitudes, quando se realizam n ensaios sobre t amostras ou padrões, de acordo com a seguinte equação:

$$S_i = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2} \quad (2.17)$$

em que, S_i corresponde ao desvio padrão de precisão intermédia em determinadas condições, t ao número de amostras ensaiadas, n ao número de ensaios efetuados por amostra, j ao número da amostra (que vai de 1 a t amostras), k ao número do resultado obtido para a amostra j (que vai de 1 a n), y_{jk} ao resultado individual (k) para a amostra j de 1 a t e \bar{y}_j a média aritmética dos resultados da amostra j de 1 a t . Recomenda-se que o valor de $t(n-1)$ seja pelo menos igual a 15. ^[15]

2.1.4. Robustez

A robustez de um método analítico é dada pela capacidade do método em manter inalterado o resultado analítico face a pequenas mudanças que possam ocorrer quando o método está a ser executado. Pode-se afirmar que quanto mais robusto é um método, maior a confiança desse relativamente à sua precisão.

2.1.5. Coerência

A coerência de um método refere-se à habilidade deste em conduzir sempre ao mesmo resultado, quando se usa o mesmo método sobre a mesma amostra – ou seja, quando os resultados são auto-concordantes.

2.2. Avaliação Direta

A avaliação direta permite determinar a **exatidão** do método analítico. É uma medida de aproximação entre o resultado obtido experimentalmente e o valor de referência aceite como verdadeiro. Pode ser determinada de várias formas, entre as quais, recorrendo a ensaios de recuperação, materiais de referência certificados e ensaios interlaboratoriais.

2.2.1. Ensaios de Recuperação

Um ensaio de recuperação/fortificação consiste na análise de amostras ou brancos aos quais foi adicionada uma concentração conhecida de analito, proveniente de um padrão certificado ou de uma solução de fortificação preparada internamente, mas independente da

utilizada para a calibração – pode ser efetuada quando não é possível a obtenção de um MRC com a mesma matriz das amostras a que se aplica o ensaio.

2.2.2. Materiais de Referência Certificados

Um Material de Referência Certificado (MRC) é um material ou substância, com uma ou mais propriedades suficientemente bem estabelecidas, certificadas por um processo tecnicamente válido, para ser usado na calibração de um equipamento ou avaliação de um método de medida e que se faz acompanhar de um certificado emitido pela entidade certificadora – possui uma determinada grandeza (por exemplo, concentração) para cada parâmetro com uma incerteza associada a esse valor.^[21]

A aquisição deste material terá de ser feita a um organismo reconhecido e credível, e se for usado corretamente, a sua análise permite avaliar o desempenho do laboratório nas determinações dos parâmetros certificados – não devem então ser usados para realizar curvas de calibração, mas sim para a sua verificação periódica. Para determinar o erro e a exatidão da análise, o valor obtido aquando a análise com um MRC, deve ser comparado com o valor certificado.

2.2.3. Ensaio Interlaboratoriais

Um ensaio interlaboratorial (EIL) é definido como a realização e avaliação de ensaios de um mesmo analito por dois ou mais laboratórios diferentes. Podem ser de cinco tipos:

- Ensaio de aptidão ou competência: determina o desempenho do analista ou laboratórios;
- Ensaio colaborativo: determina as características para a realização de um método de análise;
- Ensaio comparativo: compara os resultados obtidos por vários métodos de análise;
- Ensaio de conformidade: determina o valor a utilizar como “valor verdadeiro”;
- Ensaio de certificação: fixa o “valor verdadeiro” de um material com uma determinada incerteza.^[22]

2.2.4. Metodologias para avaliação de desempenho

Os resultados obtidos da análise de um MRC podem ser avaliados, entre outras, pela seguinte ferramenta de diagnóstico de desempenho:

♦ Erro Relativo

A presença de erros sistemáticos no método analítico é expressa pelo erro relativo, que é calculado com recurso à seguinte equação:

$$ER(\%) = \frac{x - \mu}{\mu} \times 100 \quad (2.18)$$

sendo que x corresponde ao valor obtido experimentalmente e μ ao valor aceite com verdadeiro, ou seja, ao valor certificado do MRC.

Um valor superior ou igual a 5% em alguns casos pode ser satisfatório, no entanto, cabe ao laboratório definir qual o grau de exigência em termos de exatidão do método em estudo, sendo por isso este valor meramente indicativo.^[15]

O desempenho obtido pelo laboratório num ensaio interlaboratorial pode ser determinado utilizando a seguinte ferramenta:

♦ Fator de Desempenho (*z-score*)

$$Z = \frac{(x - \mu)}{S} \quad (2.19)$$

tal que x é o valor obtido pelo laboratório, μ é o valor certificado do MRC e S é o desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou ainda outra unidade de desvio interna.^[15]

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

$|Z| \leq 1$: bom desempenho

$|Z| \leq 2$: desempenho satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: desempenho questionável

$|Z| > 3$: mau desempenho

2.3. Controlo de Qualidade

De modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm, o laboratório deverá exercer um controlo da sua execução, adotando um conjunto de técnicas e atividades de carácter operacional de acordo com a complexidade e dificuldade do método e com as fontes de erro que se pretendem controlar.^[21]

Qualquer análise química está sujeita a erro, pelo que é essencial minimizar (Garantia da Qualidade – GQ) e controlar (Controlo de Qualidade – CQ) a sua ocorrência de modo a garantir e melhorar a eficácia do Sistema de Gestão da Qualidade (SG) adotado. Sendo objetivo do SG garantir e controlar a qualidade dos resultados diários, é necessária a avaliação periódica da exatidão dos resultados, recorrendo ao CQ interno e externo.^[18]

2.3.1. Controlo de Qualidade Interno

O controlo da qualidade interno usado em rotina, permite evidenciar a variabilidade (precisão) dos resultados ao longo do tempo, cuja periodicidade deve estar de acordo com o tipo de amostras e análises efetuadas.

2.3.1.1. Calibração Analítica

A calibração analítica é feita com recurso à análise de padrões de calibração, cujo resultado é representado graficamente por uma reta ou parábola. Pela análise de regressão adequada, regressão linear ou não-linear, obtemos a função de calibração que descreve a correlação entre a variável independente (x) – concentração - e a variável dependente (y) – valor medido.

♦ Regressão Linear

A reta que melhor se ajusta aos pontos obtidos é determinada pelo método dos mínimos desvios quadrados e é dada por:

$$y = mx + b \quad (2.20)$$

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

A reta diz-se ajustada quando o coeficiente de correlação apresenta valor o mais próximo possível de 1 (maior que 0,995) e todos os desvios-padrão residuais são inferiores a 6%.

2.3.1.2. Brancos

Um branco contém todos os reagentes da análise, exceto o analito que se pretende quantificar. A análise de brancos auxilia o analista na deteção de eventuais contaminações provenientes do material, reagentes, entre outros, e é fundamental quando se quantifica na gama de baixas concentrações. Esta técnica deve ser reforçada caso o laboratório varie de reagentes, materiais de lavagem, ou outras fontes suscetíveis de introduzir contaminações.^[18]

Associado ao controlo de brancos está a verificação do limite de quantificação, cuja frequência deve aumentar com a proximidade da gama baixa e a probabilidade de contaminações.^[18] De ter em consideração, que o sinal do branco não pode ser superior ao limite de deteção.

2.3.1.3. Duplicados

Uma análise é considerada em duplicado quando a mesma amostra é analisada separadamente em duas alíquotas, ou seja, quando são obtidas duas leituras separadas da mesma amostra e não quando são efetuadas duas leituras sobre a mesma alíquota de amostra, uma vez que seriam consideradas réplicas. O desvio entre duplicados pode ser determinado da seguinte forma:

$$\text{Desvio duplicado (\%)} = \frac{C_{amostra} - C_{duplicado}}{\bar{C}} \times 100 \quad (2.21)$$

em que $C_{amostra}$ corresponde à concentração da amostra, $C_{duplicado}$ à concentração da amostra em duplicado e \bar{C} à média das concentrações.

O recurso a esta ferramenta, por si só, não garante um erro mais baixo no resultado final (maior exatidão) isto porque se o resultado da análise estiver a ser desviado devido a um erro sistemático, ambos os duplicados estarão afetados. Caso ocorra um erro acidental em apenas um dos duplicados, então o valor médio terá um menor erro associado. Neste sentido, o controlo de duplicados deverá ser feito apenas com o intuito de detetar erros acidentais e de controlo de repetibilidade; deverá corresponder a cerca de 5-10 % do total de análises.^[21]

2.3.1.4. Padrões de Controlo

A utilização de padrões de controlo numa sessão de trabalho em que seja efetuada calibração permite assegurar o controlo de qualidade do método, avaliando a exatidão, precisão e variabilidade do método. Eles devem ser preparados por diluição a partir de soluções-mãe distintas das utilizadas para os padrões de calibração, tendo a garantia de que é rastreável a um material/padrão de referência, que por sua vez tenha sido calibrado com um MRC.^[23] Devem ser armazenados num local seco e protegido da luz, a fim de diminuir a taxa de degradação, contaminação ou perdas por evaporação, de forma a garantir uma pureza e estabilidade compatíveis com a qualidade exigida aos resultados.^{[18] [23]}

O desvio relativo para os padrões de controlo é determinado da seguinte forma:

$$ER (\%) = \frac{C_{obtida} - C_{referência}}{C_{referência}} \times 100 \quad (2.22)$$

em que C_{obtida} é a concentração obtida na leitura do padrão de controlo e $C_{referência}$ é a concentração do padrão de controlo utilizado.

Em cada análise deve ser feita a leitura de um ou mais padrões de controlo cuja concentração terá de ser idêntica ao correspondente padrão de calibração.

2.3.1.5. Ensaio de Recuperação

A percentagem de recuperação obtida nos ensaios traduz a exatidão do método, e é calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{AF} - C_A}{C_F} \times 100 \quad (2.23)$$

onde C_{AF} é a concentração de analito na amostra fortificada, C_A é a concentração de analito na amostra e C_F é a concentração de fortificação.

Esta equação aplica-se no caso de a adição do padrão ser inferior ou igual a 1% do volume da amostra, ou seja, pode ser desprezada; caso não seja, será necessário considerar a respetiva diluição, e considerar a seguinte equação:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{C_{AF} - C_A \times F_D}{C_F} \times 100 \quad (2.24)$$

em que F_D corresponde ao fator de diluição que a amostra sofre pela adição da fortificação.

O critério de aceitação definido para ensaios de recuperação depende do analito a ser analisado, no entanto, considera-se aceitável uma percentagem de recuperação entre 80 e 120 %.

2.3.1.6. Materiais de Referência Internos

Os Materiais de Referência Internos (MRI) permitem controlar a precisão ao longo do tempo, bem como a exatidão, caso tenham sido calibrados com MRC. Devem ter uma composição o mais semelhante possível com a amostra a analisar e estabilidade tal que permita

o controlo da variabilidade a longo prazo. Podem ser utilizados como MRI amostras de controlo, padrões de matriz ajustada com a das amostra, padrões semelhantes (mas independentes da calibração) e/ou remanescentes de amostras de ensaios interlaboratoriais.^[18]

2.3.1.7. Cartas de Controlo

As cartas de controlo são vistas internacionalmente como um dos meios mais eficientes para exercer e visualizar um controlo contínuo sobre os resultados produzidos, bem como para detetar erros, através de uma representação gráfica.^[21]

Representam de forma eficiente os resultados obtidos resultantes das ações de controlo de qualidade, pelo que podem ser registados os resultados obtidos na análise de MRI, brancos, padrões de calibração, desvios entre duplicado, recuperações de adições, entre outros.^[18] De acordo com o tipo de ação que se pretende controlar, um dos três tipos de cartas pode ser usado:

- Controlo de Amplitudes, em que monitoriza a diferença ou amplitude de valores observada para ensaios repetidos;
- Controlo de Somas Cumulativas, em que se representa o somatório de desvios observados relativamente ao valor esperado;
- Controlo de Indivíduos, em que se representa a variação no tempo de um parâmetro selecionado.^[21]

Uma carta de controlo é constituída por um conjunto de linhas que determinam se um processo está ou não controlado: as **linhas de controlo superior e inferior** (LCS e LCI), que correspondem aos extremos da carta estabelecidos a uma confiança de 99 %, as **linhas de aviso superior e inferior** (LAS e LAI) estabelecidas a uma confiança de 95 % e que nos alertam para a entrada numa zona de perigo e a **linha central** (LC) que indica o valor mais provável, isto é, a média das leituras efetuadas. Estatisticamente, são definidas como:

$$\text{Linha de Controlo Superior: } \bar{x} + 3s \quad (2.25)$$

$$\text{Linha de Aviso Superior: } \bar{x} + 2s \quad (2.26)$$

$$\text{Linha Central: } \bar{x} \quad (2.27)$$

$$\text{Linha de Aviso Inferior: } \bar{x} - 2s \quad (2.28)$$

$$\text{Linha de Controlo Inferior: } \bar{x} - 3s \quad (2.29)$$

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

2.3.2. Controlo de Qualidade Externo

O controlo de qualidade externo, que garante a exatidão dos resultados, deve ser estabelecido em função da complexidade dos ensaios, da sua frequência e experiência do laboratório, recomendando-se a participação em ensaios interlaboratoriais e o uso de Materiais de Referência Certificados. Na sua ausência, o laboratório poderá efetuar o cruzamento de métodos, preferencialmente com um de referência e utilizar ensaios de recuperação.

2.4. Estimativa da Incerteza

De acordo com a norma ISO 17025:2005 (ponto 5.4.6), um laboratório de calibração, ou um laboratório de ensaio que efetua as suas próprias calibrações, deve ter e aplicar um procedimento para estimar a incerteza na medição de todas as calibrações e de todos os tipos de calibração.^[11]

A estimativa da incerteza na medição fornece informação sobre o quão grande é o erro a que os resultados estão sujeitos e é definida segundo o *Guia para a Expressão da incerteza na medição* como um “parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam ser razoavelmente atribuídos ao mensurado”.^[24]

A incerteza de uma medição deve ser tida em conta uma vez que assegura que os resultados são adequados ao propósito e rastreáveis aos padrões nacionais ou internacionais, e permite ainda a comparação de resultados entre laboratórios e/ ou especificações, tolerâncias legais ou limites regulatórios, a tomada de decisões informadas e melhoria dos métodos de teste.^[25]

Na prática, a incerteza de um resultado pode advir de diversas fontes tais como, amostragem, condições de armazenamento da amostra, pureza dos reagentes, condições de medição e efeitos aleatórios, entre outros. Assim, na estimativa da incerteza é necessário considerar cada fonte de incerteza, tratando-a separadamente – componente de incerteza; quando expressa como desvio-padrão é designada **incerteza padrão** e a incerteza total de um resultado é dada como **incerteza padrão combinada**. O intervalo no qual se acredita que o valor do mensurado está implícito num elevado nível de confiança é fornecido pela **incerteza expandida**.^[26]

Existem várias metodologias para determinar a incerteza de uma medição. Uma das abordagens que pode ser utilizada é descrita na ISO 11352:2012 que utiliza parâmetros do desempenho global do método, estimados intralaboratorialmente, nomeadamente, dados de validação e controlo de qualidade, contemplando assim o erro associado à precisão e exatidão do método. ^[27]

2.4.1. Quantificação da Incerteza associada à precisão (u_{R_w})

A precisão é habitualmente uma componente maioritária da incerteza global pelo que precisa ser avaliada em todo o âmbito de aplicação do método em condições de precisão intermédia, pois esta reflete possíveis variações do desempenho do método em função de alterações de parâmetros experimentais normalmente constantes. ^[28] A incerteza associada à precisão pode ser estimada consoante o tipo de amostra de controlo do método – amostras estáveis com abrangência a todas as etapas do processo analítico, soluções sintéticas ou soluções menos estáveis.

Para a estimativa da componente da incerteza associada à precisão, quando são utilizadas soluções sintéticas, é considerada a dispersão dos resultados obtidos em condições de precisão intermédia para os padrões de controlo, pelo cálculo do coeficiente de variação – $u_{R_w,stand}$.

Tratando-se de soluções sintéticas em que não é possível garantir a homogeneidade de matriz, torna-se também necessário para a estimativa da incerteza da componente da precisão considerar a variabilidade dos resultados através de cartas de controlo de amplitudes de duplicados de amostras de diferentes matrizes – $u_{r,range}$.

Assim, a quantificação da incerteza associada à precisão é determinada da seguinte forma:

$$u_{R_w} = \sqrt{u_{R_w,stand}^2 + u_{r,range}^2} \quad (2.30)$$

tal que,

$$u_{r,range}^2 = \frac{\bar{R}}{d_2} \quad (2.31)$$

em que \bar{R} é a média da diferença absoluta entre duplicados e d_2 é o fator utilizado para o cálculo do desvio padrão da amplitude média, considerado 1,128 quando são utilizados dois valores. ^[27]

2.4.2. Quantificação da Incerteza associada à exatidão (u_b)

O erro de uma medição é a diferença entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da mensuranda, e resulta da combinação do erro sistemático com o erro aleatório. ^[28] A estimativa da incerteza associada a erros sistemáticos pode ser determinada através de MRC, EIL e ensaios de recuperação.

Considerando os ensaios de recuperação para estimar a incerteza associada à exatidão é necessário ter em conta duas componentes:

→ a diferença entre a recuperação observada e a recuperação completa, b_{RMS} , determinada da seguinte forma:

$$b_{RMS} = \sqrt{\frac{\sum b_i^2}{n_\eta}} \quad (2.32)$$

tal que b_i^2 é o desvio da recuperação completa da adição de i e n_η é o número de recuperações. ^[27]

→ a incerteza na concentração do analito adicionado, u_{add} . Esta componente da incerteza contempla:

- a incerteza no volume adicionado, u_v , determinada da seguinte forma:

$$u_v = \sqrt{u_{v,b}^2 + u_{v,rep}^2} \quad (2.33)$$

onde $u_{v,b} = \frac{\varepsilon_{v,max}}{\sqrt{3}}$ ($\varepsilon_{v,max}$ como sendo o desvio máximo dado pelo fabricante) e $u_{v,rep}$ a incerteza da repetibilidade do volume;

- a incerteza na concentração adicionada, u_{con} , que é o valor estabelecido pelo certificado do MRC, caso este seja utilizado na preparação da fortificação; se a solução de partida para a fortificação for preparada internamente, então u_{con} é vista como uma incerteza no volume, em que é considerado todo o material volumétrico utilizado. ^[27]

A incerteza associada à concentração do analito é então determinada de acordo com a seguinte equação:

$$u_{add} = \sqrt{u_V^2 + u_{con}^2} \quad (2.34)$$

Assim, a incerteza associada à exatidão, u_b , é calculada da seguinte forma:

$$u_b = \sqrt{b_{RMS}^2 + u_{add}^2} \quad (2.35)$$

2.4.3. Incerteza Combinada (u_c) e Expandida (U)

Quando todas as contribuições para a incerteza são identificadas e caso os erros sistemáticos não sejam significantes, a incerteza combinada, u_c , é determinada pela combinação das componentes da incerteza associada à precisão, u_{Rw} , e à exatidão, u_b ^[27]:

$$u_c = \sqrt{u_{Rw}^2 + u_b^2} \quad (2.36)$$

A incerteza expandida, U , é obtida multiplicando a incerteza combinada, u_c , por um fator de expansão, k :

$$U = k u_c \quad (2.37)$$

O fator de expansão fornece o multiplicador a ser aplicado à incerteza combinada para garantir que o valor medido se situa no intervalo de incerteza até um certo nível de confiança. Assim, se $k=2$, a incerteza expandida é reportada com um nível de confiança de 95 % e se $k=3$, com um nível de confiança de 99%. ^[29]

O resultado final deve ser reportado da seguinte forma:

$$\text{"Analito = Resultado} \pm U \text{ (unidades)*}$$

*a incerteza reportada é uma incerteza expandida calculada usando um fator de expansão igual a k (≥ 2) o que permite associar ao resultado um nível de confiança aproximadamente igual a 95%."

Capítulo 3

Análise de Metais por Espectrometria de
Absorção Atômica

3.1. Metais

Os metais são substâncias com elevada condutividade elétrica, maleabilidade e brilho, que perdem os seus eletrões para formar catiões, e que são encontrados naturalmente na crosta terrestre a concentrações variadas de acordo com a localização.^[30]

Os metais pesados são elementos metálicos com elevado número atómico que ocorrem naturalmente na natureza em pequenas quantidades (na ordem dos ppb – partes por bilião – e menor que 10 ppm – partes por milhão), e cuja densidade é pelo menos 5 vezes mais elevada do que a densidade da água.^[31] Eles são essenciais para manter várias funções biológicas e fisiológicas em organismos vivos quando em concentrações baixas, tornando-se nocivos quando excedem certos limites de concentração.^[30] A toxicidade depende de vários fatores diretos como a dosagem e espécie química bem como de fatores indiretos, tais como a idade, genética e estado nutricional do indivíduo exposto.^[31] As principais fontes de metais pesados são a comida, água e atividades industriais.^[32]

Dada a elevada importância que a água tem no organismo humano, a quantificação de metais pesados em água para consumo de forma a garantir concentrações dentro dos limites permitidos, é de grande relevância, uma vez que algumas das formas mais tóxicas dos metais são solúveis em água.

Os metais para a qual se pretende fazer a validação de um método de análise química são os metais pesados crómio, ferro, manganês e cobre e o metal alcalino-terroso, magnésio.

♦ Crómio

Crómio é o sétimo elemento mais abundante na Terra presente naturalmente na crosta terrestre, com estados de oxidação que variam desde crómio (II) a crómio (VI). As formas mais comuns são o Cr (III) - que desempenha um papel fundamental no metabolismo da glucose, gorduras e proteínas nos humanos e animais, potenciando a ação da insulina, imóvel na sua forma reduzida, insolúvel em água e ambientalmente inofensivo devido à baixa permeabilidade de membrana - e o Cr (VI) - a forma mais tóxica para animais, humanos e plantas, altamente solúvel em água e por isso móvel, facilmente introduzido na membrana celular.^{[30] [31]}

A poluição do meio ambiente pelas várias formas de crómio advém do seu uso na indústria metalúrgica, galvanoplastia, produção de tintas e pigmentos, curtimento e preservação de madeira; a incineração e emissões por parte dos automóveis poluem o meio ambiente com pequenas partículas de Cr (VI) – e Cr (III), que na presença de excesso de oxigénio é oxidado a

Cr(VI) – que levam a baixos níveis de exposição por inalação mas que aumentam os níveis de contaminação das águas. ^[30] ^[33]

O D.L nº 306/2007 de 27 de Agosto estabelece para este parâmetro químico o valor paramétrico de 50 µg/l em águas de consumo humano.

♦ Ferro

Ferro é o segundo metal mais abundante na crosta terrestre, e é mais comumente encontrado na natureza sob a forma de óxidos de Fe^{2+} e Fe^{3+} . ^[34] É um metal de transição atrativo para processos redox biológicos devido à capacidade de se interconverter nos iões Fe^{2+} e Fe^{3+} , bem como um componente vital em organismos, enzimas e proteínas transportadoras de oxigénio, como a hemoglobina. ^[30] É usado maioritariamente como material de construção e os óxidos usados como pigmentos em tintas e plásticos; vários sais de ferro são usados como coagulantes no tratamento de água. ^[34]

Apesar de se encontrar em todos os seres vivos e desempenhar um papel importante em algumas funções do organismo, em excesso é considerado tóxico, acumulando-se no fígado causando lesões neste órgão. Estima-se que o requisito mínimo diário de ferro depende da idade, género e estado fisiológico, e é de cerca de 10 a 50 mg/dia, e que a dose letal média é de 200 a 250 mg/kg de peso corporal. ^[34]

A principal fonte de ferro em águas superficiais é antropogénica, relacionada com atividade mineira ^[30] e embora o D.L nº 306/2007 de 27 de Agosto não o estabeleça como um parâmetro químico, é considerado um parâmetro indicador apenas para efeitos de controlo de qualidade da água destinada ao consumo humano, cujo valor paramétrico é de 200 µg/l.

♦ Manganês

Manganês é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre que aparece normalmente com o ferro e que não é encontrado naturalmente na sua forma elementar, mas sim como componente de mais de 100 minerais; é um elemento essencial para o correto funcionamento do organismo humano e animal na medida em que é necessário para o funcionamento de muitas enzimas celulares (manganês superóxido dismutase, piruvato carboxilase). ^[35] É fundamental para o processo de produção de ligas de ferro e aço, e a sua forma em óxido de manganês é utilizada em fertilizantes e cerâmica e a forma em carbonato de manganês é utilizada com composto de partida para a formação de outros compostos de manganês. ^[36]

Tal como o ferro, apesar de ser um elemento essencial à vida humana, é tóxico quando presente em elevadas concentrações no organismo, tal que as principais fontes de exposição são por inalação, dieta ou água contaminada.^[37]

O D.L nº 306/2007 de 27 de Agosto estabelece para este parâmetro indicador com vista ao controlo de qualidade da água destinada ao consumo humano, o valor paramétrico de 50 µg/l.

♦ **Cobre**

O cobre foi um dos primeiros metais extraído e usado pelo ser humano, que contribuiu significativamente para a sustentabilidade e melhoria desde o início da civilização.^[38] É um metal de transição estável no seu estado metálico, maleável, dúctil, bom condutor térmico e elétrico, e que forma catiões monovalentes e divalentes.^[39] Pode ser encontrado em depósitos naturais, tais como, rochas magmáticas e sedimentares, sendo a calcopirite a sua forma mineral mais abundante.^[38]

Exerce algumas funções bioquímicas e fisiológicas em plantas e animais, tais como, funcionar como um importante co-fator de algumas enzimas oxidativas como, por exemplo, a catalase e peroxidase. É também essencial para a formação da hemoglobina, bem como para o metabolismo de hidratos de carbono, e a sua habilidade de se transformar ciclicamente na sua forma reduzida – Cu (I) – e oxidada – Cu (II) – é tanto benéfica para enzimas envolvidas em reações *redox* quanto malévola, uma vez que a redução de Cu (II) a Cu (I) é potencialmente tóxica pois pode resultar na formação de superóxido e radicais hidroxilo.^[31]

O cobre pode ser utilizado quer na sua forma metálica – fios elétricos, tubos, válvulas, moedas, materiais de construção – quer associado a elementos orgânicos, como (ou em) – fungicidas, inseticidas, preservantes de madeira, refinação de petróleo, pirotecnia. A forma em que o cobre elementar é encontrado na água é influenciada por vários fatores, sendo que o ião Cu^{2+} é a forma oxidada mais comum em água pura, a pH 6; a pH 6-9.3, prevalece o cobre na forma CuCO_3 e a pH 9.3-10.7 prevalecem os iões $[\text{Cu}(\text{CO}_3)_2]^{2-}$. A dose letal para adultos varia entre 4 e 400 mg de Cobre (II)/kg de peso corporal.^[39]

O D.L nº 306/2007 de 27 de Agosto estabelece para este parâmetro químico o valor paramétrico de 2,0 mg/l em águas de consumo humano.

♦ **Magnésio**

O magnésio é um metal alcalino-terroso, branco-prateado e muito leve, capaz de formar ligas metálicas resistentes com alumínio, manganês e zinco. Quimicamente ativo, vários metais podem ser produzidos pela redução térmica dos seus sais e formas oxidadas, juntando-se com a maioria dos não-metais e quase todos os ácidos, sendo pouco reativo com muitas substâncias orgânicas.^[40]

É o quarto catião mais abundante no corpo humano e o segundo maior no fluido intracelular, funcionando como co-fator em mais de 300 sistemas enzimáticos que regulam várias reações bioquímicas, e desempenha um papel importante no transporte ativo de iões cálcio e potássio pelas membranas.^{[41] [42]} Sendo a água uma das principais fontes de magnésio, para além da alimentação, esta precisa ser controlada quanto aos níveis de magnésio presentes uma vez que, se apresentar concentrações elevadas deste, a contribuição para a dose diária recomendada pode exceder os limites recomendáveis.^[41] O D.L nº 306/2007 de 27 de Agosto não estabelece um valor paramétrico para este parâmetro indicador com vista ao controlo de qualidade da água destinada ao consumo humano, no entanto é desejável que a sua concentração não seja superior a 50 mg/L.

3.2. Espectrometria de Absorção Atómica

A espectroscopia é o estudo da interação entre radiação eletromagnética com matéria, e quando aplicada a análise quantitativa se designa por **espectrometria**. Existem diversos tipos de espectroscopia dependendo da região do espectro eletromagnético, das propriedades da matéria na qual ocorrem as interações e das interações físicas envolvidas.^[43]

Thomas Melville foi o primeiro, em 1752, a descrever os princípios da espectroscopia de emissão atómica por chama. Guystav Kirchoff e Robert Bunsen propõem pela primeira vez em 1860 a potencial relação analítica entre átomos no estado fundamental ou excitado e a absorção ou emissão de radiação espectral discreta, mas é em 1955 que Alan Walsh e os seus colaboradores desenvolvem a **Espectrometria de Absorção Atómica** - mede de forma quantitativa, elementos presentes em amostras ambientais, pela medição de radiação ultravioleta ou visível absorvida pelos átomos do elemento a analisar. Este avanço foi devido aos seus desenvolvimentos nas lâmpadas de cátodo oco como fonte de radiação espectral que

evitava a necessidade de utilização de monocromadores de alta resolução para selecionar e resolver as linhas de absorção.^{[44] [45]}

A interação da luz com uma amostra pode ser utilizada para fornecer informação qualitativa e quantitativa acerca dos elementos que compõem a amostra a analisar.^[46] A organização interna dos átomos numa estrutura orbital, da qual faz parte um número específico de elétrons, permite que os elétrons da última camada de valência sejam transferidos para orbitais de maior energia, pela absorção de radiação de determinado comprimento de onda.

À medida que o número de átomos no caminho ótico aumenta, a quantidade de luz absorvida aumenta, sendo possível determinar qual a quantidade de analito na amostra pela medição da quantidade de luz absorvida.^[47] Matematicamente, a quantificação do analito é feita de acordo com a Lei de *Beer-Lambert*, sendo que a absorvância, **A**, corresponde na prática ao logaritmo da razão entre a intensidade da luz incidente, I_0 , e a intensidade da luz detetada, I :

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon Cl \quad (3.1)$$

em que ϵ é o coeficiente de absortividade molar (constante para um dado elemento e comprimento de onda), C é a concentração do analito na amostra (ppm) e l é o comprimento do caminho ótico (m).

No entanto, a aplicação direta da Lei de *Beer-Lambert* na espectrometria de absorção atômica é difícil devido a variações na eficiência da atomização causadas pela matriz da amostra e não-uniformidade da concentração e comprimento do caminho dos átomos do analito. Assim, a concentração é normalmente determinada a partir de uma curva de calibração obtida usando padrões de concentrações conhecidas.^[44]

Uma vez que os átomos absorvem a comprimentos de onda muito específicos, é necessária a utilização de uma fonte que emita um espectro de linha estreita do elemento de interesse.^[47] Essas fontes de linhas, de alta intensidade, conferem elevada especificidade à técnica de absorção atômica, tornando-a praticamente livre de interferências. As principais fontes de luz utilizadas em absorção atômica são a lâmpada de cátodo-oco (LCO) e as lâmpadas de descarga de eletrodos (LDE). A LCO é uma excelente fonte para a grande maioria dos elementos devido à sua estabilidade. Contudo, em elementos mais voláteis, tais como o arsênio e selênio, cujo comprimento de onda primário é abaixo dos 200 nm, emitem com baixa intensidade. As LDE emitem radiação mais intensa, sendo mais utilizadas para os elementos mais

voláteis e para os quais não existem LCO, conferindo uma maior precisão e sensibilidade, especialmente quando usadas na zona ultra-violeta do espectro. ^[47] ^[48] ^[49]

As lâmpadas de cátodo-oco, Figura 3.1, tem sido usadas em análises espectroscópicas por pelo menos 40 anos, tanto como um meio para excitar a amostra como, mais frequentemente, para produzir um espectro de linhas finas na investigação da estrutura hiperfina das linhas espectrais. ^[50] São constituídas por um ânodo de tungsténio e um cátodo cilíndrico feito do elemento que se pretende analisar, selados num tubo de vidro com um gás inerte (néon ou árgon) a baixa pressão. ^[46]

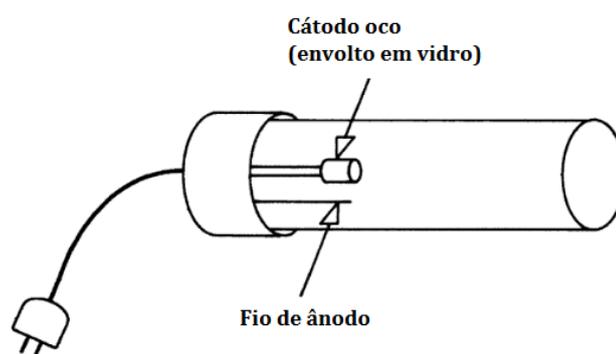


Figura 3.1 – Lâmpada de cátodo-oco. ^{Adaptado de [48]}

Quando um potencial elétrico é aplicado entre o ânodo e o cátodo, alguns dos átomos do gás de enchimento são ionizados. Estas cargas positivas aceleram em direção ao cátodo carregado negativamente e, no impacto, ejetam átomos metálicos - um processo designado pulverização. Alguns destes átomos são excitados pela ação dos iões do gás de enchimento emitindo radiação característica do metal à medida que regressam para o estado fundamental. ^[46] Na Figura 3.2 está representado um esquema do funcionamento da lâmpada de cátodo-oco.

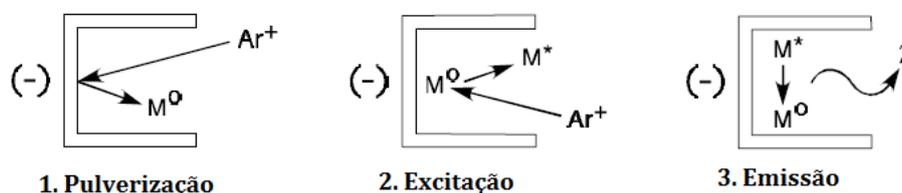


Figura 3.2 – Processo da emissão de radiação pela lâmpada de cátodo-oco. ^{Adaptado de [47]}

As lâmpadas de cátodo-oco, apesar de conferirem grande especificidade à espectrometria de absorção atómica, apresentam algumas limitações:

- tempo de vida finito;
- depósitos metálicos nas laterias e extremidades afetam o tempo de vida da lâmpada, bem como reduzem a intensidade da luz emitida;
- após a pulverização, alguns átomos metálicos podem-se difundir do cátodo sem estarem no estado excitado, o que resulta na absorção da radiação antes desta atingir a célula.^[46]

Um aspeto importante na espectrometria de absorção atómica é a seletividade, uma vez que cada elemento tem um conjunto de níveis de energia diferentes e dá origem a linhas de absorção muito estreitas.^[44] A utilização de um **monocromador** permite separar as muitas linhas de absorção geradas por todos os elementos na amostra, seleccionando apenas o comprimento de onda do elemento de interesse, que é direcionado para um **detetor**, normalmente um tubo fotomultiplicador, cuja função é converter o sinal de luz num sinal eléctrico proporcional à intensidade da luz.^[44]

Na realidade, para que haja absorção atómica, é necessária a produção de vapor de átomos do elemento de interesse no estado fundamental. Ora, esta produção dá-se num **atomizador**, num processo designado por atomização. A amostra ao entrar no atomizador é transformada num aerossol, do qual o solvente é evaporado e permanece a amostra seca; esta é vaporizada num gás a partir do qual os compostos são quebrados em átomos livres.^[44] O processo de atomização é esquematizado na Figura 3.3.

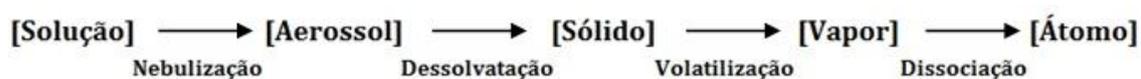


Figura 3.3 – Processo geral de atomização. Adaptado de [45]

É na forma como a atomização da amostra é feita, isto é, em diferentes tipos de atomizadores, em chama e câmara de grafite, que se distinguem as duas técnicas da espectrometria de absorção atómica – FAAS (do inglês, *Flame Atomic Absorption*) e GFAAS (do inglês, *Graphite Furnace Atomic Absorption*).

3.2.1. Atomização em Chama

A atomização em chama é a forma mais rotineira e conveniente de gerar átomos no estado fundamental, e é amplamente usada na espectrometria de absorção atómica.^[46]

O princípio de funcionamento é simples. A amostra é aspirada por um capilar via nebulizador pneumático, misturada com os gases de combustão na câmara de mistura e

transportada para o queimador (chama), onde as partículas de aerossol são dessolvatadas, dissociadas e atomizadas, como mostra o esquema da Figura 3.4. ^[45]

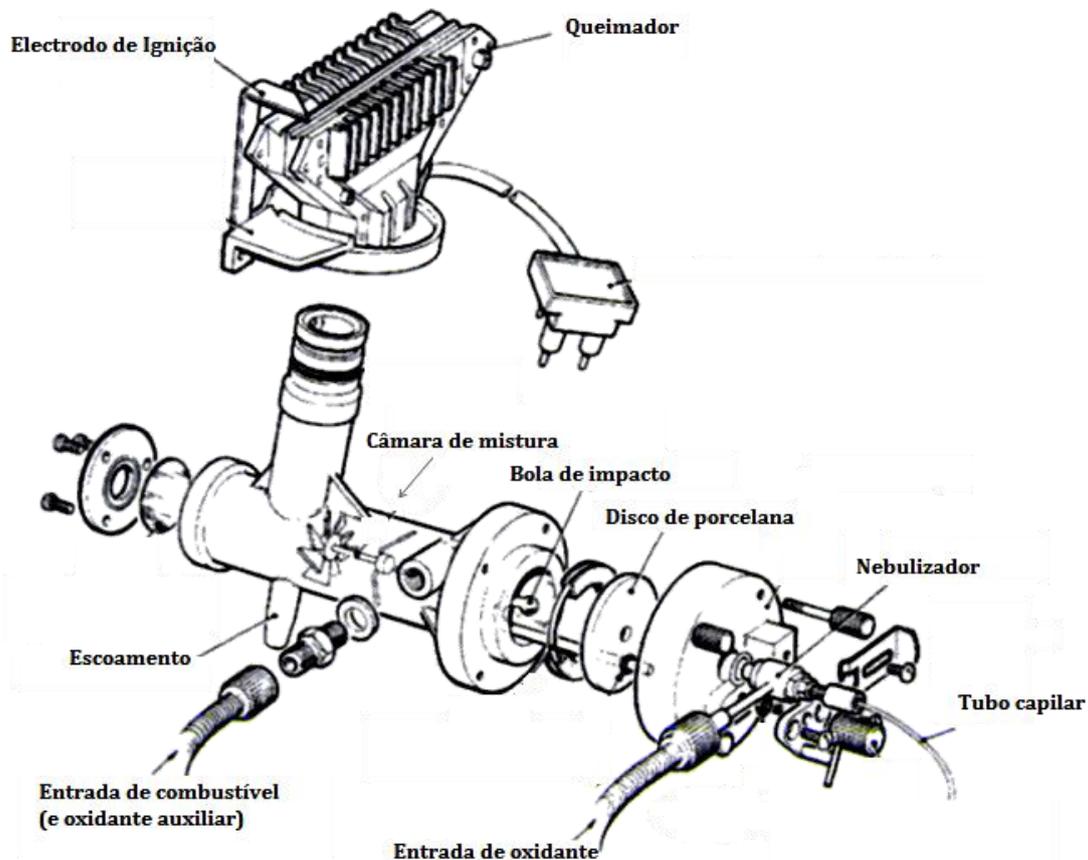


Figura 3.4 – Esquema do processo de atomização em chama. ^{Adaptado de [51]}

A nebulização é um passo crucial, pois quer o tamanho quer a distribuição das gotas de aerossol são fatores importantes para uma atomização eficiente: caso as gotas de aerossol sejam demasiado grandes, podem não permanecer o tempo suficiente na chama para serem completamente atomizadas; se forem demasiado pequenas, podem ser dessolvatadas no nebulizador ao invés de na chama. ^[45] Assim, a amostra é aspirada por um tubo capilar para o nebulizador onde é transformada num aerossol por turbulência do líquido com o gás oxidante (ex: ar). Imediatamente a seguir ao nebulizador, um amostrador rotativo automático espalha o aerossol numa placa concêntrica, controlada por uma bola de impacto, para que este chegue à chama uniformemente distribuído. ^[46] Uma das características do tubo capilar, nomeadamente o diâmetro, é um fator que interfere diretamente na eficiência da atomização, uma vez que fluidos de elevada viscosidade fluem pelo capilar a velocidades mais reduzidas do que fluidos com menor viscosidade. Capilares de diâmetro mais reduzido estão facilmente sujeitos a

entupimentos por material particulado e a corrosão por ácido proveniente da diluição da amostra. [48]

Após a transformação da amostra líquida num aerossol constituído por gotas de diversos tamanhos, estas são misturadas com os gases de combustão (combustível e oxidante) numa câmara de mistura, antes de serem enviadas para a chama. Nesta câmara de mistura as gotas de aerossol de maior tamanho condensam e são drenadas, não sendo enviadas para a chama, minimizando assim efeitos de dispersão da luz nesta. [48]

Na chama, as gotículas do aerossol são dessolvatadas na zona de combustão primária; as partículas sólidas de aerossol seco, depois de dissociadas, passam para a região central da chama, a parte mais quente da chama, onde são vaporizadas e atomizadas, sendo depois levadas para a zona de combustão secundária, onde pode ocorrer a oxidação antes de serem libertadas para a atmosfera, Figura 3.5. [52] É na região central da chama que é feito passar o feixe de luz proveniente da lâmpada de cátodo-oco.

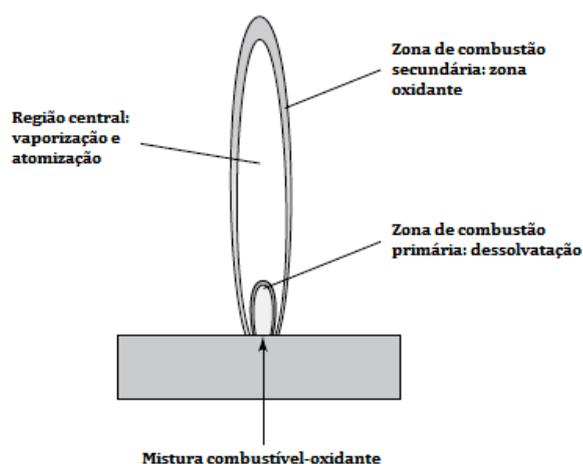


Figura 3.5 – Regiões da chama. Adaptado de [52]

Diversos tipos de chama podem ser utilizados na espectrometria de absorção atômica. Os mais comuns são de ar-acetileno, com temperaturas entre 2100 – 2400 °C, e de óxido nitroso-acetileno, entre os 2600 – 2800 °C, funcionando o acetileno como combustível e o ar e óxido nitroso como oxidante. As propriedades da chama, nomeadamente a temperatura, afetam a eficiência da atomização: temperaturas mais altas aumentam a população de átomos, aumentando a sensibilidade. No entanto, para certos elementos, como os metais alcalinos, a perda de átomos por ionização pode ser maior relativamente ao aumento que poderia ser proporcionado pelo aumento da temperatura da chama. [52]

Assim, cada tipo de chama é utilizado de acordo com o elemento que se pretende analisar: a chama de óxido nitroso – acetileno é recomendada para elementos que formam espécies moleculares estáveis como os óxidos refratários, tais como, alumínio, cálcio e titânio, enquanto que a chama de ar – acetileno é recomendada para elementos com baixos potenciais de ionização, tais como, lítio, potássio e sódio. ^[45]

A atomização por chama permite uma análise de forma simples e rápida. Devido à grande perda de amostra na nebulização e à baixa densidade atômica na chama bem como o tempo de permanência dos átomos nela, esta forma de atomização é menos sensível, conduzindo a limites de detecção mais altos, conseqüentemente, permite a quantificação de amostras na ordem dos mg/L. Este tipo de atomização é desvantajoso para a quantificação de elementos que se encontram em concentrações da ordem dos µg/L, tornando-se necessário o recurso à atomização por câmara de grafite.

3.2.2. Atomização em Câmara de Grafite

A atomização em câmara de grafite veio permitir a análise de elementos em concentrações vestigiais devido à utilização de tubos de carbono (grafite) resistentes a um aquecimento elevado para gerar átomos gasosos no estado fundamental, que aumentou significativamente a sensibilidade da espectrometria de absorção atômica, comparativamente ao uso comum de uma chama, uma vez que todo o analito é concentrado durante as várias fases do programa de temperatura, aumentando o tempo de residência média dos átomos no caminho ótico (≥ 1 segundo). ^[52]

Um pequeno volume de amostra, na ordem dos microlitros, é introduzido automaticamente por um auto-amostrador num tubo de grafite que é aquecido a temperaturas que podem ser acima dos 2600 °C ao ser aplicada nas extremidades do tubo uma voltagem controlada gerada por dois eletrodos, Figura 3.6. ^[53]

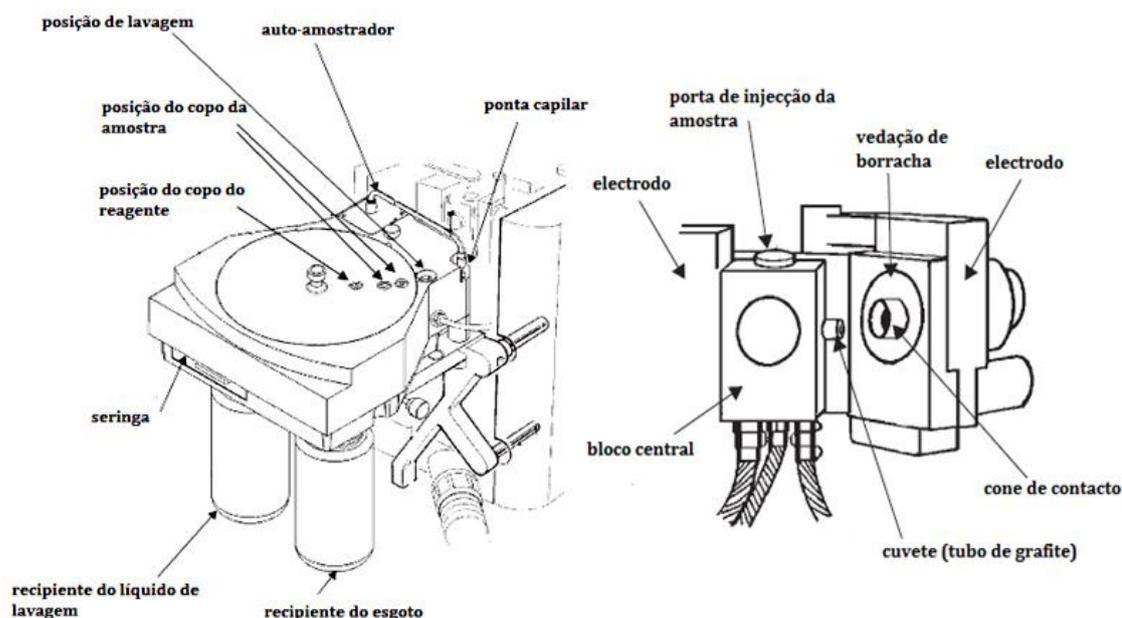


Figura 3.6 – A imagem à esquerda representa um auto-amostrador do tipo GFS e a imagem à direita representa a vista interior de um forno de grafite do tipo GFS35. ^{Adaptado de [54]}

O aquecimento do tubo ocorre de forma rápida e é executado em quatro fases utilizando um programa de temperatura otimizado para cada analito:

1. Secagem – remoção do solvente a uma temperatura moderada (100-150 °C), com velocidade de aquecimento entre 2 e 20 °C/s;
2. Pirólise – destruição da matéria orgânica à temperatura o mais alta possível sem que ocorra a vaporização do analito (330-1500 °C) com velocidade de aquecimento entre 50 e 200 °C/s;
3. Atomização – redução dos iões do analito a átomos no estado fundamental devido a um aumento rápido da temperatura (na ordem dos milissegundos) entre 1600 e 2700 °C;
4. Limpeza – aumento da temperatura do tubo até 2500-2700 °C assegurando a remoção completa do analito do tubo de forma a minimizar efeitos de memória. ^{[43] [55]}

O principal objetivo ao ser utilizado um programa de temperatura controlado é a diminuição da probabilidade do analito vaporizar e atomizar durante a fase da pirólise, uma vez que também nesta são utilizadas temperaturas elevadas que podem permitir que tal aconteça. O comportamento ideal de um ciclo de aquecimento pode ser visto no gráfico da Figura 3.7, que apresenta as fases de secagem, pirólise e atomização. Verifica-se que é na fase de atomização que o sinal de absorvância é revelado e o analito não é atomizado na fase de pirólise.

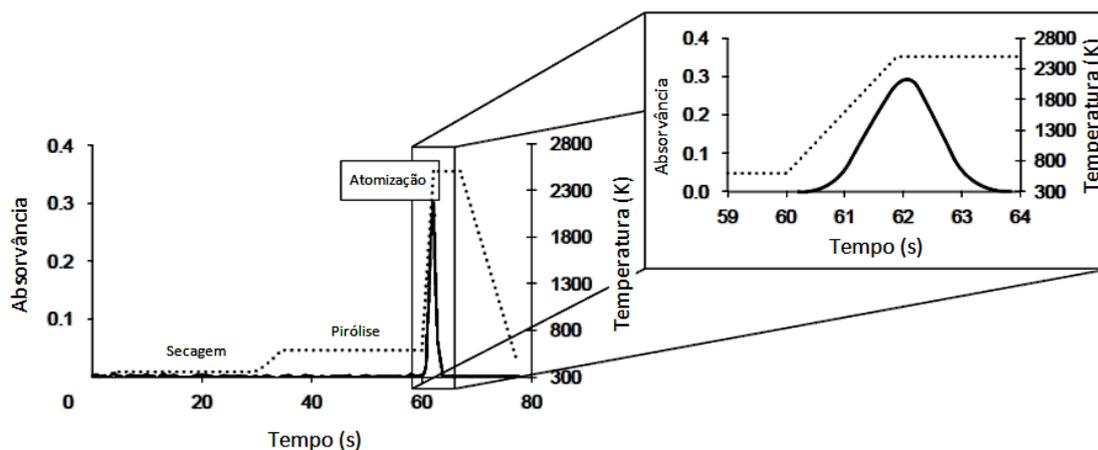


Figura 3.7 – Gráfico elucidativo das três primeiras fases de aquecimento de uma análise em que é utilizada a câmara de grafite como atomizador: secagem, pirólise e atomização. A intensidade do feixe de luz que atravessa o tubo de grafite, proveniente da fonte de radiação, é diminuída quando na fase de atomização, o analito absorve luz, registando-se um sinal de absorvância - a largura do pico obtido depende do tipo de analito, velocidade de aquecimento e geometria do forno. ^{Adaptado de [56]}

À exceção da fase de atomização, no decorrer do programa de temperatura, é feito circular um fluxo de gás inerte, normalmente argón, para prevenir a entrada de ar no tubo (o oxigénio pode ser reduzido a CO e CO₂ pelo consumo do carbono que forma o tubo de grafite, mas também pode formar óxidos metálicos) e assim aumentar o seu tempo de vida. ^[56] Devido às elevadas temperaturas a que o tubo é submetido, é necessária a utilização de um sistema de refrigeração que permite o rápido arrefecimento deste quando a aplicação da voltagem é cessada. ^[53]

Diversos materiais podem ser utilizados no fabrico de tubos, mas existem alguns requisitos que são necessários satisfazer tendo em conta as características da técnica, nomeadamente, quimicamente inerte, boa condutividade térmica e elétrica, elevada pureza, maleável, baixa porosidade e coeficiente de expansão térmico e elevado ponto de fusão. A grafite é o material mais frequentemente utilizado, no entanto, ela apresenta elevada porosidade que aumenta com a exposição prolongada a temperaturas elevadas, podendo levar à adsorção nas paredes do tubo de átomos vaporizados, criando efeitos de memória em análises posteriores. O facto de alguns elementos a elevadas temperaturas formarem carbonetos estáveis com a grafite é considerado uma desvantagem. Estes problemas podem ser ultrapassados com o revestimento do interior do tubo com grafite pirolítica ou simplesmente a utilização de tubos fabricados totalmente de grafite pirolítica, Figura 3.8. ^[51]

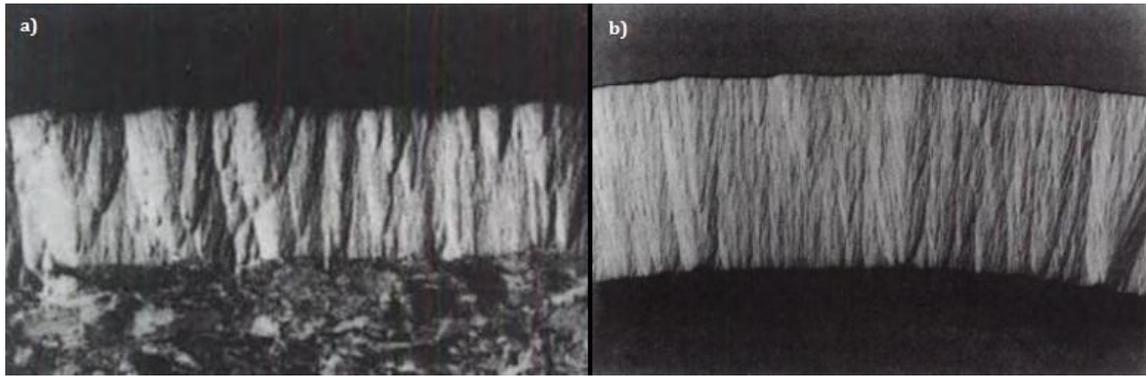


Figura 3.8 – a) fotografia de uma estrutura de grafite pirolítica num substrato de grafite; b) fotografia de um corte transversal de um tubo feito apenas de grafite pirolítica.^[51]

A utilização de uma quantidade mais baixa de amostra comparativamente à usada na atomização em chama, bem como a atomização total do analito devido ao confinamento da amostra no tubo de grafite, que levam ao aumento da sensibilidade e diminuição dos limites de detecção, são vistas como vantagens. É no entanto mais suscetível a contaminações, com um tempo de análise mais longo.

3.2.3. Interferências/Limitações

A espectrometria de absorção atômica, tal como todas as outras técnicas de espectrometria, pode ser alvo de fatores que condicionam uma resposta analítica precisa e exata. Estes fatores são vistos como interferências.

Apesar de ser dotada de poucas interferências, elas podem ser classificadas em interferências de matriz, espectrais, de ionização e de memória. A Tabela 3.1 apresenta a probabilidade de ocorrência destas interferências na atomização por chama e por câmara de grafite.

♦ Interferência de Matriz

As interferências de matriz caracterizam-se pela diminuição do número de átomos livres capazes de absorver luz, conduzindo conseqüentemente a uma diminuição da resposta analítica, devido a determinados componentes presentes na amostra que inibem a sua formação.^[57] Este tipo de interferência pode ser de origem química, em que há a formação de compostos termicamente estáveis contendo o analito de interesse que não são fragmentados na chama ou câmara de grafite, ou de origem física em que as características físicas da amostra e das soluções padrão, por exemplo, viscosidade e tensão superficial, são diferentes, levando a que o volume de amostra/solução padrão aspirado pelo capilar seja diferente do definido no método.^{[47] [48]} Estas interferências podem ser detetadas através de ensaios de recuperação.

A eliminação destas interferências pode passar pela utilização de um modificador de matriz – agente químico que reage preferencialmente com o interferente, inibindo-o de se associar com o analito – caso se trate de uma interferência de natureza química, e pela utilização da técnica de adição-padrão se se tratar de uma interferência de natureza física em que não é possível reproduzir ou aproximar as condições da amostra nos padrões.

♦ **Interferência Espectral**

As interferências espectrais ocorrem quando um elemento que não seja o analito de interesse absorve luz dentro da largura da linha de absorção do analito, a um comprimento de onda muito próximo, levando a um aumento errôneo do sinal medido.^[58] Esta interferência pode ser ultrapassada com a diminuição da largura da fenda ou com a alteração do comprimento de onda para um menos sensível.

Um tipo de interferência espectral é a absorção de fundo, que se caracteriza pela absorção no mesmo comprimento de onda de espécies moleculares ainda presentes no tubo durante a atomização e que são libertadas no fumo, levando à atenuação do feixe de luz. Assim, é necessário uma correção de fundo para ultrapassar esta interferência, que pode passar por utilizar uma fonte de radiação contínua, por exemplo lâmpada de deutério.

Quando é utilizada correção de fundo com lâmpada de deutério, o feixe de luz primário (da lâmpada de cátodo-odo) e o feixe de luz da lâmpada de deutério passam alternadamente pela chama ou tubo de grafite; enquanto o analito de interesse absorve apenas do feixe de luz primário, o interferente absorve em ambos os feixes emitidos, ou seja, quando a razão entre os dois feixes é feita eletricamente, a absorção de fundo é eliminada, e a absorvância real para o analito a determinar é detetada.^[47] No entanto, se a largura de banda utilizada for estreita, pode ocorrer absorção da radiação contínua no comprimento de onda do analito, o que leva a uma diminuição da sensibilidade.^[48]

♦ **Interferência de Ionização**

A interferência de ionização, característica da atomização em chama, ocorre quando a temperatura da chama é suficientemente alta para remover um eletrão dos átomos neutros do analito, formando um ião carregado positivamente, diminuindo a resposta analítica. Esta interferência pode ser ultrapassada adicionando supressores de ionização às amostras, padrões e brancos. Os mais comuns são o potássio, sódio ou lítio, metais alcalinos que se ionizam facilmente, desfavorecendo a formação de catiões do analito.^[58]

♦ Interferência por efeito de Memória

As interferências por efeito de memória são específicas da atomização em câmara de grafite. Se for analisada uma amostra com uma concentração elevada de analito, geralmente um elemento com elevada temperatura de atomização, ele pode ser adsorvido pelas paredes do tubo de grafite devido à porosidade deste constituinte. Assim, em amostras posteriores, haverá um incremento da absorvância obtida, uma vez que o analito da amostra anterior não terá sido totalmente atomizado. ^[57]

Tabela 3.1 – Probabilidade de ocorrência de interferências de matriz, espectrais, de ionização e de efeito de memória, nos dois tipos de atomização, por chama e por câmara de grafite, da espectrometria de absorção atômica.

		Atomizador	
		Chama	Câmara de Grafite
Interferência	<i>Matriz (NQ)</i>	Muito comum	Muito comum
	<i>Matriz (NF)</i>	Muito comum	Comum
	<i>Espectral</i>	Comum	Comum
	<i>Ionização</i>	Comum	Pouco comum
	<i>Memória</i>	Inexistente	Muito comum

Legenda: NQ – natureza química; NF – natureza física

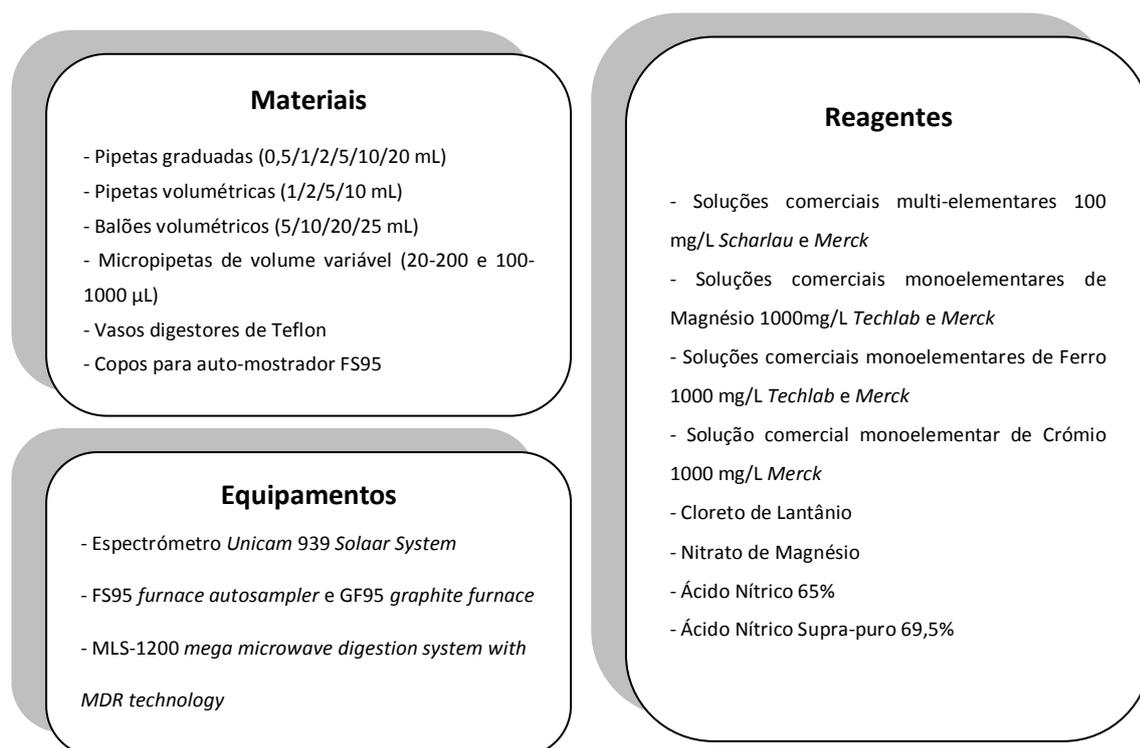
3.3. Materiais e Métodos

Tendo em conta o objetivo desta dissertação, o cumprimento rigoroso de todas as etapas que precedem a análise das amostras é de grande importância. Na quantificação de metais, umas das etapas críticas com impacto direto no resultado é a amostragem, que deverá ser representativa da água a controlar. Segundo a recomendação ERSAR nº 01/2017 “Procedimento para a Colheita de Amostras de Água para Consumo Humano em Sistemas de Abastecimento”, documento que refere as linhas orientadoras a considerar para uma correta colheita de amostra de água destinada ao consumo humano, indica que a recolha das amostras nas quais se pretende analisar os metais cobre, chumbo e níquel deve ser feita sem escoamento prévio, contrariamente à realizada para os restantes metais. ^[59]

Após a amostragem, as amostras já no laboratório devem ser alvo de um tratamento prévio, de modo a garantir que os metais se encontram em solução. Assim, a amostra é acidificada com 2 mL de HNO₃ a 65% no volume de 1 L, para que o pH seja inferior a 2. A amostra só poderá ser analisada após 16 horas.

Assim como a amostragem, a utilização de material limpo e esterilizado é um fator de extrema importância que garante que as amostras a analisar não sofreram qualquer tipo de contaminação. Neste sentido, todo o material utilizado desde a amostragem até à análise deve ser lavado com água bi-desionizada e descontaminado numa solução de HNO₃ a 50% por um período mínimo de 24 horas.

No seguinte esquema estão apresentados os materiais, reagentes e equipamentos utilizados na implementação dos métodos analíticos:



Neste projeto, o desenvolvimento e a seleção da melhor metodologia a aplicar na quantificação dos metais por GFAAS e FAAS baseou-se em metodologias referenciadas pela EPA 200.9 e SMEWW 3111, respetivamente, bem como o manual do equipamento. ^{[49] [57] [60]}

Dada a necessidade de cumprimento dos requisitos definidos no D.L 306/2007, a validação de crómio, ferro e manganês em águas de consumo foi realizada por Espectrometria de Absorção Atómica com atomização em câmara de grafite. Nesta técnica é necessária a otimização de um programa de temperatura controlado, ajustado às características de cada elemento. Assim, é realizado um teste de temperaturas, designado por *Ash Atomize*, que avalia a melhor temperatura de pirólise e atomização, etapas cruciais, assegurando que não haja perda de analito. A Figura 3.9 apresenta graficamente os resultados obtidos na otimização das temperaturas de pirólise e atomização para os três elementos.

Otimização das Temperaturas em GFAAS

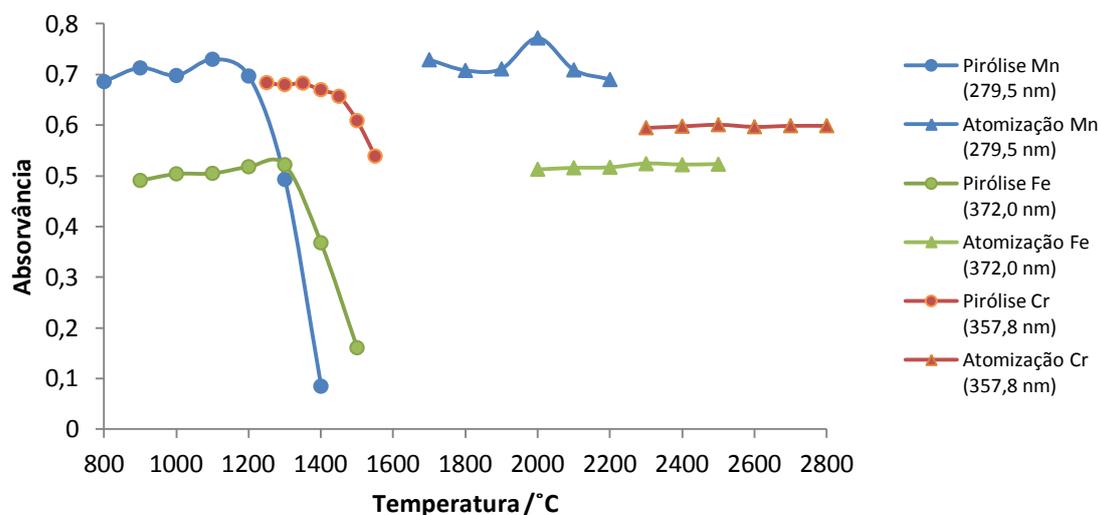


Figura 3.9 – Otimização das temperaturas de pirólise e atomização para os métodos de análise do cobre, ferro e manganês, desenvolvidos em GFAAS.

A temperatura de pirólise é escolhida de forma a garantir que não há perda de sensibilidade, isto é, diminuição do sinal de absorvância. Assim, considera-se como temperatura ótima a temperatura imediatamente antes à perda de sinal. No que refere à temperatura de atomização, é considerada a temperatura que permitiu obter um máximo de absorvância. Na Tabela 3.2 estão apresentadas as condições do método para cada metal a ser analisado.

Tabela 3.2 – Condições experimentais dos métodos analíticos a implementar em GFAAS.

	Crómio	Ferro	Manganês
λ / (nm)	357,8	372,0	279,5
Gama de trabalho/ ($\mu\text{g/L}$)	2 – 10	20 – 100	2 – 10
Modificador de Matriz	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$
T/ ($^{\circ}\text{C}$):			
Pirólise	1450	1250	1100
Atomização	2600	2250	2000

Diariamente e antes de cada análise, devem ser verificadas as condições do equipamento através da leitura prévia de brancos, de modo a garantir a inexistência de efeitos de memória, e do padrão de concentração mais elevada, garantindo que não há perda de sensibilidade do tubo de grafite.

Uma vez que, de acordo com o D.L 306/2007, estão estabelecidos para os metais cobre e magnésio em águas de consumo valores paramétricos mais elevados, a validação destes foi

levada a cabo por Espectrometria de Absorção com atomização em chama. Na Tabela 3.3 estão apresentadas as condições do método para cada metal a ser analisado.

Tabela 3.3 – Condições experimentais dos métodos analíticos a implementar em FAAS.

	Cobre	Magnésio
λ / (nm)	324,8	285,2
Gama de trabalho/ (mg/L)	0,25 – 2	0,1 – 0,8
Modificador de Matriz	---	LaCl ₃
Tipo de chama	Ar – C ₂ H ₂	Ar – C ₂ H ₂

No início de cada análise, é feito o ajuste do queimador de forma a obter o máximo de absorvância e lido o padrão de concentração mais elevada com o intuito de verificar a sensibilidade.

A escolha do modificador de matriz mais apropriado a cada elemento foi feita de acordo com as sugestões apresentadas na EPA 200.9, no SMEWW 3111 e 3113, e no manual do equipamento. Para os elementos a analisar por GFAAS, a sugestão de modificador de matriz comum às três referências acima citadas é o nitrato de magnésio, pelo que foi o utilizado. Relativamente aos elementos analisados por FAAS, para o cobre não é referida a utilização de modificador de matriz, enquanto que para o magnésio, a utilização de LaCl₃ é recomendada.

De acordo com o D.L nº 306/2007 é necessária a determinação do parâmetro da turvação¹ em amostras de água de consumo, estando definido como limite para água de consumo 4 UNT e para água superficiais 1 UNT. A presença de material particulado poderá interferir numa análise devido à elevada probabilidade de entupimento do capilar, quer na atomização por chama quer na atomização por câmara de grafite, bem como diminuir a eficiência da atomização, pelo que é fundamental avaliar a sua influência. Este estudo foi feito tendo por base a referência EPA 3015A, considerando amostras com turvação variada, digeridas num forno de micro-ondas pela adição de ácido nítrico supra-puro 69,5 %, e o resultado comparado com a mesma amostra não digerida.^[61]

¹ A turvação na água é causada por partículas em suspensão (material particulado) ou matéria coloidal que obstruem a transmissão da luz através da água. Pode ser causada por matéria inorgânica ou orgânica ou uma combinação dos dois.^[62]

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Estudo de Material Particulado

A avaliação da influência do material particulado é fundamental para o desenvolvimento do método de análise. Foram digeridas amostras num forno de micro-ondas com ácido nítrico supra-puro 69,5 %, e o resultado comparado com as mesmas sem digerir tendo em conta o desvio de duplicados, bem como brancos, padrões de controlo e amostras fortificadas, para controlar o processo de digestão. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os resultados obtidos para o estudo da influência do material particulado na eficiência da análise.

Tabela 4.1 – Avaliação da influência de material particulado nos métodos implementados em GFAAS.

	Crómio	Ferro	Manganês
Nº Amostras	7	9	---
Turvação/ (UNT)	2 – 26	1,1 – 43	---
% RPC	114 – 118	120 – 131	---
% DD	6,4	1,9 – 9,7	---
% RAF	114 – 119	83 – 120	---

Legenda: RPC – recuperação de padrão de controlo; DD – desvio de duplicados; RAF – recuperação de amostras fortificadas.

Tabela 4.2 – Avaliação da influência de material particulado nos métodos implementados em FAAS.

	Cobre	Magnésio
Nº Amostras	8	6
Turvação/ (UNT)	2 – 26	2 – 15
% RPC	102 – 109	101 – 102
% DD	5,7 – 10	1,0 – 7,1
% RAF	94 – 119	83 – 120

Legenda: RPC – recuperação de padrão de controlo; DD – desvio de duplicados; RAF – recuperação de amostras fortificadas.

De acordo com as Tabelas 4.1 e 4.2, é possível verificar que não existe influência do material particulado na leitura das amostras, pois os parâmetros de avaliação – recuperação do padrão de controlo digerido, desvios de duplicados e recuperação de amostras fortificadas de digestão – cumprem os critérios estabelecidos de 80 – 120 % para recuperações e 10 % para os desvios de duplicados. Relativamente ao padrão de controlo preparado para o ferro, a análise do padrão digerido e não digerido permitiu concluir que, tendo em conta o desvio de duplicados compreendidos entre 1,4 – 9,0 %, poderá ter havido má preparação da solução intermédia utilizada. Os dados obtidos até ao momento para a avaliação da influência do material particulado na análise de manganês não nos permitiu concluir acerca da mesma.

4.2. Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade permitem-nos compreender se a amostra é dotada de interferentes na matriz que podem adulterar os resultados obtidos. Uma das formas de verificar a existência ou não de interferentes, com o intuito de avaliar a especificidade e seletividade do método analítico é recorrendo à fortificação de amostras com uma quantidade de analito conhecida. Nas Tabelas 4.3 e 4.4 são apresentados os resultados obtidos para a avaliação da especificidade e seletividade dos métodos implementados em GFAAS e FAAS, respetivamente.

Tabela 4.3 – Avaliação da especificidade e seletividade dos métodos implementados em GFAAS, com recurso a amostras fortificadas.

	Crómio	Ferro	Manganês
Nº ensaios	32	23	21
Média	100,8	102,4	109,2
Desvio Padrão	10,0	9,9	6,7
CV (%)	9,9	9,7	6,1

Tabela 4.4 – Avaliação da especificidade e seletividade dos métodos implementados em FAAS, com recurso a amostras fortificadas.

	Cobre	Magnésio
Nº ensaios	31	21
Média	104,8	102,5
Desvio Padrão	4,5	9,2
CV (%)	4,3	9,0

De acordo com as Tabelas 4.3 e 4.4, podemos afirmar que os métodos em ambas as técnicas são específicos e seletivos, uma vez que os coeficientes de variação cumprem o critério de aceitação de 10 % e a média das percentagens de recuperação está dentro do intervalo 80 – 120 % definido internamente.

4.3. Gama Analítica e Linearidade

4.3.1. Gama Analítica – Homogeneidade de Variâncias

A seleção da gama de trabalho para cada elemento teve por base os requisitos definidos no D.L nº 306/2007, a concentração destes habitualmente existente em amostras de água de consumo e os valores de absorvância aceitáveis obtidos para os padrões dos extremos da gama, de acordo com o comprimento de onda selecionado. São considerados valores de absorvância

aceitáveis para o limite inferior da gama de trabalho os que garantem que pequenas oscilações de brancos não influenciam os valores do primeiro padrão, e para o limite superior da gama de trabalho os que garantem a inexistência de desvios à Lei de *Beer- Lambert*. Assim, foram definidas as gamas de trabalho de 2 – 10 µg/L para o crómio e manganês, de 20 – 100 µg/L para o ferro, de 0,2 – 2 mg/L para o cobre e de 0,1 – 0,8 mg/L para o magnésio.

Para a avaliação da gama de trabalho recorreu-se ao teste de homogeneidade de variâncias que permite averiguar a existência de diferenças significativas entre a variância obtida para o padrão de menor concentração e a variância obtida para o padrão de maior concentração, por comparação de um valor teste com um valor crítico da distribuição F de *Fischer* unilateral. Os resultados obtidos para os elementos analisados por GFAAS e FAAS são apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.6, respetivamente.

Tabela 4.5 – Avaliação da gama de trabalho dos métodos implementados em GFAAS com recurso ao teste de homogeneidade de variâncias, utilizando a distribuição F de *Fischer* unilateral com um grau de confiança de 99 %.

Réplicas	Crómio		Ferro		Manganês	
	P ₁	P ₅	P ₁	P ₅	P ₁	P ₅
1	0,176	0,713	0,117	0,525	0,176	0,784
2	0,178	0,711	0,118	0,547	0,178	0,749
3	0,169	0,715	0,117	0,525	0,178	0,789
4	0,191	0,718	0,123	0,529	0,177	0,752
5	0,177	0,723	0,126	0,536	0,176	0,756
6	0,178	0,702	0,122	0,532	0,178	0,764
7	0,181	0,720	0,120	0,526	0,178	0,756
8	0,181	0,718	0,116	0,540	0,174	0,727
9	0,182	0,741	0,118	0,535	0,179	0,740
10	0,186	0,729	0,119	0,529	0,179	0,776
Valor Teste	3,181		5,137		0,007	
Valor Crítico	5,351		5,351		5,351	

Legenda: P₁ – primeiro padrão da curva de calibração; P₅ – último padrão da curva de calibração.

Tabela 4.6 – Avaliação da gama de trabalho dos métodos implementados em FAAS com recurso ao teste de homogeneidade de variâncias, utilizando a distribuição F de *Fischer* unilateral com um grau de confiança de 99 %.

Réplicas	Cobre		Magnésio	
	P ₁	P ₅	P ₁	P ₅
1	0,029	0,233	0,121	0,876
2	0,029	0,235	0,120	0,874
3	0,029	0,235	0,119	0,869
4	0,029	0,232	0,117	0,870
5	0,029	0,235	0,122	0,877
6	0,030	0,235	0,122	0,872
7	0,029	0,234	0,121	0,875
8	0,029	0,234	0,121	--- ^{a)}
9	0,030	0,235	0,119	0,874
10	0,030	0,234	0,120	0,874
Valor Teste	4,571		2,928	
Valor Crítico	5,351		5,467	

Legenda: P₁ – primeiro padrão da curva de calibração; P₅ – último padrão da curva de calibração

a) Valor eliminado por ser considerado discrepante pelo Teste de Grubbs

Para o Teste de Homogeneidade de Variâncias são considerados os valores de absorvância obtidos em cada réplica preparada de forma independente, nas mesmas condições. Para todos os metais o valor teste obtido é inferior ao valor crítico dado pela distribuição F de *Fischer* unilateral, sendo possível afirmar que, para uma confiança de 99%, não existe diferença estatística significativa nas variâncias obtidas para os limites da gama de trabalho, pelo que se pode assegurar que existe homogeneidade e que a gama está bem ajustada.

4.3.2. Linearidade – Teste de *Mandel*

Com o intuito de verificar qual o ajuste polinomial mais adequado à gama analítica utilizada, é aplicado o Teste de *Mandel* que compara as variâncias obtidas quando a reta de calibração é tratada com um modelo polinomial de primeiro grau (P01) e com um modelo polinomial de segundo grau (P012). Os resultados obtidos para os elementos analisados por GFAAS e FAAS são apresentados nas Tabelas 4.7 e 4.8, respetivamente.

Tabela 4.7 – Teste de *Mandel* para a gama analítica utilizada em cada um dos metais analisados por GFAAS, recorrendo à distribuição F de *Fischer* unilateral com um grau de confiança de 99 %.

	Crómio		Ferro		Manganês	
	P01	P012	P01	P012	P01	P012
SQ	$2,51 \times 10^{-3}$	$2,38 \times 10^{-4}$	$9,80 \times 10^{-5}$	$7,39 \times 10^{-5}$	$2,21 \times 10^{-3}$	$2,69 \times 10^{-6}$
NGL	4	3	4	3	4	3
VA	$6,28 \times 10^{-4}$	$7,94 \times 10^{-5}$	$2,45 \times 10^{-5}$	$2,46 \times 10^{-5}$	$5,54 \times 10^{-4}$	$8,98 \times 10^{-7}$
ΔVA	$2,27 \times 10^{-3}$		$2,41 \times 10^{-4}$		$2,21 \times 10^{-3}$	
Valor Teste	28,628		0,979		2463,674	
Valor Crítico	34,116		34,116		34,116	

Legenda: SQ – soma dos quadrados; NGL – número de graus de liberdade; VA – variância do ajuste.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.7, é possível verificar que para os elementos crómio e ferro, o valor teste obtido é inferior ao valor crítico da distribuição F de *Fischer* unilateral, o que nos permite afirmar, com uma confiança de 99 %, que a curva de calibração pode ser ajustada utilizando qualquer um dos dois ajustes polinomiais. No entanto, o ajuste polinomial utilizado para a implementação dos métodos foi o ajuste polinomial de segundo grau, uma vez que é o que garante melhores resultados para os padrões de controlo da análise. Para o caso do manganês, o valor teste é notoriamente superior ao valor crítico dado pela distribuição F de *Fischer*, pelo que com uma confiança de 99 %, podemos afirmar que a curva de calibração deve ser ajustada com um polinómio de segundo grau.

Tabela 4.8 – Teste de *Mandel* para a gama analítica utilizada em cada um dos metais analisados por FAAS, recorrendo à distribuição F de *Fischer* unilateral com um grau de confiança de 99%.

	Cobre		Magnésio	
	P01	P012	P01	P012
SQ	$9,33 \times 10^{-7}$	$8,84 \times 10^{-7}$	$1,47 \times 10^{-3}$	$7,52 \times 10^{-4}$
NGL	4	3	4	3
VA	$2,33 \times 10^{-7}$	$2,95 \times 10^{-7}$	$3,68 \times 10^{-4}$	$2,51 \times 10^{-4}$
ΔVA	$4,94 \times 10^{-8}$		$7,20 \times 10^{-4}$	
Valor Teste	0,168		2,871	
Valor Crítico	34,116		34,116	

Legenda: SQ – soma dos quadrados; NGL – número de graus de liberdade; VA – variância do ajuste.

No que refere à avaliação da gama de trabalho dos métodos de análise de cobre e magnésio em FAAS, Tabela 4.8, o valor teste obtido é inferior ao valor crítico dado pela distribuição F de *Fischer* unilateral, o que nos permite afirmar, com uma confiança de 99 %, que a curva de calibração pode ser ajustada utilizando qualquer um dos dois ajustes polinomiais. No entanto, o ajuste considerado para a implementação dos métodos foi o ajuste polinomial de primeiro grau, pois é o que garante melhores resultados na avaliação do controlo que qualidade da análise.

4.4. Limiares Analíticos

4.4.1. Limite de Quantificação

O limite de quantificação é definido como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser estabelecido quantitativamente com determinada precisão e exatidão, e que o laboratório definiu como sendo a concentração do primeiro padrão da curva de calibração. Em termos práticos, o limite de quantificação não é calculado, mas sim estabelecido de acordo com imposições legais ou pelo cliente, e verificado através da leitura de um padrão com a mesma concentração, em termos de percentagem de recuperação. As Tabelas 4.9 e 4.10 apresentam os resultados obtidos que permitem verificar o limite de quantificação estabelecido de 2 µg/L para o crómio e manganês, de 20 µg/L para o ferro, de 0,25 mg/L para o cobre e de 0,1 mg/L para o magnésio.

Tabela 4.9 – Verificação do limite de quantificação para os métodos implementados em GFAAS, considerando os resultados obtidos para o padrão de controlo com a mesma concentração estabelecida para o limite de quantificação.

	Crómio	Ferro	Manganês
Nº ensaios	14	10	10
Média	2,003	21,478	1,939
Desvio Padrão	0,183	1,710	0,200
CV (%)	9,1	8,0	10,3
Recuperação (%)	100,1	107,3	96,9

Tabela 4.10 – Verificação do limite de quantificação para os métodos implementados em FAAS, considerando os resultados obtidos para o padrão de controlo com a mesma concentração estabelecida para o limite de quantificação.

	Cobre	Magnésio
Nº ensaios	17	16
Média	0,247	0,099
Desvio Padrão	0,011	0,005
CV (%)	4,4	5,2
Recuperação (%)	98,6	98,7

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 4.9 e 4.10 é possível verificar para todos os elementos o cumprimento do critério definido para o coeficiente de variação de 10 %, bem como percentagens de recuperação próximas dos 100 %, o que permite afirmar que os limites de quantificação estabelecidos para cada método estão definidos corretamente.

4.4.2. Limite de Detecção

O limite de detecção é definido como a menor quantidade de analito numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada. É determinado a partir do rearranjo da equação (2.7), dado que o número de ensaios efetuados é inferior a 30. A constante 3,3 é substituída pelo valor crítico da distribuição de *Student* adequado a cada situação particular, uma vez que está dependente do número de ensaios. Então, o LD é dado por:

$$LD = t_{0,05(m-1)} \times s \quad (4.1)$$

onde, $t_{0,05(m-1)}$ é o valor crítico da distribuição de *t-student*, com $m-1$ graus de liberdade e nível de significância de 0,05, m é o número de ensaios realizados, e s o desvio padrão associado à média de várias réplicas (no mínimo 10) de um padrão ou branco fortificado.

A Tabela 4.11 apresenta os valores do limite de detecção obtidos para os métodos de análise implementados em GFAAS e FAAS.

Tabela 4.11 – Limite de detecção dos métodos implementados em GFAAS e FAAS.

Crómio	Ferro	Manganês	Cobre	Magnésio
0,40 µg/L	3,76 µg/L	0,45 µg/L	0,02 mg/L	0,01 mg/L

Segundo o D.L nº 306/2007, está definido para o limite de detecção até 10 % do valor paramétrico. Assim, e tendo em conta os valores paramétricos dos elementos, com o método que está a ser implementado conseguimos para todos eles cumprir o definido na legislação.

4.5. Sensibilidade

Para métodos que envolvam curva de calibração, a sensibilidade é definida como a derivada de primeira ordem da curva de calibração. No caso particular da espectrometria de absorção atómica, a sensibilidade adquire um significado diferente. É definida em termos de concentração característica, que corresponde à concentração mínima do elemento que conduz a um sinal de absorvância de 0,0044, o equivalente à absorção de 1 % da radiação transmitida. O laboratório definiu internamente o critério para a concentração característica, tendo considerado o método sensível caso a concentração característica seja ≥ 80 % do valor de referência indicado pelo fabricante.

A determinação da concentração característica de cada método é realizada pela leitura do padrão de concentração mais alta da curva de calibração, e calculada pela equação seguinte:

$$C.C (mg/L) = \frac{C_{pad} \times 0,0044}{Abs_{pad}} \quad (4.2)$$

tal que C_{pad} corresponde à concentração do último padrão da curva de calibração em mg/L e Abs_{pad} corresponde ao sinal de absorvância obtido para esse padrão.

Para o cálculo da concentração característica quando é utilizada a técnica GFAAS, é necessário ter em conta o volume de amostra introduzido no tubo. Assim, é calculada da seguinte forma:

$$C.C (pg) = \frac{C_{pad} \times V \times 0,0044}{Abs_{pad}} \times 10^6 \quad (4.3)$$

tal que C_{pad} corresponde à concentração do último padrão da curva de calibração em $\mu\text{g/L}$, V é o volume total de amostra introduzido no tubo em litros e Abs_{pad} corresponde ao sinal de absorvância obtido para esse padrão.

Os resultados obtidos para a avaliação da sensibilidade dos métodos desenvolvidos em GFAAS e FAAS são apresentados nas Tabelas 4.12 e 4.13, respetivamente.

Tabela 4.12 – Determinação da concentração característica para os métodos implementados em GFAAS.

	Crómio	Ferro	Manganês
$\lambda / (\text{nm})$	357,8	372,0	279,5
Valor Referência/ (pg)	0,72	15	0,57
C.C./ (pg)	1,26	14,2	0,58

Tabela 4.13 – Determinação da concentração característica para os métodos implementados em FAAS.

	Cobre	Magnésio
$\lambda / (\text{nm})$	324,8	285,2
Valor Referência/ (mg/L)	0,041	0,003
C.C./ (mg/L)	0,04	0,004

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 4.12 e 4.13, é possível verificar que para todos os metais, o valor da concentração característica cumpre o critério de aceitação

estabelecido pelo laboratório ($\geq 80\%$ do valor de referência), pelo que podemos afirmar que os métodos apresentam boa sensibilidade.

A sensibilidade é avaliada no início de cada sessão de análise através da leitura do padrão de maior concentração e convertida em concentração característica. Os gráficos das Figuras 4.1 e 4.2 apresentam os resultados obtidos para avaliação da sensibilidade, através da concentração característica, em GFAAS e FAAS, respetivamente.

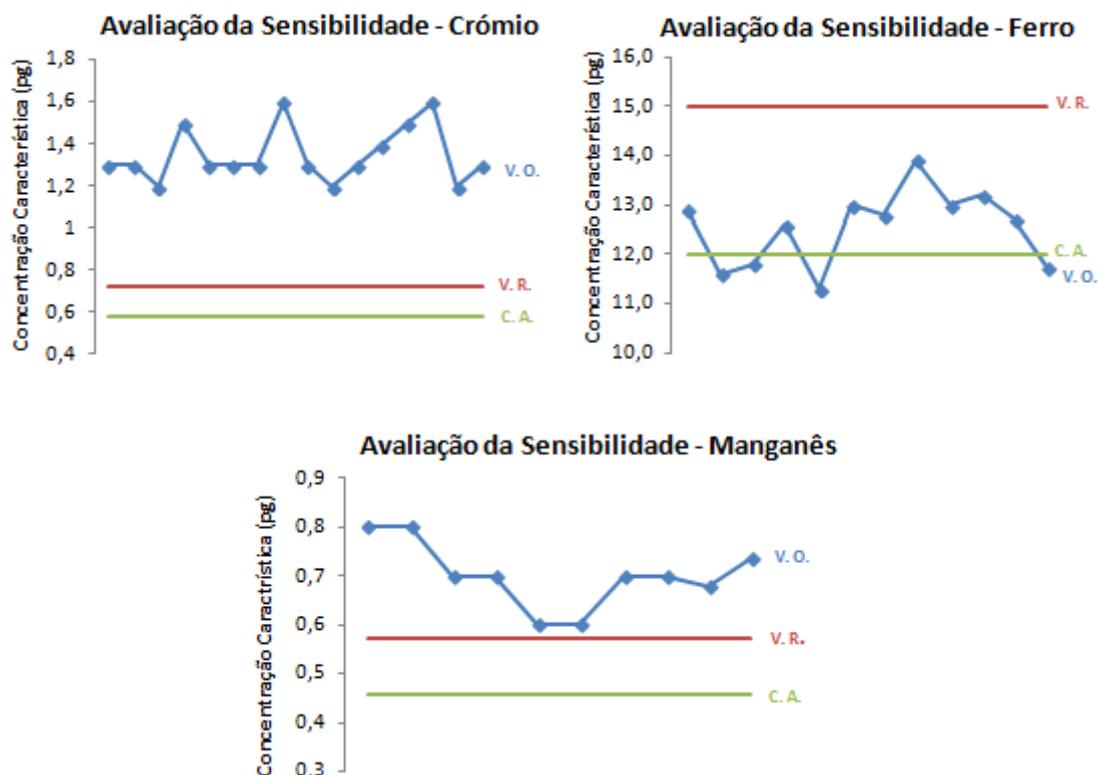


Figura 4.1 – Gráficos representativos da avaliação diária da sensibilidade, em termos de concentração característica, para o método do Crómio, Ferro e Manganês, implementados em GFAAS. (V.R. – valor de referência; V. O. – valores obtidos; C. A. – critério de aceitação)

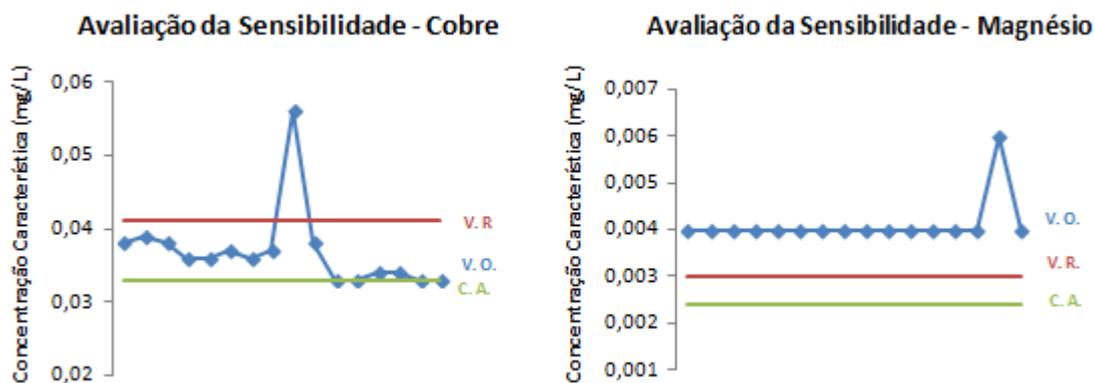


Figura 4.2 – Gráficos representativos da avaliação diária da sensibilidade, em termos de concentração característica, para o método do Cobre e Magnésio, implementados em FAAS. (V.R. – valor de referência; V. O. – valores obtidos; C. A. – critério de aceitação)

De acordo com os gráficos das Figuras 4.1 e 4.2 é possível observar que, com exceção do ferro, a sensibilidade do método é mantida ao longo das análises realizadas, uma vez que os valores de concentração característica obtidos cumprem o critério estabelecido ($\geq 80\%$ do valor de referência). Os pontos abaixo do critério de aceitação observados no caso do ferro, bem como os pontos discrepantes observados no caso do cobre e do magnésio, podem ser justificados pela preparação do padrão de calibração afetado de um erro por defeito no caso do ferro, e por excesso no caso do cobre e do magnésio.

4.6. Precisão

A dispersão dos resultados entre ensaios independentes permite-nos avaliar a precisão do método. Esta dispersão pode ser estimada recorrendo a duplicados de análise, de modo que o desvio entre duplicados não ultrapasse os 10 %, em condições de repetibilidade, pela determinação do limite de repetibilidade e em condições de precisão intermédia, em que é variada uma das condições de análise, por exemplo, dias de análise. Os gráficos das Figuras 4.3 a 4.7 mostram os resultados obtidos para os desvios relativos de duplicados de amostras e padrões de controlo, com recurso a cartas de controlo de indivíduos.

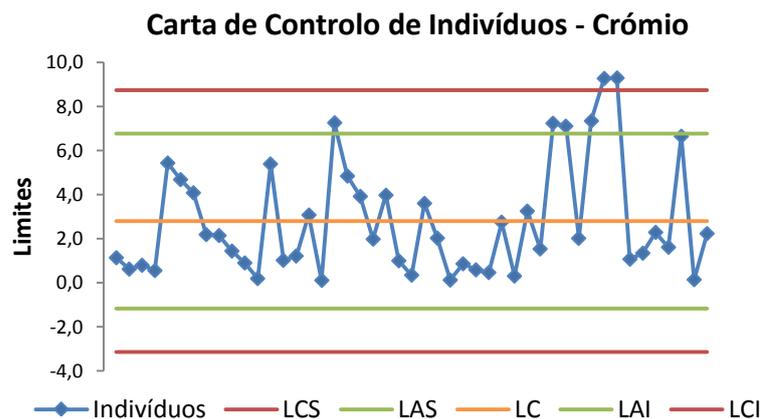


Figura 4.3 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos desvios relativos de duplicados de amostras e padrões de controlo, para avaliação da precisão do método de análise de crómio em GFAAS.

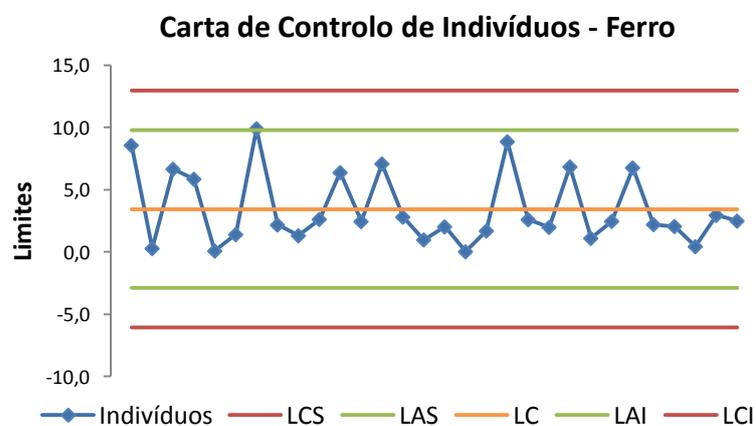


Figura 4.4 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos desvios relativos de duplicados de amostras e padrões de controlo, para avaliação da precisão do método de análise de ferro em GFAAS.

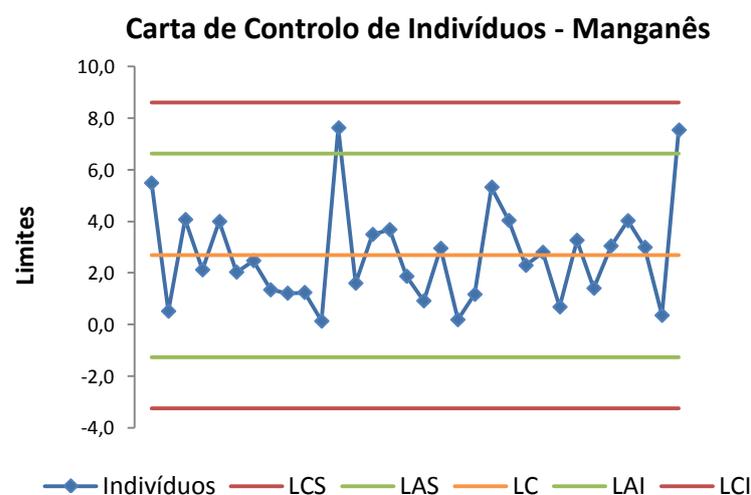


Figura 4.5 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos desvios relativos de duplicados de amostras e padrões de controlo, para avaliação da precisão do método de análise de manganês em GFAAS.

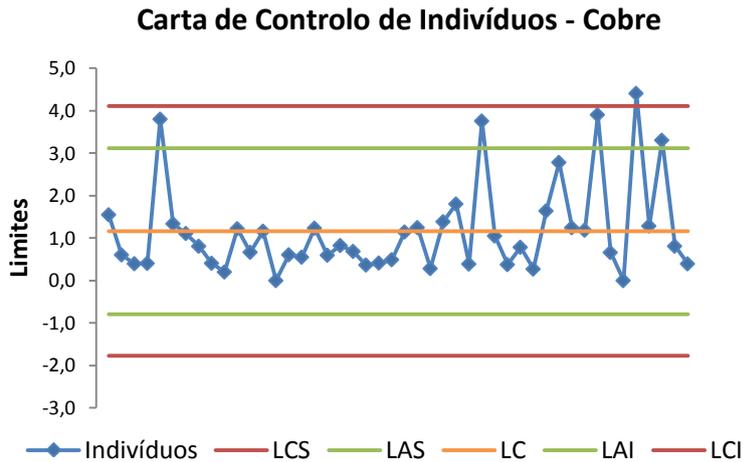


Figura 4.6 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos desvios relativos de duplicados de amostras e padrões de controlo, para avaliação da precisão do método de análise de cobre em FAAS.

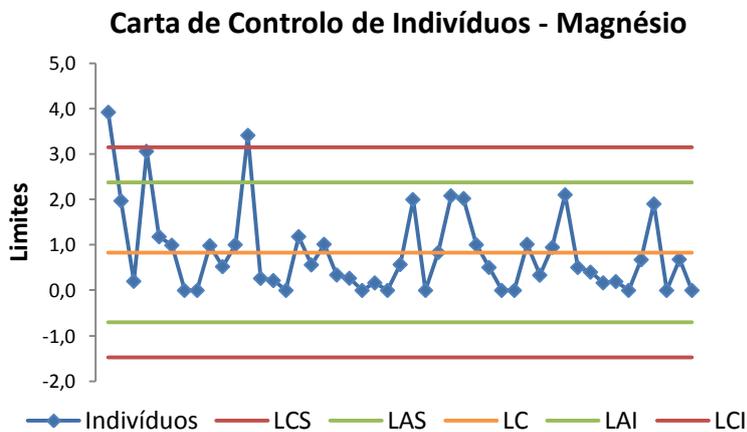


Figura 4.7 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos desvios relativos de duplicados de amostras e padrões de controlo, para avaliação da precisão do método de análise de magnésio em FAAS.

A utilização das cartas de controlo de indivíduos na avaliação da precisão dos métodos deveu-se ao facto de, devido à grande variabilidade nos resultados obtidos para os desvios relativos de amostras e padrões de controlo, não ter sido possível determinar o coeficiente de variação, não tendo como objetivo a avaliação de tendências. Assim, por visualização direta das cartas de controlo das Figuras 4.3 a 4.7 obtidas para todos os metais, é possível verificar que a percentagem dos desvios relativos para os duplicados cumpre o critério de aceitação de 10 %, uma vez que para todos os casos, o limite superior de aviso é inferior a 10.

Para além de ser possível verificar com as cartas de controlo a variabilidade obtida, é também possível avaliar se o critério de aceitação inicialmente definido para cada elemento está ajustado à realidade. Nas Figuras 4.6 e 4.7, a observação dos limites da carta de controlo

próximos de 5 % permite suspeitar que o critério de 10 % para a aceitação do desvio de duplicados poderá estar eventualmente desajustado.

4.6.1. Repetibilidade

Uma das formas que pode ser utilizada para verificar se o método é preciso, é a partir do cálculo do limite de repetibilidade que nos indica qual o afastamento máximo, em valor absoluto, admissível entre dois ensaios. Assim, em condições de repetibilidade, foram realizadas 10 réplicas para os padrões dos limites da gama de trabalho e para o padrão intermédio da curva de calibração, de forma a avaliar a precisão em toda a gama de trabalho. A determinação do limite de repetibilidade é feita sobre os valores de concentração obtidos em cada réplica de cada padrão, pois assim é possível detetar se algum valor é afetado de um erro aleatório. Os resultados obtidos para os elementos analisados por GFAAS e FAAS estão apresentados nas Tabelas 4.14 e 4.15, respetivamente.

Tabela 4.14 – Determinação do limite de repetibilidade, Δr , para padrões equidistantes da curva de calibração, para os metais analisados por GFAAS, recorrendo ao Teste *t-Student* bilateral com um grau de confiança de 95 %.

Réplicas	Crómio			Ferro			Manganês		
	P ₁ [Cr] µg/L	P ₃ [Cr] µg/L	P ₅ [Cr] µg/L	P ₁ [Fe] µg/L	P ₃ [Fe] µg/L	P ₅ [Fe] µg/L	P ₁ [Mn] µg/L	P ₃ [Mn] µg/L	P ₅ [Mn] µg/L
1	1,832	6,229	10,314	21,712	63,056	100,904	1,846	5,800	10,430
2	1,859	6,158	10,270	22,000	64,930	105,174	1,837	5,714	9,802
3	1,742	6,283	10,369	21,652	65,007	101,067	1,830	5,719	10,523
4	2,022	6,104	10,420	22,982	62,972	101,677	1,821	5,734	9,860
5	1,844	6,198	10,532	23,522	63,191	103,051	1,843	6,429	9,917
6	1,856	6,144	10,086	22,668	64,206	102,379	1,839	6,134	10,066
7	1,891	6,216	10,467	22,247	63,941	101,162	1,774	5,754	9,919
8	1,895	6,249	10,423	21,619	64,077	103,822	1,790	5,635	9,409
9	1,912	6,179	10,943	21,886	67,916	102,787	1,858	5,724	9,638
10	1,955	6,207	10,672	22,120	67,459	101,689	1,852	5,637	10,290
Média	1,881	6,197	10,450	22,241	64,675	102,371	1,829	5,828	9,985
Desvio-Padrão	0,075	0,053	0,234	0,631	1,741	1,369	0,027	0,254	0,349
Δr	0,240	0,168	0,747	2,019	5,569	4,378	0,086	0,812	1,117
CVr (%)	4,00	0,85	2,24	2,84	2,69	1,34	1,47	4,35	3,50

Legenda: P₁ – primeiro padrão da curva de calibração; P₃ – terceiro padrão da curva de calibração; P₅ – último padrão da curva de calibração.

Tabela 4.15 – Determinação do limite de repetibilidade, Δr , para padrões equidistantes da curva de calibração, para os metais analisados por FAAS, recorrendo ao Teste t-Student bilateral com um grau de confiança de 95 %.

Réplicas	Cobre			Magnésio		
	P ₁ [Cu] mg/L	P ₃ [Cu] mg/L	P ₅ [Cu] mg/L	P ₁ [Mg] mg/L	P ₃ [Mg] mg/L	P ₅ [Mg] mg/L
1	0,256	1,015	2,027	0,113	0,431	0,810
2	0,259	1,017	2,039	0,112	0,425	0,808
3	0,260	1,020	2,042	0,112	0,431	0,804
4	0,260	1,013	2,013	0,109	0,434	0,805
5	0,260	1,018	2,045	0,114	0,429	0,811
6	0,262	1,020	2,044	0,114	0,424	0,807
7	0,261	1,028	2,031	0,113	0,433	0,810
8	0,261	1,019	2,035	0,113	0,431	--- ^{a)}
9	0,266	1,023	2,039	0,111	0,432	0,808
10	0,265	1,032	2,034	0,113	0,427	0,809
Média	0,261	1,021	2,035	0,112	0,430	0,808
Desvio-Padrão	0,003	0,006	0,010	0,002	0,003	0,002
Δr	0,009	0,019	0,031	0,005	0,011	0,008
CVr (%)	1,10	0,57	0,47	1,34	0,78	0,29

Legenda: P₁ – primeiro padrão da curva de calibração; P₃ – terceiro padrão da curva de calibração; P₅ – último padrão da curva de calibração.

a) Valor eliminado por ser considerado discrepante pelo Teste de Grubbs

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 4.14 e 4.15 para a avaliação da repetibilidade, é possível observar, com uma confiança de 95 %, baixos limites de repetibilidade, e baixos coeficientes de variação de repetibilidade para cada um dos padrões de cada metal, sendo inferiores a 10 % (critério de aceitação definido pelo laboratório). A repetibilidade é tanto melhor, quanto menor a percentagem do coeficiente de variação. Podemos então afirmar que para todos os metais existe repetibilidade ao longo da gama de trabalho, isto é, a dispersão é suficientemente baixa para que exista precisão nos resultados obtidos.

4.6.2. Precisão Intermédia

A precisão intermédia é a melhor forma de avaliar a precisão de um método uma vez que representa a maior variabilidade dos resultados, na qual se define exatamente qual/quais a/as condição/ões do método a variar. A avaliação da precisão intermédia é feita com recurso a padrões de controlo com diferentes concentrações, analisados em dias diferentes. Os resultados obtidos para os métodos a implementar em GFAAS e FAAS são apresentados nas Tabelas 4.16 e 4.17, respetivamente.

Tabela 4.16 – Avaliação da precisão intermédia, com recurso a padrões de controlo com concentrações e intervalos temporais diferentes, dos métodos implementados em GFAAS.

	Crómio		Ferro		Manganês	
	Pc 2 µg/L	Pc 6 µg/L	Pc 20 µg/L	Pc 60 µg/L	Pc 2 µg/L	Pc 6 µg/L
Nº ensaios	16	16	11	12	12	12
Média	2,004	5,900	21,468	60,939	1,954	5,851
Desvio Padrão	0,175	0,422	1,710	4,308	0,197	0,404
CV (%)	8,7	7,2	8,0	7,1	10,1	6,9

Legenda: Pc – padrão de controlo.

Tabela 4.17 – Avaliação da precisão intermédia, com recurso a padrões de controlo com concentrações e intervalos temporais diferentes, dos métodos implementados em FAAS.

	Cobre		Magnésio	
	Pc 0,25 mg/L	Pc 1,5 mg/L	Pc 0,1 mg/L	Pc 0,6 mg/L
Nº ensaios	17	17	16	16
Média	0,247	1,461	0,099	0,593
Desvio Padrão	0,011	0,030	0,005	0,014
CV (%)	4,4	2,0	5,2	2,4

Legenda: Pc – padrão de controlo.

De acordo com os resultados obtidos nas Tabelas 4.16 e 4.17 é possível verificar que todos os métodos em fase de implementação cumprem o critério de 10 % definido para o coeficiente de variação, podendo-se afirmar que os métodos se encontram em condições de precisão intermédia. Observa-se para os padrões de controlo no limite de quantificação um valor de coeficiente de variação superior relativamente aos padrões de maior concentração da gama analítica de cada metal, pois podem estar associados erros aleatórios devido à maior incerteza na medição de volume de padrão.

4.7. Exatidão

A exatidão é uma medida de aproximação entre o resultado obtido experimentalmente e o valor de referência aceite como verdadeiro. Uma forma de avaliar a exatidão do método é através de testes de recuperação. Os gráficos das Figuras 4.8 a 4.12 mostram os resultados obtidos para os ensaios de recuperação, com recurso a cartas de controlo de indivíduos.

Carta de Controlo de Indivíduos - Crómio

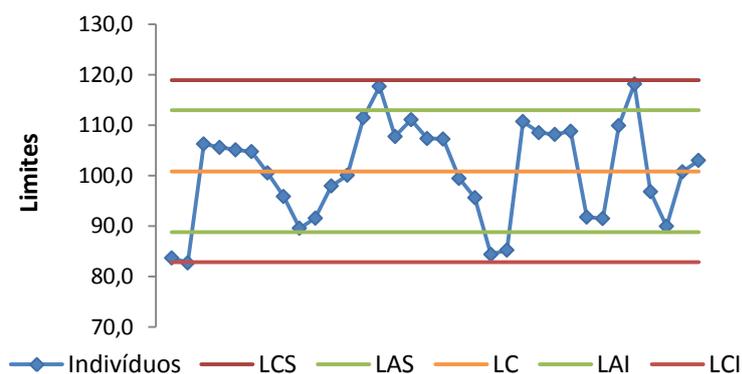


Figura 4.8 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método de análise de crómio em GFAAS.

Carta de Controlo de Indivíduos - Ferro

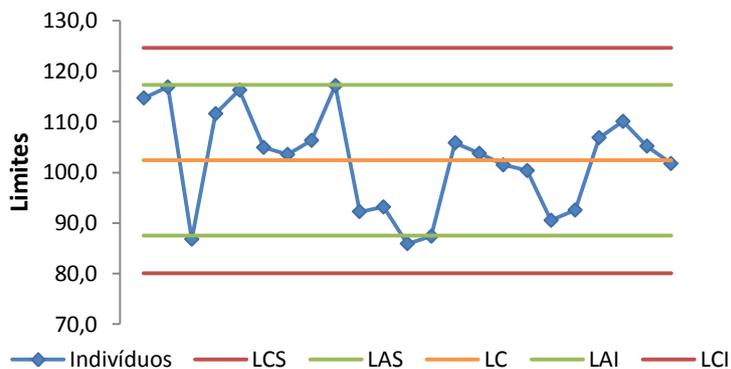


Figura 4.9 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método de análise de ferro em GFAAS.

Carta de Controlo de Indivíduos - Manganês

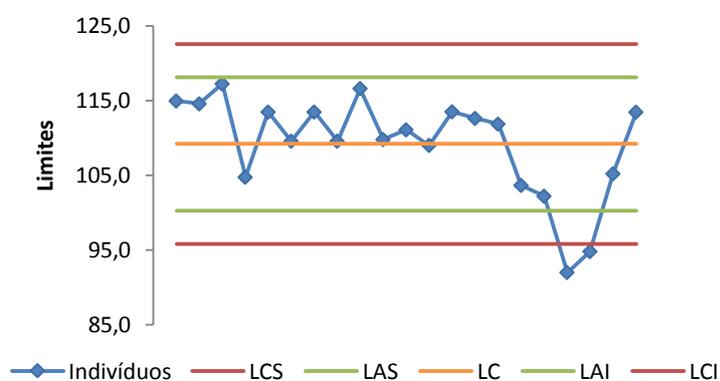


Figura 4.10 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método de análise de manganês em GFAAS.

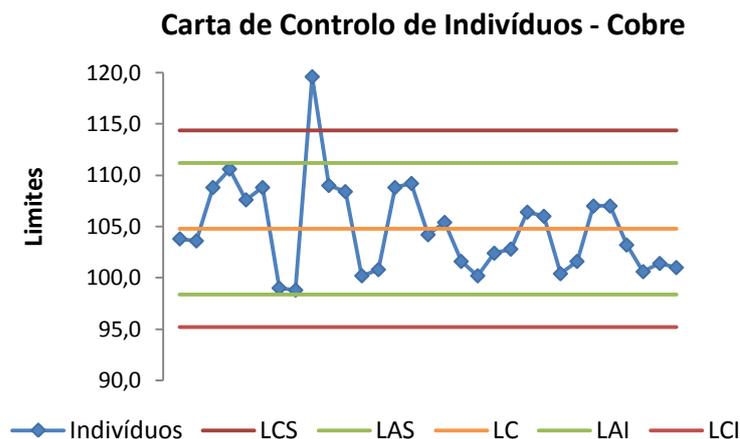


Figura 4.11 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método de análise de cobre em FAAS.

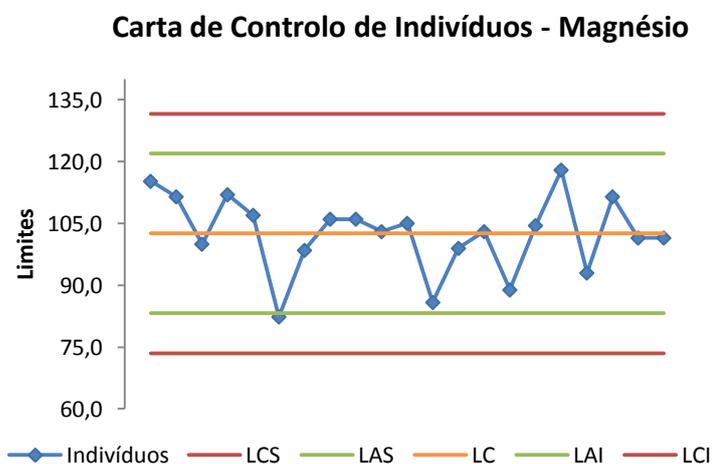


Figura 4.12 – Carta de controlo de indivíduos, representativa dos ensaios de recuperação para avaliação da exatidão do método de análise de magnésio em FAAS.

Com recurso a cartas de controlo de indivíduos, a exatidão dos métodos pode ser avaliada de duas formas, de acordo com o critério de aceitação para os ensaios de recuperação e de acordo com a definição de exatidão. Pela observação direta das cartas de controlo de indivíduos das Figuras 4.8 a 4.12, obtidas para todos os elementos, verifica-se o cumprimento do critério de aceitação de 80 – 120 % para os ensaios de recuperação, tal que é possível observar que o desvio da média dos resultados relativamente ao valor aceite como verdadeiro (100 %) é inferior a 10 % para todos os elementos. Foram obtidos os coeficientes de variação relativamente à média de 9,9 %, 9,7 %, 6,1 %, 4,3 % e 9,0 % para o crómio, ferro, manganês, cobre e magnésio, respetivamente. Assim, podemos afirmar que os métodos analíticos desenvolvidos são exatos.

4.8. Incerteza

Numa qualquer medição, o resultado que dela advém está sujeito a algum nível de erro associado, proveniente de várias fontes. A estimativa da incerteza associada a uma medição indica o quão grande esse erro pode ser, e não deve implicar dúvida na validade de uma medição, mas sim o reconhecer do aumento da confiança na validade de um resultado.

Existem várias metodologias para a quantificação da incerteza da medição. A utilizada neste trabalho, de acordo com a norma ISO 11352, foi a abordagem baseada em dados de validação e do controlo interno da qualidade, que consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e exatidão. A incerteza associada à precisão, u_{Rw} , foi calculada considerando o coeficiente de variação obtido para duplicados e o valor mais alto do coeficiente de variação obtido para os padrões de controlo. A incerteza associada à exatidão, u_b , foi determinada com base em ensaios de recuperação, e são consideradas duas componentes, a diferença entre a recuperação observada e a recuperação completa, b_{rms} , e a incerteza no volume de analito adicionado, u_{add} .

Nas Tabelas 4.18 e 4.19, estão apresentados os resultados obtidos para cada componente de incerteza, bem como a incerteza combinada e expandida, associadas aos métodos desenvolvidos em GFAAS e FAAS, respetivamente.

Tabela 4.18 – Estimativa da incerteza dos métodos implementados em GFAAS: incerteza associada à precisão, u_{Rw} ; diferença entre a recuperação observada e a recuperação completa, b_{rms} ; incerteza no volume de analito adicionado, u_{add} ; incerteza associada à exatidão, u_b ; incerteza combinada, u_c ; incerteza expandida, U .

	Crómio	Ferro	Manganês
$u_{Rw}(\%)$	9,08	8,52	10,36
$b_{rms}(\%)$	9,47	9,44	5,98
$u_{add}(\%)$	2,25	1,04	2,25
$u_b(\%)$	9,73	9,50	6,39
$u_c(\%)$	13,31	12,76	12,17
$U(\%)$	27	26	24

Tabela 4.19 – Estimativa da incerteza dos métodos implementados em FAAS: incerteza associada à precisão, u_{Rw} ; diferença entre a recuperação observada e a recuperação completa, b_{rms} ; incerteza no volume de analito adicionado, u_{add} ; incerteza associada à exatidão, u_b ; incerteza combinada, u_c e incerteza expandida, U .

	Cobre	Magnésio
$u_{Rw}(\%)$	4,58	5,22
$b_{rms}(\%)$	4,20	8,79
$u_{add}(\%)$	0,98	0,91
$u_b(\%)$	4,31	8,84
$u_c(\%)$	6,29	10,27
$U(\%)$	13	21

Segundo o D.L 306/2007 a estimativa da incerteza associada à precisão e exatidão não deve ser superior a 10 %. De acordo com as Tabelas 4.18 e 4.19, o laboratório conseguiu para os métodos implementados em GFAAS e FAAS cumprir o critério estabelecido. No caso particular do manganês, a incerteza associada à precisão excedeu ligeiramente o critério imposto, não sendo visto ainda como problema devido ao pequeno número de ensaios.

Para os métodos validados por GFAAS, as incertezas expandidas obtidas foram de 27, 26 e 24 % para o crómio, ferro e manganês, respetivamente. As incertezas expandidas apresentadas quando comparadas com as obtidas para os métodos validados por FAAS, de 13 e 21 % para o cobre e magnésio respetivamente, mostram a maior suscetibilidade a pequenas variações devido à maior sensibilidade da GFAAS relativamente a FAAS.

Capítulo 5

Conclusão

A análise de metais em águas que se destinam ao consumo humano é de elevada importância devido aos efeitos tóxicos que podem ter no organismo humano. Deve ser feita por laboratórios analíticos competentes que garantam resultados fiáveis e credíveis no controlo de qualidade da água, de acordo com as imposições legais em vigor. Esta dissertação teve como objetivo a validação de métodos de análise dos elementos crómio, ferro, manganês, cobre e magnésio, por Espectrometria de Absorção Atómica com atomização em câmara de grafite e em chama, com vista a posterior acreditação dos mesmos.

O Decreto-Lei nº. 306/2007 de 27 de Agosto estabelece o regime legal da qualidade da água destinada ao consumo humano, onde são definidos os requisitos obrigatórios que os laboratórios de análise devem ter em conta, tais como, valores paramétricos e especificação de critérios para o limite de deteção, precisão e exatidão. A validação dos elementos crómio, ferro, manganês, cobre e magnésio foi realizada considerando os valores paramétricos definidos no decreto-lei referido de 50 µg/L, 200 µg/L, 50 µg/L, 2,0 mg/L, e 50 mg/L, respetivamente, e o critério de 10 % do valor paramétrico para o limite de deteção, precisão e exatidão dos métodos de análise dos elementos citados.

Considerando os requisitos do D.L 306/2007 de 27 de Agosto acima citados, a concentração dos elementos habitualmente existente em amostras de água de consumo e os valores de absorvância aceitáveis obtidos para os padrões dos extremos da gama, de acordo com o comprimento de onda selecionado, definiu-se a gama de trabalho de 2 – 10 µg/L para o crómio e manganês, de 20 – 100 µg/L para o ferro, de 0,25 – 2 mg/L para o cobre e de 0,1 – 0,8 mg/L para o magnésio. Conclui-se que existe homogeneidade de variâncias na gama analítica escolhida para cada elemento, com recurso ao Teste de Homogeneidade de Variâncias, e que de acordo com o Teste de *Mandel*, o modelo polinomial de primeiro grau é mais adequado para o ajuste da curva de calibração do método de análise do cobre e magnésio, e o polinómio de segundo grau para o ajuste da curva de calibração do método de análise do crómio, ferro e manganês.

O limite de deteção é um parâmetro importante a determinar pois permite saber qual a menor concentração detetada e que deve ser até 10 % do valor paramétrico do elemento a analisar. Os limites de deteção obtidos de 0,40 µg/L para o crómio, 3,76 µg/L para o ferro, 0,45 µg/L para o manganês, 0,02 mg/L para o cobre e 0,01 mg/L para o magnésio estão em conformidade com o critério estabelecido pelo D.L.

A avaliação da precisão e da exatidão dos métodos de análise é um ponto crucial na validação pois são consideradas como componentes do cálculo da incerteza do método, um parâmetro associado ao resultado, que fornece informação sobre a dimensão do erro a que ele é sujeito. A avaliação da precisão foi feita recorrendo a duplicados de análise, avaliados através de cartas de controlo de indivíduos, cujos desvios não ultrapassaram os 10 %; à determinação do limite de repetibilidade, situado entre 0,086 – 5,569 para os elementos analisados por GFAAS e 0,005 – 0,031 para os elementos analisados por FAAS, com coeficientes de variação de repetibilidade inferiores a 10 %; e em condições de precisão intermédia, recorrendo a padrões de controlo da análise, com coeficientes de variação obtidos que cumprem o critério de 10 %. Para a avaliação da exatidão, foram usadas cartas de controlo de indivíduos representativas da percentagem de recuperação de amostras fortificadas, verificando-se recuperações entre 80 – 120 %, e um desvio da média de resultados relativamente ao valor aceite como verdadeiro inferior a 10%. O cumprimento dos critérios estabelecidos permite-nos concluir que os métodos validados são precisos e exatos.

Com os métodos validados, foi determinada a incerteza associada a cada um tendo sido consideradas como componentes do cálculo a precisão e a exatidão dos métodos, cujas incertezas associadas não devem ultrapassar os 10 %. Foram obtidas incertezas expandidas de 27 % para o crómio, 26 % para o ferro, 24 % para o manganês, 13 % para o cobre e 21 % para o magnésio. Comparando as incertezas expandidas obtidas para os métodos validados em GFAAS com as obtidas para os métodos validados em FAAS, é fácil perceber a maior suscetibilidade a pequenas variações da GFAAS face à FAAS, devido à maior sensibilidade.

Podemos então concluir que os métodos de análise de crómio, ferro, manganês, cobre e magnésio por Espectrometria de Absorção Atómica com atomização em câmara de grafite e em chama, foram validados com sucesso. É assim possível requerer a acreditação dos mesmos.

A realização deste projeto foi muito gratificante a nível pessoal e profissional, que me permitiu envolver num ambiente de trabalho empresarial diferente do qual já tinha experienciado, bem como aplicar o conhecimento teórico adquirido ao longo do meu percurso académico.

Bibliografia

- [1] N. Rajvaidya e D. Markandey, *Water: Characteristics and Properties*, A.P.H. Publishing Corporation, 2005.
- [2] M. Gewehr, "A explosão demográfica: causas e consequências," [Online]. Available: www.boletimjuridico.com.br/doutrina/texto.asp?id=1372. [Acedido em 01 04 2017].
- [3] *Water Quality Monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Freshwater Quality Studies and Monitoring Programmes*, World Health Organization, 1996.
- [4] F. Scatena, "Drinking Water Quality," em *Drinking Water from Forests and Grasslands: A Synthesis of the Scientific Literature*, G. E. Dissmeyer, Ed., 2000.
- [5] N. Gray, *Drinking Water Quality: Problems and Solutions*, 2ª ed., Cambridge University Press, 2008.
- [6] *Decreto-Lei nº. 306/2007 de 27 de Agosto*.
- [7] "EPAL - Grupo Águas de Portugal," [Online]. Available: www.epal.pt. [Acedido em 07 04 2017].
- [8] "ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos," [Online]. Available: www.ersar.pt. [Acedido em 07 04 2017].
- [9] "Instituto Português de Acreditação," [Online]. Available: www.ipac.pt. [Acedido em 02 04 2017].
- [10] *Regulamento Geral de Acreditação (DRC001)*, IPAC, 2012.
- [11] *Requisitos Gerais de Competência para Laboratórios de Ensaio e Calibração (ISO/IEC 17025)*, IPAC, 2005.
- [12] J. Almeida e Â. Pires, *Acreditação: Vantagens e dificuldades da implementação de um Sistema da Qualidade num laboratório de ensaio e/ou calibração*, 2006.
- [13] *Procedimento para acreditação de laboratórios (DRC005)*, IPAC, 2012.
- [14] *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens*, New York, 2009.
- [15] *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, Lisboa:Relacre, 2000.
- [16] *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.

- [17] *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.
- [18] *Guia para a acreditação de laboratórios químicos (OGC 002)*, IPAC, 2011.
- [19] *Guidelines for the Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural and Veterinary Chemical Products*, Australian Pesticides & Veterinary Medicines Authority, 2004.
- [20] N. Brito, O. P. L. Junior e M. Ribeiro, “Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão,” *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, vol. 13, pp. 129-146, 2003.
- [21] *Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*, Lisboa:Relacre, 1996.
- [22] *Guia Relacre 7 - Ensaio Interlaboratoriais em Química*, Lisboa:Relacre, 1996.
- [23] *Manual de Validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa da incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial*, 2014.
- [24] *Guide to the Expression of uncertainty in measurement (GUM)*, 2005.
- [25] *Guidelines for estimating and reporting measurement uncertainty of chemical test results (Technical Note 33)*, NATA, 2013.
- [26] *Guide 4 - Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements*, Eurachem/CITAC, 2012.
- [27] *Water quality estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data (ISO 11352)*, International Standard Organization, 2012.
- [28] *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos (OGC007)*, IPAC, 2007.
- [29] *Guide 104 - Guide for Estimation of Measurement Uncertainty in Testing*, American Association for Laboratory Accreditation, 2014.
- [30] M. Jaishankar, T. Tseten, N. Anbalagan, B. Mathew e K. Beeregowda, “Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals,” *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 7, pp. 60-72, 2014.
- [31] P. Tchounwou, C. Yedjou, A. Patlolla e D. Sutton, “Heavy Metals Toxicity and the Environment,” *National Institutes of Health*, vol. 101, pp. 133-164, 2012.
- [32] M. Tuzen e M. Soylak, “Evaluation of Metal Levels of Drinking Waters from the Tokat-Black Sea Region of Turkey,” *Polish Journal of Environmental Studies*, vol. 15, pp. 915-919, 2006.
- [33] A. Zhitkovich, “Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks,” *Chemical Research in Toxicology*, vol. 24, pp. 1617-1629, 2011.
- [34] *Iron in Drinking-Water*, World Health Organization, 2003.
- [35] *Manganese in Drinking-Water*, World Health Organization, 2011.

- [36] "Manganese," [Online]. Available: www.lenntech.com. [Acedido em 23 12 2016].
- [37] R. Wright e A. Baccarelli, "Metals and Neurotoxicology," *Journal of Nutrition*, vol. 137, pp. 2809-2813, 2007.
- [38] J. Doebrich, *Copper - A Metal for the Ages*, USGS Mineral Resources Program, 2009.
- [39] *Copper in Drinking- Water*, World Health Organization, 2004.
- [40] "Magnesium," [Online]. Available: www.lenntech.com. [Acedido em 16 02 2017].
- [41] *Calcium and Magnesium in Drinking - Water*, World Health Organization, 2009.
- [42] *Magnesium - Office of Dietary Supplements*, National Institute of Health.
- [43] R. Flanagan, A. Taylor, I. Watson e R. Whelpton, "Trace Elements and Toxic Metals," em *Fundamentals of Analytical Toxicology*, Wiley, 2008, pp. 281-307.
- [44] R. García e A. Báez, "Atomic Absorption Spectrometry (AAS)," em *Atomic Absorption Spectroscopy*, InTech, 2012.
- [45] "Modern Instrumental Analysis," em *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 47, Elsevier, 2006, pp. 227-246.
- [46] R. Levinson, *More Modern Chemical Techniques*, The Royal Society of Chemistry, 2001.
- [47] *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*, The Perkin-Elmer Corporation, 1996.
- [48] J. Van Loon, *Analytical Atomic Absorption Spectroscopy: Selected Methods*, Academic Press, 1980.
- [49] *UNICAM AAS Methods Manual*, 2000.
- [50] W. Elwell e J. Gidley, "Atomic-Absorption Spectrophotometry," em *International Series of Monographs on Analytical Chemistry*, Pergamon Press, 1975.
- [51] L. Lajunen e P. Perämäki, *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, Royal Society of Chemistry, 2004.
- [52] Skoog, West, Holler e Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, Thomson, 2006.
- [53] *Fundamentals, Instrumentation and Techniques of Atomic Absorption Spectrometry*, Analytik Jena.
- [54] *ICE 3000 Series Atomic Absorption Spectrometers Operators Manual v2.0*, Thermo Fisher Scientific, 2011.
- [55] D. Butcher e J. Sneddon, *A Practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley & Sons, 1998.

- [56] J. Holcombe, *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2006.
- [57] *Method 200.9: Determination of Trace Elements by Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption*, Environmental Protection Agency (EPA), 1994.
- [58] *Method 7000B: Flame Atomic Absorption Spectrophotometry*, Environmental Protection Agency (EPA), 1998.
- [59] *Procedimento para a Colheita de Amostras de Água para Consumo Humano em Sistemas de Abastecimento*, ERSAR nº 01/2017.
- [60] A. P. H. Association, *Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater*, 21 ed., A. Eaton e M. Franson, Edits., American Public Health Association, 2005.
- [61] *Method 3015A: Microwave Assisted Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts*, Environmental Protection Agency (EPA), 2007.
- [62] *Guidelines for Drinking-water Quality*, 4 ed., World Health Organization , 2011.