



Ana Margarida Droquete Salsas

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Métodos Analíticos
à Pequena Escala
no Laboratório de Beirolas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Doutora Eugénia Cardoso, EPAL
Co-orientador: Professor Doutor Mário Eusébio, FCT-
UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Madalena Alves Campos de Sousa
Dionísio Andrade

Arguente: Dr.^a Joana Santos Jorge

Vogal: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março 2017

Ana Margarida Droguete Salsas

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Validação de Métodos Analíticos
à Pequena Escala
no Laboratório de Beirolas**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química e Bioquímica

Orientadora: Doutora Eugénia Cardoso, EPAL
Co-orientador: Professor Doutor Mário Eusébio, FCT-
UNL

Março 2017

Validação de Métodos Analíticos à Pequena Escala no Laboratório de Beirolas

Copyright © 2017

Ana Margarida Drogue Salsas

Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar aos meus pais por todo o apoio incondicional, conselhos e empenho que sempre demonstraram para me acompanhar em cada etapa do meu percurso académico. A eles devo quem sou e por isso agradeço todos os dias a sorte de tê-los comigo! Ao meu irmão e à minha avó por serem pessoas determinantes e sempre presentes na minha vida, dando-me a confiança necessária para alcançar os meus sonhos.

Obrigado a todos os meus amigos e restante família que estiveram presentes em cada momento importante.

Agradeço à Dra. Eugénia Cardoso por ser a minha orientadora da dissertação, bem como ao Professor Mário Eusébio, meu co-orientador, que me acompanharam durante esta fase académica tão importante. Agradeço a vossa disponibilidade, apoio e cordialidade. Agradeço também da mesma forma à Eng^a. Carla Silva por demonstrar sempre disponibilidade ao longo do trabalho.

Ao Daniel Esteves pela sua disponibilidade, pela partilha de conhecimentos e pelos comentários construtivos.

Agradeço ao Eng. Guiomar Medeiros pela disponibilidade e pelos conhecimentos partilhados na fase final da dissertação.

Um obrigado extensivo a todos os que acompanharam o meu percurso na empresa.

Resumo

A escolha dos laboratórios de águas residuais, para implementar os micro métodos, comumente designados por *kits* prende-se na necessidade de ter métodos de fácil execução, mais ecológicos e que fornecem resultados em pouco tempo.

Estudou-se a validação dos micro métodos para a Carência Química de Oxigénio (CQO) baseado na norma ISO 15705:2002 e Azoto Total (NT) baseado na ISO 11905-1:1997, seguindo os requisitos previstos na norma ISO 8466-1:1990, ISO 8466-2:2001 e no Guia Relacre nº13. Foram avaliados a linearidade, limiares analíticos, gama de trabalho, precisão e exatidão.

As gamas estudadas no parâmetro CQO foram as gamas da Hach Lange®, LCK 1414 [5-60] mg/L O₂, LCK 314 [15-150] mg/L O₂ e LCK 1014 [100-2000] mg/L O₂.

Verificou-se que havia linearidade para todas as gamas, com coeficientes de correlação superiores a 0,995 e obteve-se resultados positivos no teste de Mandel. Os limiares analíticos estimados pelas curvas de calibração foram sempre superiores aos limites inferiores das gamas do fornecedor (valor médio de 8 mg/L O₂ - LCK 1414, 19 mg/L O₂ - LCK 314 e 256 mg/L O₂ - LCK 1014). Foi apenas observada homogeneidade das variâncias na gama LCK 314 (PG (99%) = 2,45), tendo falhado nas outras gamas (LCK 1414 - PG (99%) = 17,27; LCK 1014 - PG (99%) = 93,14), devido à grande diferença da ordem de grandeza das variâncias no início e fim de gama. Para ultrapassar a falta de homogeneidade fez-se uma análise da ponderada e dos intervalos de confiança, de onde se concluiu que as gamas do fornecedor estavam validadas.

Nas análises feitas de duplicados verificaram-se amplitudes médias relativas baixas (LCK 1414 - 5%; LCK 314 - 7% e LCK 1014 - 4%).

A exatidão foi testada através de um MRC, que esteve sempre dentro do critério de erro relativo (15%), e com coeficiente de variação inferior a 10%. Os testes de recuperação com analito denunciaram um efeito matriz nas gamas intermédia e alta, necessitando de uma análise mais aprofundada. A incerteza expandida foi de 18% - LCK 1414, 22% - LCK 314 e 16% - LCK 1014.

Para o NT foram estudadas as gamas [1-16] mg/L NT, [5-40] mg/L NT e [20-100] mg/L NT. Verificou-se que havia linearidade para todas as gamas, com coeficientes de correlação superiores a 0,995 e com resultados positivos no teste de Mandel.

Este trabalho contribui para a validação do micro método da CQO, (faltando apenas a realização de ensaios interlaboratoriais e alguns em precisão intermédia), e para iniciar a validação do NT.

Palavras-Chave: Água residual; Validação; Micro Métodos Analíticos; CQO; NT; Estatística

Abstract

The choice of the wastewater laboratories to implement the micro methods, commonly known as “test-kits”, have simplified analysis even further, made it environmentally friendly and improve the time spent obtaining results.

We have studied micro methods validation for Chemical Oxygen Demand (COD) based on ISO 15705:2002 and Total Nitrogen (TN) based on ISO 11905-1:1997, it was following the requirements according to the criteria established on ISO 8466-1:1990, ISO 8466-2:2001 and Relacre Guide n°13. Evaluating the linearity, analytical thresholds, working range, precision, and accuracy.

The working ranges studied on the COD parameter have been the Hach Lange®’s ranges, LCK 1414 [5-60] mg/L O₂, LCK 314 [15-150] mg/L O₂ and LCK 1014 [100-2000] mg/L O₂. It was observed linearity in all ranges with correlation coefficient higher than 0,995 and obtained positive results in the Mandel’s fitting test. The analytical thresholds were always higher than the lower limits of the supplier’s ranges (mean value of 8 mg/L O₂ - LCK 1414, 19 mg/L O₂ - LCK 314 and 256 mg/L O₂ - LCK 1014), when estimated by the calibration curves. It was only observed homogeneity of the variances in the LCK 314 (PG (99%) = 2,45) range, had failed for other ranges (LCK 1414 - PG (99%) = 17,27; LCK 1014 - PG (99%) = 93,14), due to the large difference in order of magnitude of variances at the beginning and end of range. To overcome the lack of homogeneity, we analyzed the weighted regression line and confidence intervals, and it has concluded that the supplier’s ranges could be validated.

Duplicate analyzes showed low relative average amplitudes (LCK 1414 - 5%, LCK 314 -7% and LCK 1014 - 4%).

The accuracy was evaluated through an MRC, which was always within in criteria of relative error (15%), and with a coefficient of variation of less than 10%. Spiking sample tests reported a matrix effect on the intermediate and high ranges, requiring further analysis. The expanded uncertainty was 18% - LCK 1414, 22% - LCK 314 and 16% - LCK 1014.

For the NT, we have studied the ranges [1-16] mg/L NT, [5-40] mg/L NT and [20-100] mg/L NT. We verified linearity for all ranges, with coefficients of correlation higher than 0,995 and positive results in the Mandel’s fitting test.

This work contributes for COD’s micro method validation (only lacking Interlaboratory comparisons and some intermediate accuracy tests), and to initiate NT validation.

Keywords: Wastewater; Validation; Micro Methods; COD; NT; Statistic

Índice

1	Introdução	1
1.1	Enquadramento e Motivação.....	1
1.1.1	Caracterização das Águas Residuais	4
1.1.2	A Empresa “ Águas de Lisboa e Vale do Tejo”	5
1.1.3	ETAR Beirolas	5
1.1.4	Caracterização do Afluente Bruto	6
1.1.5	Caracterização do Efluente Final	7
1.1.6	Legislação e Regulamentação Portuguesa relativa às Águas Residuais.....	7
2	Validação de Métodos Analíticos	11
2.1.1	Praticabilidade.....	14
2.1.2	Curva de Calibração	14
2.1.3	Linearidade.....	15
2.1.4	Limites Analíticos (LD e LQ)	16
2.1.5	Sensibilidade	17
2.1.6	Especificidade e Seletividade	17
2.1.7	Gama de Trabalho	18
2.1.8	Precisão ou Fidelidade	18
2.1.9	Exatidão ou Justeza	20
2.1.10	Testes Comparativos	22
2.1.11	Robustez.....	23
3	Incerteza de Medição	25
3.1.1	Avaliação da Incerteza	26
3.2	Abordagem metodológica passo a passo.....	27
3.2.1	Especificação da mensuranda e identificação das fontes de incerteza	27
3.2.2	Quantificação das Componentes de Incerteza	28
3.3	Abordagem baseada em dados de validação do método	31
3.3.1	Incerteza Associada à Precisão do Método	31
3.3.2	Incerteza Associada à Exatidão do Método.....	31

3.3.3	Incerteza Combinada.....	32
3.3.4	Incerteza Expandida	32
4	Importância do Controle de Qualidade	35
4.1.1	Controle de qualidade interno e externo	37
4.1.2	Tratamento Estatístico de Dados.....	37
4.1.3	Teste F – Fisher	37
4.1.4	Teste t-student das diferenças (amostras emparelhadas).....	38
4.1.5	Teste de Grubbs.....	39
5	Métodos para Validação	41
5.1	Espectrofotometria	41
5.2	Determinação da Carência Química de Oxigênio – Método Clássico	43
5.2.1	Interferências e Limitações	44
5.3	Determinação da Carência Química de Oxigênio – Micro Método	46
5.3.1	Procedimento Experimental	47
5.4	Determinação de Azoto	48
5.5	Azoto Total.....	48
5.6	Determinação Azoto Total – Micro Método	51
5.6.1	Interferências e Limitações	51
5.6.2	Procedimento Experimental	53
5.7	Vantagens dos Micro Métodos.....	55
5.8	Amostragem e Preservação das Amostras.....	57
6	Materiais e Métodos	59
6.1.1	Material de laboratório	59
6.2	Equipamento	60
6.2.1	Digestor HT 200 S.....	60
6.2.2	Espectrofotômetro DR 3900.....	60
6.3	Preparação das Soluções Padrão	63
6.4	Carência Química de Oxigênio	63
6.5	Azoto Total.....	64
7	Resultados Experimentais e Discussão	65
7.1	Carência Química de Oxigênio	65
7.1.1	Curvas de Calibração - Linearidade	65
7.1.2	Limiares Analíticos	82

7.1.3	Análise Estabilidade Método e Sensibilidade	85
7.1.4	Gamas de Trabalho.....	86
7.1.5	Precisão	97
	Duplicados.....	97
	Repetibilidade	100
7.1.6	Exatidão.....	103
	Materiais de Referência Certificados	103
	Testes de Recuperação	106
	Comparação do Método Clássico com o Micro Método.....	109
7.1.7	Robustez.....	114
7.1.8	Controlo de Qualidade para o Laboratório de Beírolas.....	115
7.1.9	Diagrama de Ishikawa	116
7.1.10	Estudo da Estabilidade dos <i>kits</i>	117
7.1.11	Incertezas.....	122
7.2	Análise dos Resultados Analíticos – Azoto Total	124
7.2.1	Curvas de Calibração	125
7.2.2	Limiares Analíticos	129
7.2.3	Experiência Azoto Total.....	130
8	Conclusões	133
9	Recomendações - Trabalhos Futuros	137
	Bibliografia	139
	Anexos	145
	A. Esquemas.....	145
	B. Procedimentos Hach Lange®	147
	C. Regressão Ponderada.....	150

Índice de Figuras

Figura 1.1– Evolução do Sistema de tratamento de águas residuais em Portugal (1994-2011)	2
Figura 1.2 – Evolução do Saneamento em Portugal (1990-2015).....	2
Figura 1.3 – Variação do Caudal que afluí a uma ETAR - águas residuais domésticas	4
Figura 1.4 – Origem das águas residuais	5
Figura 1.5 – Vista panorâmica da ETAR de Beírolas.....	6
Figura 2.1 – Validação de um método – Método Adequado ao Uso	11
Figura 2.2 – Avaliação Z-score	21
Figura 3.1- Diferença entre exatidão e precisão	26
Figura 3.2 – Esquema Determinação Incertezas baseado na ISO 11352:2012.....	33
Figura 4.1 – Modelo da Qualidade segundo Demming	35
Figura 5.1 – Espectro eletromagnético	41
Figura 5.2 – Componentes de um espectrofotómetro	42
Figura 5.3 – Interferentes presentes na amostra	42
Figura 5.4 – Preparação dos tubos de ensaio – método clássico CQO	43
Figura 5.5 – Digestor DK 20 Heating Digester (Velp Científica).....	44
Figura 5.6 – Determinação do Ponto de Equivalência CQO	44
Figura 5.7 – Amostras acidificadas para análise de CQO	45
Figura 5.8 – Gamas de Trabalho dos kits da Hach Lange®, para o parâmetro CQO	46
Figura 5.9 - Embalagens das gamas em análise da Hach Lange® para a determinação de CQO.....	46
Figura 5.10 – Fluxograma do procedimento experimental do micro método para o parâmetro CQO.....	47
Figura 5.11 – Procedimento Experimental do método em pequena escala para o parâmetro CQO	47
Figura 5.12 – Ciclo do Azoto	48
Figura 5.13 – Esquema da determinação do azoto total (NT)	50
Figura 5.14 - Gamas de Trabalho dos kits da Hach Lange®, para o parâmetro NT.....	51
Figura 5.15 – Embalagens das gamas em análise da Hach Lange® para a determinação de NT.....	51
Figura 5.16 - Fluxograma do procedimento experimental do micro método para o parâmetro NT – LCK 138.....	53
Figura 5.17 – Procedimento para o LCK 138 – micro método - Azoto Total.....	53
Figura 5.18 – Frascos de vidro onde é realizada a digestão - Micro método NT	54
Figura 5.19 – Comparação entre método clássico e kits - redução até 90% dos reagentes necessários	56
Figura 6.1 – Digestor HT 200 S - HACH LANGE®	60
Figura 6.2 – Espectrofotómetro DR 3900 - HACH LANGE®.....	61
Figura 6.3- Identificação HACH LANGE® das diferentes gamas de trabalho, por cor.....	61
Figura 6.4 - Rotação do kit dentro do fotómetro DR 3900, para obtenção de uma medição média	61
Figura 6.5 – Sistemas de leitura do espectrofotómetro DR 3900	62
Figura 7.1- Absorvância vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 1414.....	66
Figura 7.2 – Variação Cor ao longo da gama LCK 1414 [5-60] mg/L O ₂	66
Figura 7.3 – Concentração Lida vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 1414.....	67
Figura 7.4 - Absorvância vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 1414.....	68
Figura 7.5 –Concentração Lida vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 1414	68
Figura 7.6 - Absorvância vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 1414.....	70
Figura 7.7 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 1414.....	71
Figura 7.8 - Absorvância vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 314.....	72
Figura 7.9 - Variação Cor ao longo da gama LCK 314 [15-150] mg/L O ₂	73
Figura 7.10 – Concentração Lida vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 314.....	73
Figura 7.11 - Absorvância vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 314.....	74
Figura 7.12 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 314.....	74
Figura 7.13 - Absorvância vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 314.....	75
Figura 7.14 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 314.....	75
Figura 7.15 –Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 1014	77
Figura 7.16 – Concentração Lida vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 1014.....	78
Figura 7.17 – Variação da cor dos kits ao longo da gama de trabalho LCK 1014.....	78
Figura 7.18 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 1014.....	79
Figura 7.19 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 1014.....	80
Figura 7.20 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 1014.....	81
Figura 7.21 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – LCK 1014.....	81

Figura 7.22 – Estudo do comportamento das variâncias ao longo da gama [5-60] mg/L O ₂ – CQO	87
Figura 7.23 - Estudo do comportamento das variâncias ao longo da gama [100-2000] mg/L O ₂ - CQO...	90
Figura 7.24 – Regressão Linear e Ponderada – LCK 1414 [5-60] mg/L O ₂	91
Figura 7.25 - Regressão Linear e Ponderada – LCK 1014 [100-2000] mg/L O ₂	91
Figura 7.26 – Intervalo de confiança da gama [5-60] mg/L O ₂	92
Figura 7.27 - Intervalo de confiança da gama [15-150] mg/L O ₂	93
Figura 7.28 – Intervalo de confiança da gama [100-2000] mg/L O ₂	94
Figura 7.29 - Comparação Método Kits (LCK 1414) e Método ISO 6060:1989	110
Figura 7.30- Comparação Método Kits (LCK 314) e Método ISO 6060:1989	111
Figura 7.31 – Comparação Método Kits (LCK 1014) e Método ISO 6060:1989.....	113
Figura 7.32 – Diagrama de Ishikawa (ou espinha peixe) – para os métodos espectrométricos.....	116
Figura 7.33 – Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 100 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014	117
Figura 7.34 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 250 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014	118
Figura 7.35 - Estudo Estabilidade <i>kits</i> CQO, padrão 300 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014	118
Figura 7.36 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 700 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014	119
Figura 7.37 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 2000 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014	119
Figura 7.38- Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 15 mg/L – Gama [15-150] mg/L - LCK 314	120
Figura 7.39- Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 150 mg/L – Gama [15-150] mg/L - LCK 314	120
Figura 7.40 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 5 e 60 mg/L – Gama [5-60] mg/L - LCK 1414	120
Figura 7.41 – Análise Amostras Laboratório de Beirolas Para definição das gamas de trabalho.....	124
Figura 7.42- Absorvância vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 138.....	125
Figura 7.43 – Absorvância vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 138	126
Figura 7.44 – Absorvância vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 138	127
Figura 7.45 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 238.....	127
Figura 7.46 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 338.....	128

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Caracterização do Afluente Bruto – ETAR Beirolas	7
Tabela 1.2– Caracterização do Efluente Final – ETAR Beirolas	7
Tabela 1.3 – Requisitos mínimos para as descargas em zonas sensíveis das ETAR	8
Tabela 2.1 – Parâmetros de Validação	13
Tabela 3.1 – Exatidão e Precisão – Análise da Figura 3.1.....	26
Tabela 3.2 - Tipos de distribuição e avaliação da incerteza do tipo B.....	30
Tabela 5.1 – Concentração máxima admissível de interferentes – cloretos, para cada gama de NT.....	52
Tabela 5.2 – Comparação dos tempos de digestão no macro e micro método de CQO	56
Tabela 5.3 – Modo de conservação de amostras - métodos clássicos.....	57
Tabela 6.1 – Material de vidro usado nos ensaios laboratoriais	59
Tabela 6.2 – Equipamento diverso usado nos ensaios laboratoriais	59
Tabela 6.3 - Identificação dos Reagentes para análise de CQO e NT	59
Tabela 7.1 – Dados Primários – 1ª curva calibração – LCK 1414 –[5-60] mg/L O ₂	65
Tabela 7.2 – Dados Primários – 2ª curva calibração – LCK 1414 –[5-60] mg/L O ₂	67
Tabela 7.3 - Resultado da avaliação do ponto 5 mg/L O ₂ (ponto suspeito).....	69
Tabela 7.4 - Dados Primários – 3ª curva calibração – LCK 1414- [5-60] mg/L O ₂	70
Tabela 7.5 – Resumo Teste Mandel - Curvas de Calibração Abs vs Conc.Teórica LCK 1414.....	71
Tabela 7.6 - Dados Primários – 1ª curva calibração –LCK 314- [15-150] mg/L O ₂	72
Tabela 7.7 - Dados Primários – 2ª curva calibração – LCK 314- [15-150] mg/L O ₂	73
Tabela 7.8 - Dados Primários – 3ª curva calibração – LCK 314 -[15-150] mg/L O ₂	75
Tabela 7.9 – Resumo Teste Mandel - Curvas de Calibração Abs vs Conc.Teórica LCK 314.....	76
Tabela 7.10 – Dados Primários da Curva Calibração LCK 1014 –[100-2000] mg/L O ₂	77
Tabela 7.11 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 1014 – [100-2000] mg/L O ₂	79
Tabela 7.12 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 1014 –[100-2000] mg/L O ₂	80
Tabela 7.13 – Resumo Teste Mandel - Curvas de Calibração Abs vs Conc.Teórica LCK 1014.....	81
Tabela 7.14- Determinação limiares analíticos do micro método CQO - [5-60] mg/L O ₂ – LCK 1414	82
Tabela 7.15 – Verificação dos Limiares Analíticos para a gama intermédia e alta CQO.....	82
Tabela 7.16 – Estudo Repetibilidade Padrão 5 e 8 mg/L O ₂ para determinação limiares analíticos.....	83
Tabela 7.17 – Estudo Repetibilidade Padrão 15 (LCK 314) e 100 mg/L O ₂ (LCK 1014).....	84
Tabela 7.18 – Resumo resultados sensibilidade micro método CQO.....	85
Tabela 7.19 – Teste de Homogeneidade de Variâncias gama [5-60] mg/L O ₂	86
Tabela 7.20 - Teste de Homogeneidade de Variâncias gama [8-15] e [15-60] mg/L O ₂	87
Tabela 7.21 - Teste de Homogeneidade de variâncias gama [15-150] mg/L O ₂	88
Tabela 7.22 - Teste de Homogeneidade de variâncias gama [100-2000] mg/L O ₂	89
Tabela 7.23 – Resumo Testes Homogeneidade Variâncias CQO [100-2000] mg/L O ₂ - LCK 1014.....	90
Tabela 7.24- Estimativa do intervalo de confiança da reta de calibração da gama [5-60] mg/L O ₂	92
Tabela 7.25 - Estimativa do intervalo de confiança da reta de calibração da gama [15-150] mg/L O ₂	93
Tabela 7.26 - Estimativa do intervalo de confiança da reta de calibração da gama [100-2000] mg/L O ₂ ..	94
Tabela 7.27 – Resultados da interpolação da curva de calibração gama [5-60] mg/LO ₂	95
Tabela 7.28- Resultados da interpolação da curva de calibração gama [15-150] mg/LO ₂	95
Tabela 7.29 – Resultados da interpolação da curva de calibração gama [100-2000] mg/LO ₂	95
Tabela 7.30-Aplicação do teste de Grubbs aos dados do estudo homogeneidade de variâncias	96
Tabela 7.31 – Duplicados de Amostras na gama baixa de CQO – [5-60] mg/LO ₂ – LCK 1414.....	97
Tabela 7.32- Duplicados de Amostras na gama intermédia de CQO – [15-150] mg/LO ₂ – LCK 314.....	98
Tabela 7.33 - Duplicados de Amostras na gama alta de CQO – [100-2000] mg/LO ₂ – LCK 1014.....	99
Tabela 7.34- Estudo de Repetibilidade na gama baixa CQO – [5-60] mg/LO ₂ - LCK 1414.....	100
Tabela 7.35 - Estudo de Repetibilidade na gama intermédia CQO – [15-150] mg/LO ₂ - LCK 314	101
Tabela 7.36 - Estudo de Repetibilidade na gama alta CQO – [100-2000] mg /L O ₂ - LCK 1014.....	101
Tabela 7.37 – Verificação do ponto superior e inferior – repetibilidade gama [100-2000] mg/L O ₂	102
Tabela 7.38 – Repetibilidade Amostra 1 sem outlier – [100-2000] mg/L O ₂	102
Tabela 7.39 – Identificação do MRC para CQO	103
Tabela 7.40 – Análise do MRC 996 ± 11 mg/L O ₂ na gama [5-60] mg/L O ₂	103
Tabela 7.41 - Análise do MRC 996 ± 11 mg/L O ₂ na gama [15-150] mg/L O ₂	104
Tabela 7.42 - Análise do MRC 996 ± 11 mg/L O ₂ na gama [100-2000] mg/L O ₂	105
Tabela 7.43 – Recuperação de Amostras na gama baixa de CQO – [5-60] mg/L O ₂	106
Tabela 7.44 - Recuperação de Amostras na gama intermédia de CQO – [15-150] mg/L O ₂	107
Tabela 7.45 - Recuperação de Amostras na gama alta de CQO – [100-2000] mg/L O ₂ – LCK 1014.....	108

Tabela 7.46 - Dados obtidos para comparação de método de referência CQO com LCK 1414.....	109
Tabela 7.47 – Resumo Resultados para determinação dos intervalos de confiança	110
Tabela 7.48 - Dados obtidos para comparação de método de referência CQO com LCK 314.....	111
Tabela 7.49 – Resumo Resultados para determinação dos intervalos de confiança	112
Tabela 7.50- Comparação do método kits e método de referência	112
Tabela 7.51 – Dados obtidos para comparação de método de referência CQO com LCK 1014	113
Tabela 7.52 - Resumo Resultados para determinação dos intervalos de confiança	114
Tabela 7.53 – Comparação do método kits e método de referência	114
Tabela 7.54 - Plano Controlo de Qualidade Interno	115
Tabela 7.55 - Estimativa das Incertezas para cada gama CQO	122
Tabela 7.56 – Expressão dos Resultados Finais para cada gama de trabalho de CQO.....	123
Tabela 7.57 - Dados Primários da 1ª Curva Calibração LCK 138 – Gama Baixa [1-16] mg/L NT	125
Tabela 7.58 - Dados Primários da 2ª Curva Calibração LCK 138 – Gama Baixa [1-16] mg/L NT	126
Tabela 7.59 – Dados Primários da 3ª Curva Calibração LCK 138 – Gama Baixa [1-16] mg/L NT	126
Tabela 7.60 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 238 – Gama Intermédia [5-40] mg/L NT	127
Tabela 7.61 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 338 – Gama Alta [20-100] mg/L NT	128
Tabela 7.62 – Resumo das Curvas de Calibração efetuadas para o micro método de NT	128
Tabela 7.63- Determinação dos limiares analíticos do micro método NT.....	129
Tabela 7.64 - Verificação dos Limiares Analíticos para as gamas intermédia e alta NT	129
Tabela 7.65 – Condições de cada digestão	130
Tabela 7.66 – Padrões de ureia com concentrações de 25, 50 e 100 mg/L NT	130
Tabela 7.67- Padrões de nitrato de potássio com concentrações de 1, 16, 20 e 100 mg/L NT	131
Tabela C.1 – Ponderada e Regressão Linear Gama [5-60] mg/L O ₂	150
Tabela C.2- Ponderada e Regressão Linear Gama [100-2000] mg/L O ₂	150

Índice de Equações

Equação 2.1 – Determinação do declive da reta de calibração	14
Equação 2.2 – Determinação da ordenada na origem da reta de calibração	14
Equação 2.3 – Desvio padrão residual de uma função de calibração linear	14
Equação 2.4 – Desvio padrão em relação à ordenada na origem.....	14
Equação 2.5 – Desvio padrão em relação ao declive.....	14
Equação 2.6 – Valor de concentração obtido por um sinal instrumental.....	15
Equação 2.7- Valor de concentração obtido por uma série de sinais instrumentais	15
Equação 2.8 – Diferença entre as variâncias dos desvios padrão residuais	15
Equação 2.9 – Teste PG.....	15
Equação 2.10 – Desvio Padrão Residual de uma função de calibração não linear	16
Equação 2.11 – Determinação do Limite de Detecção pela curva de calibração	16
Equação 2.12 – Determinação do Limite de Quantificação pela curva de calibração	16
Equação 2.13 – Determinação dos limiares analíticos	17
Equação 2.14 – Determinação da Sensibilidade do método	17
Equação 2.15- Coeficiente de variação para um dado nível de fortificação	17
Equação 2.16 – Cálculo das Variâncias.....	18
Equação 2.17 – Média dos Resultados	18
Equação 2.18 – Limite de repetibilidade	19
Equação 2.19 – Desvio Padrão	19
Equação 2.20 – Coeficiente de Variação de Repetibilidade	19
Equação 2.21 – Determinação do desvio padrão da precisão intermédia	19
Equação 2.22 – Determinação do Erro Relativo na análise dos MRC	20
Equação 2.23 – Erro Absoluto análise dos MRC	21
Equação 2.24 – Teste t de student análise dos MRC	21
Equação 2.25 – Determinação do Z-score na avaliação dos MRC	21
Equação 2.26 – Erro Normalizado	21
Equação 2.27 – Determinação da Recuperação Média.....	22
Equação 3.1 – Desvio padrão para estimar do intervalo de confiança de uma curva de calibração	28
Equação 3.2 – Intervalos de confiança de x_0	28
Equação 3.3 – Determinação da média aritmética.....	28
Equação 3.4 – Determinação do desvio padrão.....	28
Equação 3.5 – Determinação da incerteza padrão	29
Equação 3.6 – Cálculo da incerteza para ensaios em repetibilidade.....	31
Equação 3.7 – Cálculo da incerteza para ensaios em duplicado	31
Equação 3.8 – Cálculo da incerteza associada ao MRC	31
Equação 3.9 – Estimativa da incerteza combinada	32
Equação 3.10 – Determinação da Incerteza Expandida.....	32
Equação 3.11 – Resultado de uma medição analítica	32
Equação 4.1 – Amplitude relativa de duplicados	37
Equação 4.2 – Teste PG - Quociente entre as variâncias.....	38
Equação 4.3- Teste PG - Quociente entre as variâncias	38
Equação 4.4 – Teste estatístico t de student	38
Equação 4.5 – Teste de Grubbs	39
Equação 5.1 – Lei de Lambert-Beer	41
Equação 5.2 – Equação Química oxidação dos iões cloreto a cloro.....	45
Equação 5.3 – Determinação de azoto total.....	49

Lista de Acrónimos

- AR – Água Residual
- ARH - Administrações de Região Hidrográfica
- BEI - Beirolas
- CA – Critério de Aceitação
- CBO₅ – Carência Bioquímica de Oxigénio a 5 dias
- CE – Conselho Europeu
- COV – Compostos Orgânicos Voláteis
- CQO – Carência Química de Oxigénio
- DL – Decreto-Lei
- DQA - Diretiva Quadro da Água
- ECHA - Agência Europeia de Produtos Químicos
- EIL – Ensaio Interlaboratoriais
- EN – Norma Europeia
- e.p. – equivalente populacional
- ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais
- g.l – graus de liberdade
- GUM – *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*
- HSD - *High Speed Digestion*
- IBR – *Integrated Barcode Reader*
- ICH – Conferência Internacional sobre a Harmonização
- IPAC – Instituto Português de Acreditação
- ISO – *International Organization for Standardization*
- LAR – Laboratório de Águas Residuais
- LD – Limite de Detecção
- LQ – Limite de Quantificação
- MQ – Manual da Qualidade
- MRC – Material de Referência Certificado
- NP – Norma Portuguesa
- NT - Azoto Total
- NTK - Azoto Total Kjeldahl
- OD – Oxigénio Dissolvido
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- PC – Padrão de Controlo
- PCIP – Prevenção e Controlo Integrados de Poluição

REACH - *Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*

RSD – Desvio Padrão Relativo

r – Limite de Repetibilidade

R – Limite de Reprodutibilidade

SCQ – Sistema de Controlo de Qualidade

SGQ – Sistema de Gestão e Qualidade

SST – Sólidos Suspensos Totais

UE – União Europeia

UV-VIS – Radiação Ultravioleta e Visível

VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia

VL – Valor Limite

VLE - Valores Limite de Emissão

ZVN – Zona Vulnerável dos Nitratos

ΔS^2 – Diferença de variâncias

E – Sensibilidade

F – Valor teste de Fisher

S – Desvio Padrão

S^2 – Variância

1 Introdução

1.1 Enquadramento e Motivação

A água é um dos elementos fundamentais à vida, qualquer alteração das suas propriedades físico-químicas e/ou microbiológicas afeta a sobrevivência dos vários seres vivos dela dependentes.

Segundo o artigo de Vuorinen, as primeiras evidências da construção de sistemas de abastecimento e saneamento rudimentares datam da Era do Bronze, segundo milénio a.C. na cidade de Mohenjo-Daro, no Paquistão [1].

O serviço de saneamento é responsável pela recolha, transporte e o tratamento das águas residuais sendo um serviço fundamental para proteger a saúde pública [2]. Todavia, somente em meados do século XIX, Edwin Chadwick chegou à conclusão que a falta de saneamento provocava doenças, diminuía a esperança média de vida e era a causa das elevadas taxas de mortalidade.

Dada a sua importância a Assembleia Geral das Nações Unidas reconheceu em 2010, o acesso a água potável e ao saneamento como um Direito. Mais de 75% dos países reconheceram o acesso a água como um direito humano e 67% dos países reconheceram o saneamento como um direito [3].

Foi criado um Programa de Monitorização para a Provisão de Água e Saneamento pela OMS/UNICEF, mecanismo oficial das Nações Unidas, para alcançar o objetivo intitulado “Desenvolvimento do Milénio”, de forma a reduzir para metade a proporção de pessoas sem acesso sustentável a água potável e saneamento básico entre 1990 e 2015 [4].

Segundo este documento refere, cerca de 842 000 pessoas em países sub desenvolvidos morrem anualmente devido à falta de água, saneamento e higiene. Melhorar a qualidade da água de consumo, as condições de saneamento e higiene impedirão 361 000 crianças com idade inferior a 5 anos de morrer anualmente [4-6].

O Conselho Consultivo da ONU para a Água e Saneamento (UNSGAB), recomenda uma revisão completa na forma como a comunidade internacional lida com dois problemas socioeconómicos da Agenda de Desenvolvimento após 2015: a escassez de água e a insuficiência de saneamento e prevê que a procura mundial pela água crescerá 55% entre 2000 e 2050 [7].

É importante salientar mais alguns factos, tais como:

- 7 em cada 10 pessoas não têm instalações de saneamento básicas;
- 9 em cada 10 pessoas que vivem em zonas rurais não têm acesso ao saneamento básico;
- Somente 27% da população atual tem acesso a saneamento melhorado desde os anos 90 [4].

De acordo com a informação disponível no Plano Estratégico Nacional de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais (PENSAAR) 2020, o sistema de saneamento em Portugal tem registado melhorias nas últimas duas décadas, no entanto ainda são insuficientes para fazer face às necessidades de toda a população especialmente a rural. Da apreciação da figura

1.1, baseada neste documento verifica-se que entre 1994 e 2011 houve uma evolução traduzida através de um aumento de 47% do tratamento de águas residuais urbanas [8].

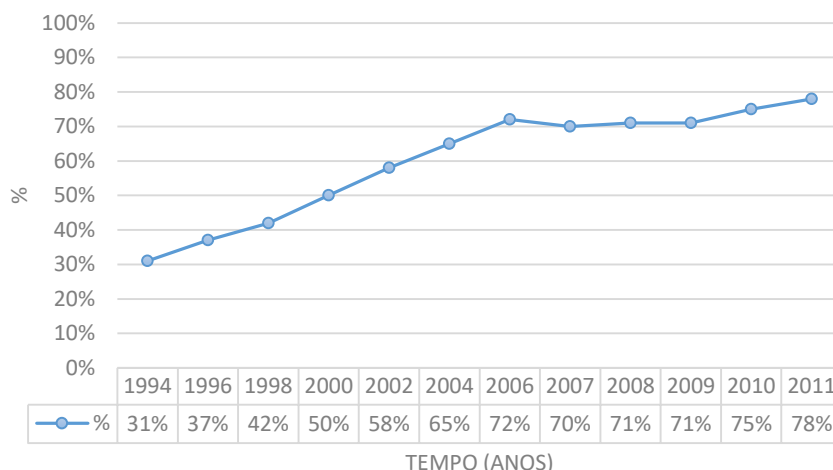


Figura 1.1– Evolução do Sistema de tratamento de águas residuais em Portugal (1994-2011) [8]

A figura 1.2 mostra dados relativos ao saneamento, fornecidos pelo *World Bank* e organizados pelo Programa de Monitorização da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), baseados em censos nacionais e inquéritos aos utilizadores finais dos serviços. Tem-se assim, uma visão mais concreta das condições que são fornecidas às populações. Onde se conclui que em Portugal houve um progresso ao longo de 25 anos, no saneamento básico mais elevado nas zonas rurais cerca de 11%, ao passo que a nível urbano esse crescimento foi apenas de 2,5% no mesmo período [9,10].

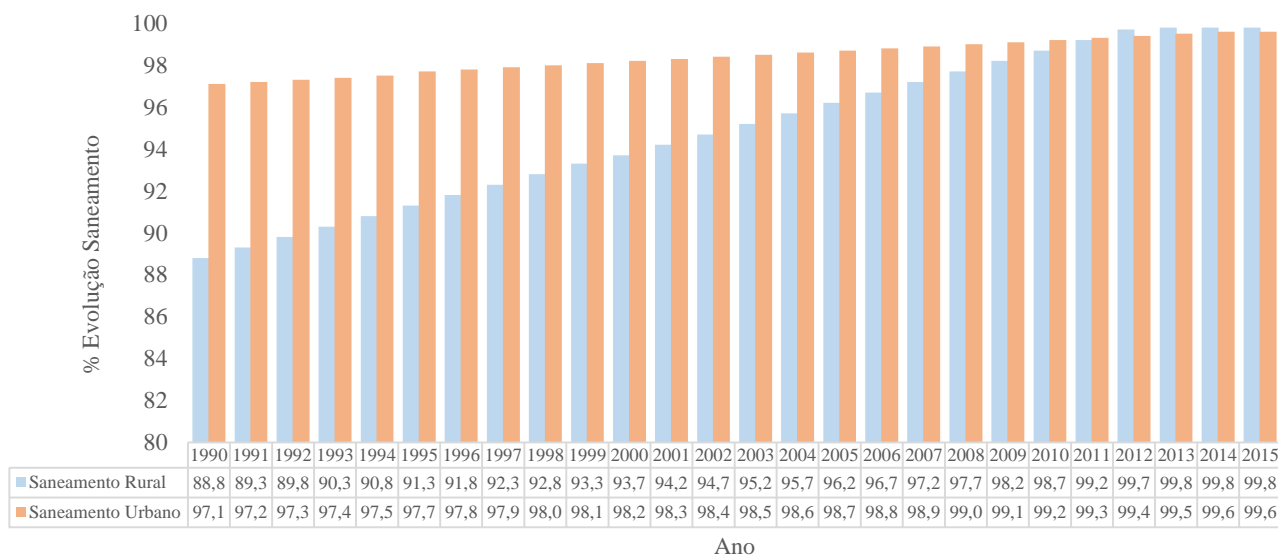


Figura 1.2 – Evolução do Saneamento em Portugal (1990-2015) [8,10]

O mundo enfrenta atualmente uma crise de água originada pelas alterações climáticas, pelo crescimento populacional, aumento da produção agrícola e industrialização. O relatório da ONU de 2015 confirma este facto, indicando que cerca de 40% da população mundial é afetada pela escassez de água [11,12]. Espera-se que o consumo de água usada na agricultura aumente de 70 para 90% a nível mundial até 2050 e que também a procura doméstica e industrial aumente

sobretudo em países em que está a haver desenvolvimento económico e social [13]. É por isso importante que as águas residuais possam ser aproveitadas, para fertilização dos solos, regas, combate a incêndios, na indústria para refrigeração, lavagem de pavimentos, portanto, uma boa gestão das águas residuais tem um impacto direto não só nos ecossistemas aquáticos como numa vasta gama de sectores, desde o desenvolvimento urbano à produção alimentar e à indústria [14, 15]. Em 2011 foram reutilizados em todo o mundo 7 km³ de efluentes municipais tratados, representando 0,59% do consumo total de água. Prevê-se que, até 2030, a reutilização da água represente 1,66% (26 km³ por ano) do consumo total de água. Globalmente, a maior aplicação da reutilização de água é na agricultura (32%), seguindo-se regas paisagísticas (20%), usos industriais (19%) e outras aplicações (29%) [16].

O tratamento das águas residuais (AR) é realizado numa estação de tratamento de águas residuais (ETAR) composta por uma sequência de operações unitárias que incluem procedimentos físicos, químicos e biológicos. O tratamento divide-se genericamente em 3 etapas, a primeira correspondente ao tratamento preliminar, a segunda - tratamento primário e secundário e a terceira - tratamento terciário. O tratamento preliminar é a primeira fase de depuração inclui a gradagem e desengorduramento para que sejam retirados os sólidos de maiores dimensões e gorduras de forma a não danificar os equipamentos a jusante. De seguida o tratamento primário inclui a decantação primária, onde a matéria poluente é separada por decantação das partículas sólidas em suspensão presentes na água, segue-se o tratamento biológico que inclui uma decantação secundária. Neste há uma degradação biológica da matéria orgânica por ação das populações microbianas existentes na água residual, que decompõem substâncias orgânicas do efluente transformando-as em formas mais simples e ambientalmente menos poluentes. Por fim, o tratamento terciário consiste na remoção de azoto e fósforo e ainda na desinfecção do efluente tratado tendo como objetivo a remoção dos organismos patogénicos [1,5].

Analisada a importância do tratamento destas águas, este deve ser acompanhado através de análises laboratoriais, onde o desenvolvimento científico e tecnológico tem um papel determinante, permitindo o progresso das técnicas usadas. Exemplo disso são os avanços através da crescente tendência dos laboratórios para a implementação de métodos à pequena escala de forma a analisar as águas residuais. Atualmente, os laboratórios já podem obter resultados em menos tempo, com melhorias técnicas significativas e menos custos, rentabilizando o trabalho, uma vez que estes micro métodos oferecem um nível de automação maior que os métodos clássicos dando aos laboratórios a capacidade de processar um maior número de amostras por unidade de tempo. Posto isto, os laboratórios necessitam de fazer a validação desses métodos para garantia de qualidade dos seus resultados.

Os laboratórios consubstanciam vários métodos para avaliação das águas residuais, nomeadamente carência química de oxigénio (CQO), carência bioquímica de oxigénio a cinco dias (CBO₅), azoto amoniacal (NH₄⁺), nitratos (NO₃⁻), nitritos (NO₂⁻), que no seu conjunto são uma estimativa do azoto total (NT), fósforo total (PT), sólidos suspensos totais (SST), avaliação da quantidade de metais pesados, potencialmente tóxicos, tais como arsénio, cádmio, crómio, cobre, chumbo, mercúrio, zinco, através de absorção atómica e avaliação do pH das AR [17].

Se a esta gestão forem aliadas políticas normativas de supervisão que assegurem um tratamento eficiente das águas residuais pode haver uma reutilização segura deste resíduo para inúmeras atividades do Homem, evitando desperdícios e satisfazendo as necessidades crescentes sem degradar o ambiente.

1.1.1 Caracterização das Águas Residuais

É possível verificar variações sazonais e diárias no caudal que aflui a uma ETAR. Pode constatar-se através da figura 1.3 a variação ao longo de um dia. De onde se conclui que os caudais mínimos ocorrem durante a madrugada, facto explicado pela pouca atividade da população, mais tarde, sensivelmente por volta das 5 horas da manhã é notório o começo do aumento do caudal até à existência de um pico durante o intervalo 12-14 h, correspondente à hora do almoço. Embora não seja tão acentuado existe um segundo pico ao início da noite, no intervalo 19-21 h [17].

Esta variabilidade de caudal conduz à necessidade de se proceder à sua equalização em tanques. Porque estas variações têm de ser devidamente controladas a nível industrial para que numa fase inicial do projeto seja feito o dimensionamento da ETAR e mais tarde para que o tratamento não seja afetado pelas oscilações excessivas de caudal. Por outro lado, é essencial compreender os fluxos das águas residuais de forma a fazer um bom planeamento da recolha das amostras, fundamental para que estas sejam representativas durante a sua análise.

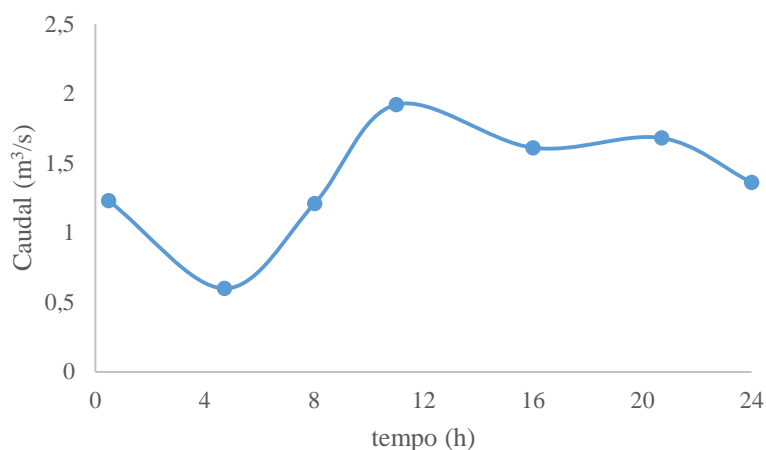


Figura 1.3 – Variação do Caudal que aflui a uma ETAR - águas residuais domésticas [17]

A composição da água residual modifica consoante a sua origem, isto porque contém resíduos provenientes das distintas atividades humanas nas habitações, hospitais e unidades industriais, tal como apresentado na figura 1.4.

Relativamente às águas residuais domésticas, estas provêm fundamentalmente de instalações residenciais, por isso são águas que contém essencialmente resíduos resultantes do metabolismo humano e de atividades domésticas. Juntam-se a estas, as águas pluviais provenientes da precipitação atmosférica caída no local ou bacias de drenagem e apresentam geralmente baixa carga orgânica e elevada carga sólida.

Desta forma, podem classificar-se as águas residuais em dois grupos:

- AR domésticas;
- AR industriais.

Sendo o seu conjunto denominado águas residuais urbanas, segundo o Decreto-lei nº 152/97.

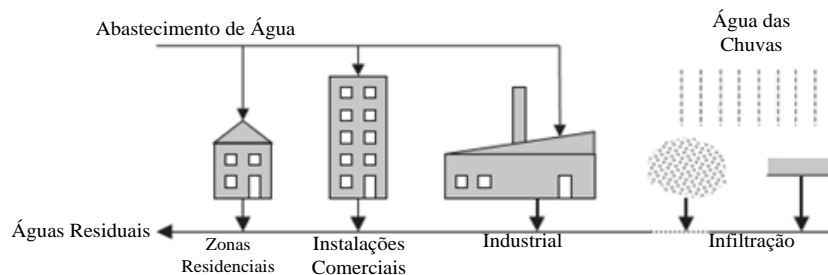


Figura 1.4 – Origem das águas residuais [18]

Geralmente os constituintes principais das AR, segundo Metcalf e Eddy são proteínas cerca 40-60%, 25-50% carboidratos e 8-12% de óleos e gorduras [17].

Estes compostos estão presentes em tencioativos tais como detergentes, sabão, shampoo. Relativamente à matéria inorgânica esta inclui os metais pesados, compostos com enxofre (sulfuretos, sulfatos e sulfitos), bem como óxidos, hidróxidos e carbonatos. Os dois primeiros compostos proteínas e carboidratos são fonte de substrato por excelência para o desenvolvimento de bactérias patogénicas, vírus, fungos e protozoários responsáveis por doenças como a febre tifóide, cólera, a hepatite A ou gastroenterites [19]. Nos últimos anos, também a presença de produtos farmacêuticos (PhC), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAH), plastificantes, hormonas (por exemplo o estrogénio) e pesticidas em concentrações vestigiais têm provocado uma preocupação acrescida no tratamento destas águas. Pelo facto de poderem atravessar os sistemas de tratamento sem sofrer redução na sua concentração ou alterações na sua metabolização, com conseqüente entrada no meio ambiente recetor e assim poderem exercer efeitos nocivos para a saúde, perturbando o sistema endócrino de humanos e animais e poderem estar na origem de algumas doenças ou malformações.

1.1.2 A Empresa “Águas de Lisboa e Vale do Tejo”

A Águas de Lisboa e Vale do Tejo, S.A. foi criada pelo Decreto-Lei n.º 94/2015, de 29 de Maio, o qual criou também o sistema multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento de Lisboa e Vale do Tejo. Este sistema abrange a captação, o tratamento e o abastecimento de água para consumo público e a recolha, o tratamento e a rejeição de efluentes domésticos e de efluentes urbanos.

O Sistema resulta da agregação de oito sistemas multimunicipais, que se extinguíram no dia da constituição do novo sistema, designadamente: SimTejo, Sanest, Simarsul, Águas do Oeste, Águas do Zêzere e Côa, Águas do Centro, Águas do Centro Alentejo, Águas do Norte Alentejo. O Decreto-Lei n.º 94/2015, que criou a sociedade LVT, atribuiu à EPAL a gestão delegada do sistema multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento de Lisboa e Vale do Tejo.

1.1.3 ETAR Beirolas

A ETAR de Beirolas localiza-se na zona norte do Parque das Nações tendo iniciado o seu funcionamento em 1989. Esta ETAR tem capacidade para depurar diariamente 54 000 m³ de águas residuais correspondentes a cerca de 215 000 habitantes dos municípios de Lisboa e Loures.

Os resultados analíticos associados a cada fase do tratamento desta e de outras 29 ETAR são obtidos no Departamento Laboratório de Águas Residuais, constituído por duas unidades

laboratoriais localizadas nas ETAR de Beirolas e Frielas. A monitorização da ETAR de Beirolas é assegurada a partir da unidade aí localizada.

O Departamento encontra-se acreditado pelo IPAC (Instituto Português de Acreditação), como Laboratório de Ensaios, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, desde 2001, tendo obtido a sua acreditação para ensaios químicos em águas residuais e lamas ainda como laboratório de processo da Empresa EMARLIS. Esta acreditação está expressa no certificado de acreditação L-0287 e respetivos anexos técnicos L-0287-1 e L-0287-2 [20].

A acreditação oferece a garantia da probidade e aptidão do serviço prestado, sendo um processo absolutamente voluntário e descrito nos regulamentos IPAC, designadamente DRC001 “Regulamento geral de Acreditação” e IPAC DRC005 “Regulamento para a Acreditação de Laboratórios de Ensaio” [21].

Em 2015, face à reorganização do grupo AdP a Simtejo-Saneamento Integrado dos Municípios do Tejo e Trancão passou a integrar no âmbito do Decreto-Lei nº 94/2015 a empresa Águas de Lisboa e Vale do Tejo, sob gestão delegada da EPAL, passando o Laboratório, a constituir a única estrutura laboratorial acreditada das oito empresas agregadas, o Departamento Laboratório de Águas Residuais da Direção de Laboratórios e de Controlo de Qualidade da Água da EPAL.



Figura 1.5 – Vista panorâmica da ETAR de Beirolas

1.1.4 Caracterização do Afluente Bruto

As ETAR carecem de uma licença de utilização do domínio público hídrico, dependente do afluente recebido e do tratamento vigente, para a rejeição dos seus efluentes, os quais deverão cumprir limites de emissão contidos na legislação.

Os valores característicos para cada parâmetro a controlar na ETAR de Beirolas têm de estar de acordo com a licença de utilização dos recursos hídricos de rejeição de águas residuais, nº L009460.2016.RH5, em vigor desde 20/7/2016 até 20/7/2021. No que respeita ao afluente bruto a licença de descarga discrimina características médias da água residual não tratada que são expectáveis para a instalação e que se encontram resumidas na tabela 1.1 [22].

Convém salientar que as características do Afluente não estão regulamentados como VL (valor limite), porque não são controláveis pela ETAR.

Tabela 1.1 – Caracterização do Afluente Bruto – ETAR Beirolas [22]

Parâmetro	mg/L
CBO₅	188,0 (mg/L O ₂)
CQO	407,0 (mg/L O ₂)
N	28,0 (mg/L N)
P	8,0 (mg/L P)

1.1.5 Caracterização do Efluente Final

Apresentam-se na tabela 1.2 os valores paramétricos da licença de descarga da ETAR de Beirolas, isto é, especifica-se na referida tabela os padrões mínimos de qualidade dos efluentes. Podem ler-se os valores limite de emissão (VLE) para cada parâmetro que caracteriza um efluente de Beirolas. Os valores médios, obtidos durante um ano de determinações analíticas não podem exceder sob pena de sanção, os VLE vigentes no DL n° 152/97 com as alterações introduzidas pelos Decretos-Lei n° 348/98, de 9 de Novembro, e DL n°149/2004, de 22 de Junho e 198/2008, de 8 de Outubro [22].

Tabela 1.2– Caracterização do Efluente Final – ETAR Beirolas [22]

Parâmetro	Valores Limite de Emissão
CBO₅	25 (mg/L O ₂)
CQO	125 (mg/L O ₂)
SST	35 (mg/L)
pH	6-9 (Escala de Sörensen)

Tendo em conta a existência de métodos no mercado que permitem uma resposta mais coerente com as necessidades legislativas de um futuro próximo o laboratório iniciou assim um processo de validação de forma a implementar micro métodos de avaliação das águas residuais.

1.1.6 Legislação e Regulamentação Portuguesa relativa às Águas Residuais

Como referido anteriormente a água é um recurso natural vulnerável carecendo incontornavelmente de preservação. Um aumento da eficiência do tratamento das AR traduz-se numa diminuição dos volumes de águas residuais afluentes aos meios hídricos, contribuindo para não delapidar as reservas do recurso, bem como para a manutenção da qualidade dos ecossistemas dulciaquícolas [23].

Assim, as ETAR têm de respeitar um vasto articulado normativo, que estipula valores limite de emissão para os parâmetros que avaliam a qualidade do tratamento da água. A nível nacional a proteção das águas e o controlo das descargas de águas residuais são regulamentados pelo Decreto-Lei n° 152/97 (Tratamento de águas residuais urbanas) de 19 de Junho, transposto da diretiva n° 91/271/CEE do parlamento europeu e do Conselho de 21 de Maio de 1991. O DL n° 152/97 teve alterações introduzidas pelos DL n° 348/98, de 9 de Novembro, e DL n°149/2004, de 22 de Junho e 198/2008, de 8 de Outubro. Ambos os diplomas legais mencionados fazem referência ao tratamento e à descarga das águas residuais urbanas no meio

aquático e definem os requisitos de tratamento das águas residuais urbanas tendo em conta a sua descarga no meio recetor, identificando as zonas sensíveis ou as zonas menos sensíveis [24,25].

De acordo com o disposto no artigo 5º e 6º do referido Decreto-Lei, a descarga de águas residuais urbanas provenientes de aglomerados com um equivalente populacional (e.p.) superior a 10 000 em zonas consideradas sensíveis só pode ser licenciada quando essas águas se sujeitam a um tratamento mais exigente que o secundário, satisfazendo as condições impostas na tabela 1.3. Por outro lado, as descargas para zonas pouco sensíveis, com um e.p. entre 2 000 e 10 000 podem ser realizadas sem cumprir o disposto no artigo 5º deste DL, obrigando apenas a que os efluentes cumpram uma redução de 20% do parâmetro CBO₅ e uma redução de 50% do parâmetro SST.

Tabela 1.3 – Requisitos mínimos para as descargas em zonas sensíveis das ETAR [24]

Parâmetro	Concentração	% Redução Mínima*
CBO₅	25 mg/L O ₂	70-90
CQO	125 mg/L O ₂	75
SST	35 mg/L (e.p. > 10 000)	90 (e.p. > 10 000)
	60 mg/L (2 000 <e.p.<10 000)	70 (2 000 <e.p.<10 000)

*Redução Mínima em relação à carga do afluente.

Todavia, se nas mesmas condições do anteriormente exposto se se fizerem as descargas para águas doces e estuários é obrigatório a realização de um tratamento secundário [26].

As águas residuais são normalmente expressas através do equivalente populacional, a contribuição de cada agregado populacional dependerá do nível de desenvolvimento do país/região, condições socioeconómicas e do estilo de vida [27].

A legislação abordada define como parâmetros de qualidade dos efluentes o CBO₅, CQO e SST, especificando também o número mínimo de amostras de efluentes necessárias recolher para analisar anualmente, baseando-se no tratamento que é feito em cada ETAR. Para além disso o Decreto-Lei nº 152/97 faz referência à frequência mínima de amostragem e ao número máximo de amostras não conformes que se podem ter (quadro nº3 da secção D, do anexo 1 desse DL) [24].

O Decreto-lei nº 236/98 de 1 de Agosto visa gerir os recursos hídricos e preservar a saúde pública. Para a prossecução destes objetivos são definidas normas para as descargas das águas residuais, nomeadamente estabelecendo uma lista de valores limite de emissão (VLE) para determinadas substâncias presentes nas AR com base na toxicidade, persistência e bioacumulação. Os valores dos parâmetros são restringidos em função da dimensão dos aglomerados populacionais, do estado do meio recetor e da sua capacidade de autodepuração [28]. No anexo XXII deste DL é apresentada uma tabela relativa aos métodos analíticos de referência para as águas residuais, sendo que estas devem respeitar os valores indicados para os limites de deteção, precisão e exatidão. No caso do parâmetro CQO considerando o método de referência o do dicromato de potássio o limite de deteção e a precisão devem ser de 25% do valor paramétrico e a exatidão ±10% do valor paramétrico, sendo este 150 mg/L O₂, segundo o anexo XVIII do DL 236/98 [28].

A Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000, transposta para a ordem jurídica nacional através da Lei da Água, Lei n.º 58/2005 de 29 de Dezembro reúne um quadro institucional, para a gestão sustentável das águas superficiais e

subterrâneas, estabelecendo as linhas de ordenamento e planeamento deste recurso regulamentando o seu uso estabelecendo o princípio da necessidade de título de utilização (autorizações, licenças e concessões). Alterada e republicada pelo Decreto-Lei n.º 130/2012, de 22 de Junho.

A presente lei promove um conjunto de princípios através do artigo 3º, de onde se salientam, o acesso universal à água para as necessidades humanas básicas, sendo a um custo acessível de forma a não ser um fator de exclusão social assenta no pressuposto de que é um dever de cada Estado e de cada um em particular zelar pela sua proteção e valorização.

A Diretiva Quadro da Água (DQA) de 2000 foi concebida para estabelecer orientações para a gestão da água, tendo uma visão integrada da água em três vertentes. Destacando-se primeiramente o objetivo de estabelecer “um enquadramento para a proteção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas...” (artigo 1º). Seguidamente a DQA obriga a uma caracterização das atividades económicas e dos seus impactos (artigo 5º) no âmbito dos usos da água de cada região e por fim o pressuposto supramencionado desta diretiva consiste em evitar a degradação causada pelas descargas das águas residuais (artigo 1º) [29,30].

A diretiva mencionada salienta ainda, a redução de nitratos visando assim a melhoria da qualidade das massas de água.

Conquanto, foi também criada a Diretiva 91/676/CEE do Conselho, ou Diretiva dos Nitratos a 12 de Dezembro de 1991 transferida para o quadro jurídico português pelo Decreto-Lei n.º 235/97, de 3 de Setembro, modificado à *posteriori* pelo Decreto-Lei n.º 68/99, de 11 de Março. O artigo 10º da Diretiva Nitratos impõe a apresentação à Comissão de um relatório por cada quatro anos e por cada Estado-Membro relativo à implementação de boas práticas agrícolas, à qualificação de zonas vulneráveis aos nitratos (ZVN), aos resultados do controlo das águas, e promover programas de ação para as zonas vulneráveis [31].

O Decreto-lei nº 83/2011 de 20 de Junho congrega especificações técnicas de forma a garantir a análise de parâmetros capazes de caracterizar a qualidade da água e estabelece ainda a comparabilidade dos resultados analíticos entre laboratórios. Apesar de este Decreto-Lei não incluir no seu âmbito as águas residuais, visto aplicar-se somente a águas subterrâneas e superficiais, tem estado a ser inscrito nas licenças de descarga como um Decreto- Lei de referência [32].

Criaram-se também administrações de região hidrográfica (ARH), responsáveis pela gestão e fiscalização das águas. A estas entidades de serviço público compete-lhes o licenciamento da utilização dos recursos hídricos e o sancionamento de contraordenações por infrações na sua área de jurisdição. Por fim compete-lhes também através do laboratório de referência para o ambiente na Agência Portuguesa do Ambiente (APA) assegurar que todos os métodos analíticos de laboratório que são utilizados na monitorização dos parâmetros biológicos e físico-químicos são validados e documentados de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, ou com outras normas equivalentes aceites a nível internacional.

Para além da legislação anteriormente mencionada existe ainda regulamentação específica para a descarga de águas residuais industriais quer em coletor, quer no meio recetor. Quando se trata de regulamentar a descarga direta em meio recetor os diplomas aplicáveis são elaborados por sector industrial. Para as indústrias de maior dimensão em cada sector, existe ainda

um enquadramento legal específico vertido na obrigatoriedade de obtenção de uma licença ambiental.

As indústrias cujos efluentes são descarregados em coletor devem sujeitar-se ao disposto nos regulamentos de descarga de águas residuais industriais da entidade gestora competente para a emissão da respetiva autorização de ligação.

Este licenciamento encontra-se ao abrigo do no Decreto-Lei n.º 127/2013, de 30 de Agosto. Alguns exemplos desses sectores PCIP (Prevenção e Controlo Integrados de Poluição) são:

- Indústrias do sector da energia
- Produção e transformação de metais
- Indústria mineral
- Indústria química
- Gestão de resíduos [33]

2 Validação de Métodos Analíticos

Com o passar dos anos podem citar-se da literatura inúmeras descrições sobre o conceito de validação. Segundo a norma NP/EN/ISO 17025:2005 a validação confirma a aptidão para o uso de um determinado método analítico, isto é, verifica se um protocolo definido para o método é aplicável a uma matriz/produto específico a testar e a uma dada gama de concentração. O item 5.4.5 desta norma refere-se à validação de métodos [34, 35].

Esta norma pretende demonstrar a competência técnica do laboratório garantindo que os resultados alcançados são confiáveis. Segundo a definição 2.45 do VIM (Vocabulário Internacional de Metrologia) 2012 entende-se por validação a “verificação de que os requisitos especificados são adequados para um determinado uso” [36].

O processo de adequação ao uso de um método está explicitado na figura 2.1, fundamentado no Guia EURACHEM 2014 [37].

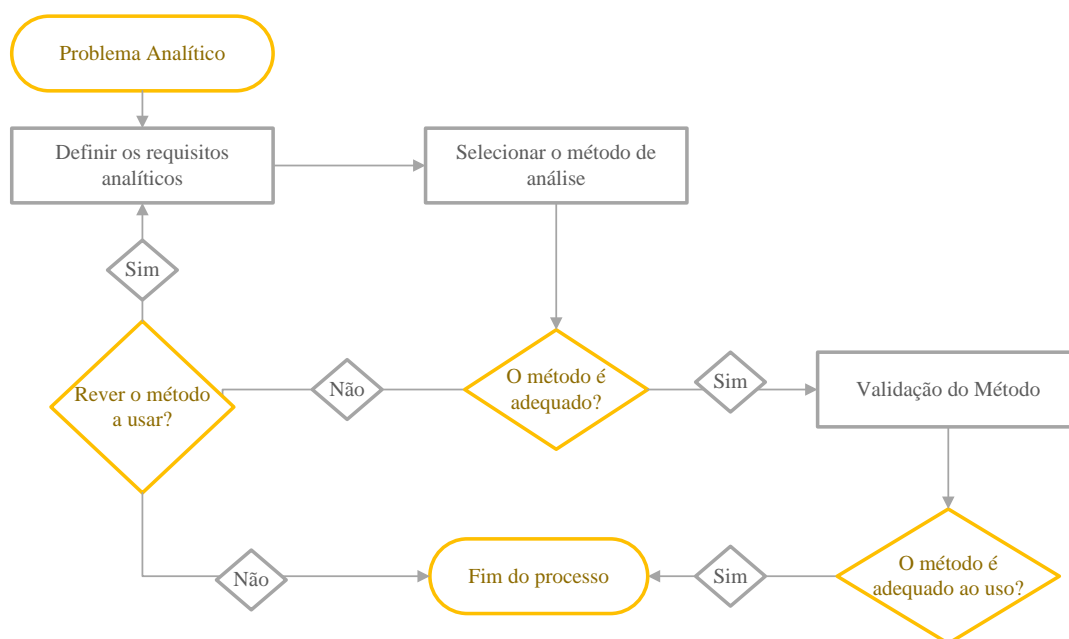


Figura 2.1 – Validação de um método – Método Adequado ao Uso [37]

Como se pode analisar pela figura 2.1, o processo de validação culmina com a clara evidência do cumprimento da exigência analítica. Caso essa exigência analítica não seja cumprida, é preciso um desenvolvimento maior do método. O processo de desenvolvimento e avaliação é iterativo, uma vez que continua até que o método seja considerado capaz de atender às exigências.

A validação de métodos consiste num processo onde se estabelecem as características de desempenho e limitações de um método, de forma a demonstrar que é apropriado ao uso em condições de segurança. O procedimento de validação é realizado uma vez ou em intervalos de tempo definidos durante a vida útil de um método, tendo como objetivo a confirmação das condições de desempenho do mesmo ao longo do tempo.

O método de validação deve concretizar um conjunto de ensaios, com o intuito de experimentar todos os pressupostos do método analítico documentando o desempenho do método e evidenciando a sua adequação para um objetivo pré-estabelecido [38].

Na presente dissertação os parâmetros para a validação do método foram definidos segundo o guia Relacre nº13 datado de 2000, que é baseado em normas internacionais. Este documento é importante para padronizar os critérios utilizados de modo a demonstrar que um método interno de ensaio, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados com a qualidade requerida. Demonstrando assim, através da validação, que o laboratório dispõe de meios e critérios objetivos, que, conduzem a resultados fidedignos minimizando as fontes de erro sistemáticos e aleatórios que possam contribuir para a não reprodutibilidade de um dado resultado [39].

Todavia, a validação é sempre uma dualidade entre capacidade técnica e custos despendidos na análise, dado tratar-se de um processo demorado. Desta forma, requer-se por parte do laboratório uma maior organização que lhe permita saber previamente quais os parâmetros do método que devem ser testados, permitindo-lhe efetuar uma análise que vá ao encontro das necessidades dos seus clientes [40].

Por outro lado, a realização de medições regulares, de qualidade reconhecida tanto a nível laboratorial como num processo industrial asseguram a conformidade com os valores limite e permitem também economizar, através do sistema de controlo de qualidade (SCQ).

A informação obtida após a validação tem finalidades díspares, das quais se podem salientar: a tomada de decisões que envolvam o controlo de um processo e a verificação se um produto/serviço está em conformidade com as especificações pré-determinadas e que vigoram na lei [41, 42].

Um laboratório deve validar os métodos sempre que utilize:

- Métodos normalizados e reconhecidos pela comunidade laboratorial para condições de ensaios e respetivas matrizes a serem analisadas;
- Métodos não normalizados, isto é, métodos que não são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional e internacional;
- Métodos que tenham sido validados outrora, mas que foram alvo de retificações/atualizações;
- Métodos internos, isto é, criados ou desenvolvidos pelo próprio laboratório;
- Métodos usados fora do âmbito de utilização prevista.

O Guia EURACHEM afirma que se deve validar um método não só nas circunstâncias mencionadas como também quando é necessário demonstrar a relação entre os resultados obtidos através de dois métodos, um recém-desenvolvido e um de referência já existente [43].

O processo de validação envolve uma avaliação direta e indireta dos parâmetros. A avaliação direta inclui a exatidão do método de ensaio, já a indireta inclui a especificidade, seletividade, gama de trabalho, limiares analíticos, sensibilidade e precisão[44,45].

Existe uma sequência de etapas que tem de ser seguida para que se chegue à validação do método, nomeadamente:

1. Definir o objetivo do método analítico;
2. Definir os parâmetros de validação cruciais para o método em estudo;
3. Definir os critérios de aceitação;
4. Planear as experiências de validação (número de ensaios, número de réplicas por ensaio);
5. Planear o tratamento estatístico;
6. Executar as experiências para validação;

7. Realizar o tratamento estatístico das experiências;
8. Analisar os resultados obtidos.

Os parâmetros geralmente avaliados para a validação de um método analítico são:

- Praticabilidade
- Curva de Calibração
- Linearidade
- Limiares Analíticos (LD e LQ)
- Sensibilidade
- Especificidade e Seletividade
- Gama de Trabalho
- Precisão ou Fidelidade (Repetibilidade, Precisão Intermédia e Reprodutibilidade)
- Exatidão ou Justeza
- Robustez

A lista anterior contempla os parâmetros de validação que avaliam o desempenho de um método em geral. Contudo, cabe ao laboratório avaliar quais os parâmetros cruciais para o seu estudo e estabelecer o seu próprio programa de validação para o método analítico em causa [39].

A tabela 2.1 cita os parâmetros e características de validação consideradas como as mais relevantes para a validação de um método quantitativo e qualitativo em geral [46].

Perante as evidências obtidas em laboratório aquando do processo de validação de um método analítico, o laboratório deverá fundamentar a adequação ao uso do método de ensaio implementado com base:

- nas características de desempenho especificadas nas normas base (em caso de métodos normalizados, segundo DRC005);
- em especificações do cliente, casos existam;
- na incerteza estimada do método de ensaio
- em requisitos legislativos, casos existam [21].

Tabela 2.1 – Parâmetros de Validação [46]

Parâmetro	Análise Quantitativa	Análise Qualitativa
Exatidão	+	-
Precisão:		
Repetibilidade	+	-
Precisão Intermédia	+ ¹	-
Especificidade	+	+
Limite de Detecção	- ²	+
Limite de Quantificação	+	-
Linearidade	+	-
Gama de Trabalho	+	-

¹ Nos casos em que seja realizada a reprodutibilidade não é necessário fazer ensaios em condições de precisão intermédia.

² Pode ser necessário em alguns casos conhecer o limite de deteção, embora seja um parâmetro qualitativo.

2.1.1 Praticabilidade

Este parâmetro de validação refere-se às exigências mínimas necessárias que possibilitam a execução do método, nomeadamente a disponibilidade do equipamento, dos reagentes, de espaço físico e analistas suficientes para garantir a sua execução.

2.1.2 Curva de Calibração

A curva de calibração permite obter a relação entre o sinal do instrumento e as concentrações do analito.

Para obtenção desta curva o analista prepara um conjunto de soluções padrão de concentração conhecida, sendo depois medidas no equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar. Os padrões de calibração devem distribuir-se de forma equitativa pela gama de trabalho.

Quando a curva de calibração é uma função polinomial de primeiro grau, ou seja, é representada por uma reta, pode ser usado o método dos mínimos quadrados para analisar os resultados.

Por este método demonstra-se que os coeficientes b (declive) e a (ordenada na origem) da reta de regressão linear de y em x , $y=a+bx$, são dados pela equação 2.1 e 2.2 [39].

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

Equação 2.1 – Determinação do declive da reta de calibração

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Equação 2.2 – Determinação da ordenada na origem da reta de calibração

Os coeficientes a e b dão uma estimativa da verdadeira função que é limitada pela dispersão do método [39].

A precisão da estimativa é quantificada pelo desvio padrão residual, $S_{y/x}$, da reta de regressão e dada pela equação 2.3.

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{[y_i - (a + b \cdot x_i)]^2}{N - 2}}$$

Equação 2.3 – Desvio padrão residual de uma função de calibração linear

Este desvio padrão expressa a dispersão dos valores do sinal do instrumento na curva de calibração.

Os desvios padrão referenciados nas equações 2.4 e 2.5 podem ser usados para calcular os limites de confiança de a e b , assim os limites são respetivamente: $b \pm t \cdot S_b$ e $a \pm t \cdot S_a$, sendo t o valor da variável de *Student* para um nível de confiança e $(N-2)$ graus de liberdade.

$$S_a = S_{y/x} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 2.4 – Desvio padrão em relação à ordenada na origem

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 2.5 – Desvio padrão em relação ao declive

A concentração do analito na amostra pode ser obtida apenas por um sinal instrumental ou a partir de uma média de sinais sobre a mesma amostra, tal como indicado nas equações 2.6 e 2.7, respetivamente.

$$\bar{x} = \frac{y_0 - a}{b}$$

Equação 2.6 – Valor de concentração obtido por um sinal instrumental

$$\bar{x} = \frac{\bar{y}_0 - a}{b}$$

Equação 2.7- Valor de concentração obtido por uma série de sinais instrumentais

Através das curvas de calibração é possível a deteção de falhas nos procedimentos, nas calibrações dos instrumentos, na preparação dos padrões e deterioração de reagentes [39]. As curvas de calibração têm de ter definidos critérios de aceitação/rejeição. Um dos critérios mais comuns de avaliação da reta de calibração é o coeficiente de correlação (r). Este parâmetro pode assumir valores no intervalo -1 a +1, para efeitos de validação de métodos, o seu valor deve ser superior a 0,995. Quanto mais próximo de 1 for este valor, melhor será a reta descrita pela regressão linear dos pontos.

2.1.3 Linearidade

Segundo a ISO 8466-1:1990, a linearidade de um método indica a sua aptidão em fornecer valores de medida proporcionais à quantidade de analito a dosear, numa certa gama de concentração [47].

Quando a relação entre o sinal detetado, y, e a concentração do analito em análise, x, apresenta uma representação linear, é descrita através da equação: $y=a+bx$ [47, 48].

A linearidade pode ser avaliada por modelos estatísticos como o teste de Mandel. Este teste estima qual a função que faz o melhor ajuste dos pontos da curva de calibração, se a linear ou a polinomial. Para tal, compara-se o valor do teste (PG) e o valor tabelado de F. A partir de um conjunto de pontos experimentais são calculados os desvios padrão residuais dos dois tipos de funções e a diferença entre as suas variâncias (DS^2) através da equação 2.8 [39, 50].

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

Equação 2.8 – Diferença entre as variâncias dos desvios padrão residuais

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

Equação 2.9 – Teste PG

Se $PG \leq F$ significa que a calibração linear é a que melhor se ajusta aos resultados.

Se $PG > F$ significa que a calibração que melhor se ajusta aos resultados é a não linear.

Nestas equações $S_{\bar{y}/x}^2$ representa os desvios-padrão residuais da função de calibração linear através do método dos mínimos quadrados e $S_{y^2}^2$ representa o desvio-padrão residual da função de calibração não-linear (por exemplo um polinómio de segundo grau). Por fim, N corresponde ao número de padrões de calibração.

O desvio padrão residual de um polinómio da função de calibração não linear é dado pela equação 2.10.

$$S_{y/x} = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{[y_i - (a + b \cdot x_i + cx_i^2)]^2}{N - 3}}$$

Equação 2.10 – Desvio Padrão Residual de uma função de calibração não linear

Para além, dos testes mencionados a linearidade é avaliada visualmente através da representação gráfica e pelo seu coeficiente de correlação (r). Embora o coeficiente *per si* não indique necessariamente a existência de linearidade é um parâmetro relevante.

2.1.4 Limiares Analíticos (LD e LQ)

Os limiares analíticos podem ser divididos em dois, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) do analito em estudo.

O limite de deteção consiste numa determinação qualitativa, ou seja, indica qual a menor concentração do analito que é possível detetar. Um valor inferior ao limite de deteção não significa a completa ausência do analito, apenas que não é possível proceder à sua deteção dado o valor de concentração ser baixo.

Relativamente ao limite de quantificação (LQ) estabelece a concentração mínima que pode ser determinada quantitativamente com precisão e exatidão satisfatórias, para uma determinada gama de trabalho. O intervalo entre o LD e o LQ corresponde a uma zona de deteção qualitativa e não quantitativa, por esta razão não podem ser feita uma quantificação neste intervalo.

O LD e LQ pode ser obtido através de:

1. Desvio padrão residual da curva de calibração, equação 2.11 e 2.12 respetivamente;
2. Desvio padrão, equação 2.13;

$$LD = \frac{k \cdot S_{y/x}}{b}, \text{ com } k = 3,3$$

$$LD = \frac{3,3 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Equação 2.11 – Determinação do Limite de Deteção pela curva de calibração

Onde, k representa o fator numérico escolhido para um nível de confiança de 99,7%, supondo que a distribuição dos erros é gaussiana, k toma o valor de 3,3. $S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração e b o declive da reta de calibração.

O limite de quantificação é calculado pela equação 2.12.

$$LQ = \frac{k \cdot S_{y/x}}{b}, \text{ com } k = 10$$

$$LQ = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Equação 2.12 – Determinação do Limite de Quantificação pela curva de calibração

Onde, k representa o fator numérico escolhido para um nível de confiança de 99,7%, $S_{y/x}$ representa o desvio padrão residual da curva de calibração e b o declive da reta de calibração.

Estes parâmetros LD e LQ podem determinar-se também com base na repetibilidade de brancos ou de padrões de concentração mais baixa da gama de trabalho. Usando um número de ensaios estatisticamente significativo, cerca de 10. As equações para a determinação dos limiares analíticos são:

$$LD = 3,3 \times S_p$$
$$LQ = 10 \times S_p$$

Equação 2.13 – Determinação dos limiares analíticos

Onde, S_p representa o desvio padrão de um conjunto de ensaios com o branco ou do padrão de concentração mais baixa.

2.1.5 Sensibilidade

A sensibilidade corresponde à capacidade de um método distinguir pequenas diferenças de concentração do analito. Sendo a primeira derivada da curva de calibração, representa assim o seu declive e é constante ao longo da gama de trabalho, é dada pela equação 2.14.

$$E = \frac{dy}{dx} \equiv b$$

Equação 2.14 – Determinação da Sensibilidade do método

Um método é chamado sensível quando uma pequena variação na concentração do analito, implica uma grande variação no sinal medido, na prática tal efeito é traduzido por uma maior inclinação da reta. Para determinar a sensibilidade do método de ensaio, deve fazer-se um levantamento no mínimo de cinco declives e calcular a respetiva média e desvio padrão. Os declives das curvas deverão cumprir um coeficiente de variação ou também designado por desvio-padrão-relativo RSD (%) entre elas de valor igual ou inferior a 10%.

2.1.6 Especificidade e Seletividade

A especificidade de um método é a possibilidade de discriminação do analito em detrimento de outras substâncias presentes na amostra em análise.

Relativamente à seletividade esta é a capacidade de um método ser seletivo, revelando assim a sua aptidão para identificar e distinguir o analito presente numa determinada amostra em análise, sem interferência de outros componentes presentes.

As interferências na amostra podem ser analisadas através de um teste de recuperação. Quando aplicável a determinação da seletividade devem fazer-se no mínimo 5 recuperações padrão, em dias diferentes.

O método é seletivo quando apresenta taxas próximas de 100%. Caso não seja atingido esta gama de aceitação então deve ser averiguada a causa do problema. A equação da taxa de recuperação encontra-se no parâmetro da exatidão (testes de recuperação).

Os resultados obtidos na análise das recuperações devem cumprir também um coeficiente de variação (CV), para cada nível de fortificação, inferior ou igual a 10%, para a maioria dos métodos de ensaio. O CV é obtido pela equação 2.15.

$$\%CV = \frac{S_{rec}}{X_{rec}}$$

Equação 2.15- Coeficiente de variação para um dado nível de fortificação

Onde, $\overline{X_{rec}}$ representa a média das concentrações recuperadas e S_{rec} o desvio padrão das recuperações obtidas, ambos para cada nível de fortificação.

2.1.7 Gama de Trabalho

A gama de trabalho define-se como sendo o intervalo de concentrações de um método analítico em que se determina a concentração de analito com o máximo de precisão, exatidão e linearidade.

O extremo inferior do intervalo da gama de trabalho reflete o LQ da gama ou o limite inferior de gama e o superior o valor máximo que se pode determinar com o método em estudo, e no centro deste intervalo deve constar a concentração de analito mais esperada [39]. Quando se usa uma metodologia baseada numa reta de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada segundo a ISO 8466-1:1990 através do teste da homogeneidade de variâncias, para verificar se há diferenças significativas entre os extremos da gama em análise [39]. Para tal, o primeiro, S_1^2 , e o último padrão, S_{10}^2 , são analisados em dez réplicas independentes de forma a determinar as variâncias, de acordo com a equação 2.16.

$$S^2_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} |y_{ij} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1}$$

Equação 2.16 – Cálculo das Variâncias

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

Equação 2.17 – Média dos Resultados

Na equação 2.16 e 2.17, i representa o número do padrão 1 e 10 e j representa o número de repetições dos padrões. Segundo a norma enunciada aplica-se o teste estatístico de Fischer, abordado no subcapítulo do tratamento estatístico dos dados.

2.1.8 Precisão ou Fidelidade (Repetibilidade, Precisão Intermédia e Reprodutibilidade)

Segundo a definição 2.15 do Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) 2012, este critério é uma medida da proximidade dos valores obtidos pelo método analítico, aquando da repetição nas mesmas condições de análise sobre a mesma amostra ou padrão [36].

A precisão pode ser estimada em três modos:

- Repetibilidade (r)
- Reprodutibilidade (R)
- Precisão intermédia.

Repetibilidade (r)

Relativamente à repetibilidade fornece a perceção da variabilidade existente entre os resultados de medições sucessivas realizadas nas mesmas condições, ou seja, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento e em intervalos de tempo curtos.

A diferença absoluta entre dois resultados nas condições enunciadas pode ser baseada no limite de repetibilidade, r . O limite de repetibilidade (r) é obtido pela equação 2.18, para um nível

de confiança de 95%. É de salientar que para determinar a repetibilidade de um método tem de se executar pelo menos dez medições sobre a mesma amostra ou padrão. De acordo com o guia 13 da Relacre, um método é repetível quando a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i, X_{i-1}), obtidos nas condições anteriormente enunciadas, não for superior ao limite de repetibilidade (r), para uma probabilidade específica [39].

$$r = 2,8 \times \sqrt{S_{ri}^2}$$

Equação 2.18 – Limite de repetibilidade

Sendo, S_{ri} o desvio padrão da repetibilidade.

Apesar do critério exposto a repetibilidade deve ser avaliada pelo desvio padrão e pelo coeficiente de variação.

Relativamente ao desvio padrão e ao coeficiente de variação de repetibilidade, estes parâmetros são dados pelas equações 2.19 e 2.20 respetivamente.

$$S_{ri} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^N |y_{ij} - \bar{y}_i|^2}{n_i - 1}}$$

Equação 2.19 – Desvio Padrão

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

Equação 2.20 – Coeficiente de Variação de Repetibilidade

Reprodutibilidade (R)

A reprodutibilidade (R) fornece informação sobre a aproximação maior ou menor existente entre os resultados de medições da amostra/padrão, quando há variação de pelo menos uma das condições em que é feita a análise. Pode destacar-se a alteração ou do laboratório, ou do analista, do tempo de análise ou ainda do equipamento usado na análise laboratorial.

Na seleção dos fatores de variação sempre que possível é importante assegurar variações que reproduzam efeitos com maior variabilidade possível sobre as condições de trabalho.

Precisão Intermédia

Relativamente à precisão intermédia avalia a dispersão dos resultados numa situação intermédia entre a repetibilidade e a reprodutibilidade. Esta variabilidade intralaboratorial é a mais representativa das anteriormente enunciadas. Para o efeito mantem-se o mesmo laboratório, mas faz-se variar uma das outras condições ou o operador, ou o tempo da análise ou o equipamento. Para tal executam-se $n \geq 15$, sendo n o número de medições, em replicado ou em ensaio único, sobre a amostra ou padrão [39].

O desvio padrão da precisão intermédia é calculado através da equação 2.21:

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

Equação 2.21 – Determinação do desvio padrão da precisão intermédia

Sendo que S_{pi} representa o desvio padrão da precisão intermédia, t o número de ensaios, n o número de réplicas, j o número da amostra e k representa o número do resultado obtido para a amostra.

2.1.9 Exatidão ou Justeza

De acordo com a definição 2.14 do VIM 2012 e a 3.1 da norma ISO 11352:2012, a exatidão ou justeza trata de um critério representativo do grau de concordância entre um grande número de resultados obtidos num determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro [36,56].

Os processos mais usados para avaliar a exatidão de um método são:

- Materiais de referência certificados (MRC);
- Ensaio de recuperação
- Ensaio interlaboratoriais (EIL).

Materiais de Referência Certificados

Os MRC são o parâmetro que mais importância assume no requisito de validação da exatidão numa fase de validação de um método. Uma vez que, estes possuem um certificado onde se encontra o valor conhecido para um dado parâmetro e uma incerteza associada.

Após a análise do MRC o valor obtido deve ser comparado com o valor do certificado, ficando assim a conhecer a exatidão da análise. A análise de um MRC deve ser realizada nas mesmas condições das amostras reais.

Caso o valor obtido pelo laboratório esteja no intervalo do MRC então aceita-se, caso contrário o valor obtido no laboratório pode ser rejeitado, dependendo das causas da origem desse desvio.

Para efetuar uma análise à exatidão entre os valores obtidos pelo laboratório e os MRC recorre-se a algum ou alguns dos seguintes critérios:

- Erro relativo, amplitude relativa ou (*bias*³ relativo)
- Erro absoluto
- Teste de hipóteses (teste *t* de *student*)
- Z-Score e /ou
- Erro normalizado.

O erro relativo na análise do MRC é dado pela equação 2.22:

$$\text{Erro Relativo (\%)} = \frac{(x_{Lab} - x_v)}{x_v} \times 100$$

Equação 2.22 – Determinação do Erro Relativo na análise dos MRC

Onde, x_{Lab} representa o valor obtido (ou média aritmética dos valores obtidos pelo laboratório) e x_v o valor verdadeiro ou de referência (certificado).

O erro absoluto na análise do MRC é dado pela equação 2.23:

³ Entende-se por *bias* o desvio entre o valor do laboratório e o valor do certificado do MRC (aceite como verdadeiro).

$$E = |x_{Lab} - x_v|$$

Equação 2.23 – Erro Absoluto análise dos MRC

Onde, x_{Lab} representa o valor obtido (ou média aritmética dos valores obtidos pelo laboratório) e x_v o valor verdadeiro ou de referência (certificado).

O teste t de *student* também tem capacidade para avaliar a componente de erros sistemáticos relativos ao método de ensaio é dado pela equação 2.24:

$$t = \frac{(x_{lab} - x_v) \times \sqrt{n}}{S_{xlab}}$$

Equação 2.24 – Teste t de *student* análise dos MRC

Onde, x_v representa valor verdadeiro ou de referência (fornecido no certificado), x_{lab} representa o valor médio obtido pela análise no laboratório, n representa o número de medições e S_{xlab} corresponde ao desvio padrão da média dos valores obtidos pelo laboratório (x_{lab}). Após o valor de t estar calculado é necessário compará-lo com o valor t tabelado e tomar a decisão estatística em função dos resultados.

O processo de avaliação dos resultados obtidos na análise de um MRC é obtido também pelo fator de desempenho Z-score. Este é dado pela equação 2.25:

$$Z = \frac{(x_{lab} - x_v)}{S}$$

Equação 2.25 – Determinação do Z-score na avaliação dos MRC

Onde, x_{lab} representa o valor médio obtido pelo laboratório, x_v valor verdadeiro ou de referência (fornecido no certificado) e S o desvio padrão fornecido pelo MRC ou um desvio padrão interno.

A avaliação do Z-score encontra-se na figura 2.2.

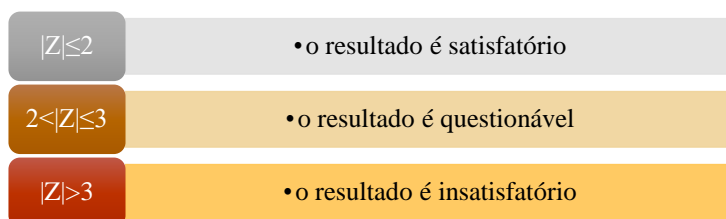


Figura 2.2 – Avaliação Z-score

Outro processo de avaliação dos resultados na análise de um MRC é através do erro normalizado, dado pela equação 2.26:

$$En = \frac{(x_{lab} - x_v)}{\sqrt{u_{lab}^2 + u_{ref}^2}}$$

Equação 2.26 – Erro Normalizado

Onde, x_{lab} valor obtido através da média aritmética dos valores obtidos pelo laboratório, x_v valor verdadeiro ou de referência (certificado) u_{lab} representa a incerteza do laboratório e u_{ref} a incerteza do MRC.

O erro normalizado é calculado quando o laboratório compara o valor verdadeiro do MRC, que se encontra no seu certificado, com a incerteza calculada pelo laboratório. Se o valor do erro for inferior ou igual a 1, significa que a incerteza do laboratório está bem estimada [39].

Ensaio de Recuperação ou Fortificação

Os ensaios de recuperação ou fortificação refletem a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade presente inicialmente na matriz da amostra. Estes ensaios destinam-se a avaliar a existência ou não do efeito de matriz, causado pelas amostras terem composições variadas.

Nos casos em que a exatidão do método é avaliada pela fortificação de amostras com analito no laboratório a recuperação média é determinada através da equação 2.27.

$$\bar{R}_m = \frac{\bar{c}_{obs} - \bar{c}_{nativa}}{c_{fortificação}}$$

Equação 2.27 – Determinação da Recuperação Média

Onde,

\bar{R}_m - Recuperação média;

\bar{c}_{nativa} - Concentração média de analito nativo, ou seja concentração média da amostra não fortificada;

\bar{c}_{obs} - Concentração média da amostra observada após sua fortificação;

$c_{fortificação}$ - Concentração da fortificação utilizada [52].

Ensaio Interlaboratoriais (EIL)

Este parâmetro é importante pois permite que o laboratório evolua tecnicamente o seu desempenho. Uma vez que, possibilita um trabalho conjunto entre equipas e por outro lado, permite ao laboratório analisar as amostras e posteriormente fazer a comparação com os laboratórios participantes, controlando assim a sua competência técnica. Estatisticamente são conclusivos somente os resultados obtidos por pelo menos cinco laboratórios diferentes [53,54]. A exatidão na análise destes ensaios é analisada pelo teste Z-score, referenciado anteriormente.

2.1.10 Testes Comparativos

Para validar um método de ensaio podem fazer-se testes comparativos com um método de referência, isto é, o método já validado. Através destes testes comparativos pode avaliar-se a exatidão dos resultados e verificar a proximidade com os valores obtidos no novo método em relação ao de referência [39].

Esta comparação pode ser realizada utilizando técnicas como:

- Teste de hipóteses: teste t de *student* das diferenças;
- Teste da regressão linear entre os dois métodos de ensaio.

De acordo com Miller, no caso de se utilizar a regressão linear, para fazer a comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos, estes são avaliados por uma equação do tipo $y=b.x+a$. Para verificar a equivalência dos métodos devem ser verificadas duas condições simultaneamente:

- Intervalo de confiança associado à ordenada na origem ($a \pm S_{a,t}$) deve conter o valor zero
- Intervalo de confiança associado ao declive ($b \pm S_{b,t}$) deve conter o valor um 1.

Sendo S_a e S_b o desvio padrão da ordenada na origem e do declive respetivamente, t o valor t tabelado para um nível de confiança de 95%, com $n-2$ graus de liberdade, sendo n o número de amostras estudadas. Quando estas duas condições são satisfeitas pode afirmar-se que os dois métodos são estatisticamente equivalentes [55].

2.1.11 Robustez

A robustez de um método é a capacidade de este conduzir a um resultado mesmo quando o método sofre alterações intencionais. Estas alterações podem ser de temperatura, pH, volumes adicionados, comprimento de onda. Para analisar a robustez pode recorrer-se a testes estatísticos que verificam a influência de cada uma das variações nos resultados [43].

3 Incerteza de Medição

O propósito de qualquer medida analítica é a aquisição de resultados confiáveis, consistentes e objetivos. A incerteza de medição representa a qualidade dos mesmos, já que sem o conhecimento desta, quando os analistas se deparam com determinado resultado analítico não conseguem estabelecer um grau de confiança, nem estabelecer uma comparação entre diferentes medições de um mesmo parâmetro.

A incerteza é um parâmetro pouco consensual junto dos *comitês* analíticos, pelo facto de existirem diversos métodos aceites para a sua determinação. Deste modo é sempre uma decisão do laboratório proceder à escolha do método para a sua determinação, tendo em conta a sua matriz e gama de trabalho. Depois de escolhida a abordagem de determinação da incerteza do resultado, o laboratório deve indicá-la [56].

Segundo GUM, 2012 incerteza (de medição) é “um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem com razoabilidade ser atribuídos à mensuranda”. Este parâmetro pode ser representado através de um desvio padrão ou um intervalo de confiança [43].

De acordo com a norma internacional ISO/IEC 17025:2005, os laboratórios acreditados devem definir procedimentos para a estimativa da incerteza de medição sob certas condições [34].

O item 5.4.6 da norma mencionada refere-se à estimativa da incerteza de medição, parâmetro estimado pelo próprio laboratório aquando da validação usado para reportar os resultados aos clientes.

Genericamente, num processo de medição existem várias fontes de incerteza que em conjunto contribuem para a incerteza global do valor medido. E existirão muitas outras fontes que por serem desconhecidas ou dificilmente quantificáveis não podem ser consideradas [57].

A incerteza é um parâmetro não negativo, dado por um intervalo em redor da mensuranda, em que existe grande probabilidade de se encontrar o valor verdadeiro. Este último valor mencionado na realidade é sempre desconhecido, porém, quando é estimado passa a aceitar-se convencionalmente como uma referência para a estimativa da incerteza e do erro. É importante salientar que estes vocábulos (incerteza e erro), na gíria são usados indiferenciadamente e em metrologia têm significados distintos.

Posto isto, o erro é a diferença entre um resultado da medição de uma grandeza individual e o valor verdadeiro/referência da mensuranda. Já a incerteza de medição deverá abranger todo o tipo de erros associados à medição, nomeadamente erros grosseiros, aleatórios e sistemáticos.

Segundo o ponto B.3.1 da norma ISO 13530:2009 a distinção entre erros aleatórios e sistemáticos é pertinente por duas razões: primeiro, porque têm diferentes origens e segundo porque têm diferentes efeitos sobre os resultados analíticos [51].

Os erros grosseiros são tipicamente gerados por falhas óbvias do procedimento analítico, como, falha humana ou mau funcionamento de equipamentos [43].

Por erro aleatório entende-se um erro que acontece de forma imprevisível, sem causa aparente, mas que influencia a precisão do resultado da medição. Estes erros não podem ser eliminados dado não serem previsíveis, todavia podem ser reduzidos, através do aumento do número de medições.

Já o erro sistemático pode ocorrer de forma regular e previsível num determinado número de análises da mesma mensuranda. Estes erros afetam a exatidão provocando um desvio entre a

média das medições e o valor de referência. Quando é conhecida a origem do erro sistemático, este pode ser corrigido na medição final [36].

Os conceitos exatidão e precisão também são comumente usados como sinónimos, mas em metrologia têm significados diferentes. Para ajudar a compreender melhor estes conceitos pode fazer-se uma analogia entre o processo de medição e o tiro ao alvo. Nesta analogia está implícita a ideia de que, tal como o objetivo de um atirador é atingir o centro do alvo, o objetivo da medição é determinar o valor verdadeiro da mensuranda.

A figura 3.1 representa quatro resultados possíveis e a tabela 3.1 explicita a análise da figura 3.1. A importância do conhecimento efetivo de tais conceitos prende-se com o facto de perceber a exatidão da medição e o tipo de erros associados, uma vez que em condições ideais, um método analítico deve ser exato.

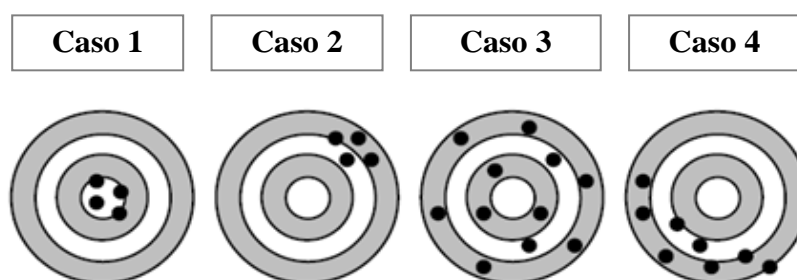


Figura 3.1- Diferença entre exatidão e precisão [39]

Tabela 3.1 – Exatidão e Precisão – Análise da Figura 3.1

Exatidão	Sim	Não	Sim	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Não
Erro Aleatório	Baixo	Baixo	Elevado	Elevado
Erro Sistemático	Baixo	Elevado	Baixo	Elevado

3.1.1 Avaliação da Incerteza

A avaliação da incerteza obriga a um estudo sobre todas as fontes possíveis de incerteza. As fontes que contribuem mais são adicionadas e dão uma boa estimativa da incerteza [43].

A obtenção de uma estimativa da incerteza associada ao resultado de uma medição leva ao estabelecimento prévio de algumas etapas:

- 1º) Especificação da mensuranda e do procedimento;
- 2º) Identificação das fontes de incerteza;
- 3º) Quantificação das componentes de incerteza;
- 4º) Conversão das incertezas em incerteza padrão;
- 5º) Cálculo da incerteza padrão combinada;
- 6º) Cálculo da incerteza expandida.

Para o cálculo da incerteza em ensaios químicos são empregadas as seguintes abordagens metodológicas segundo o guia IPAC OGC007 de 2007, que está atualmente a ser revisto:

- I. Abordagem metodológica passo a passo ou componente a componente;
- II. Abordagem metodológica baseada na informação interlaboratorial;
- III. Abordagem metodológica baseada em dados da validação e/ou controlo da qualidade do método analítico, reunidos em ambiente intralaboratorial [52].

As três abordagens estimam a incerteza e têm em comum as etapas anteriormente mencionadas e estão em acordo com os requisitos do guia EURACHEM 2012 [43].

A primeira abordagem, passo a passo serve de suporte para qualquer avaliação de medida de incerteza, cuja principal vantagem é estimar a contribuição relativa das fontes de incerteza permitindo perceber quais as que mais influenciam o resultado. Tratando-se de uma abordagem bastante demorada é por isso impraticável. Por essa razão surgiram outras formas de calcular as incertezas que simplificaram o seu cálculo e que foram referenciadas no guia da EURACHEM 2012 [43].

Qualquer uma das alternativas à abordagem “passo a passo” apresenta o benefício de permitir, aos laboratórios gastarem menos tempo a calculá-la.

O guia referido recomenda que não se efetue um esforço desproporcional para avaliar as incertezas da medição, e que se utilize os dados de desempenho do método, obtidos aquando da validação do mesmo, e/ou os de controlo de qualidade.

A escolha da metodologia para avaliação de incertezas está por isso, condicionada pela informação disponível.

Caso se verifique que a informação disponível não inclui todas as fontes de incerteza identificadas, deve-se planear uma forma de obter a informação em falta. Nomeadamente através de literatura disponível, certificados, especificações do equipamento, ou experiências. Na prática, uma abordagem combinada entre as fontes de incerteza individuais e a contribuição combinada de todas ou algumas fontes de incerteza é a forma mais viável e comum de se quantificarem as incertezas.

3.2 Abordagem metodológica passo a passo

3.2.1 Especificação da mensuranda e identificação das fontes de incerteza

A mensuranda deve ser expressa através de uma função matemática, f , que a relaciona com as variáveis de entrada, parâmetros de que a mensuranda depende.

$$f: y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$$

A incerteza de medição é afetada, direta ou indiretamente por várias fontes de incerteza que contribuem para a incerteza global. Deve ser feito um levantamento dessas fontes, através de uma listagem para as quantificar, de forma a evitar uma contabilização repetida da mesma fonte. Uma das recomendações mais comuns para se analisarem as várias fontes da incerteza é através da realização de um diagrama de *Ishikawa* ou “espinha de peixe”. As fontes de incerteza mais comuns são associadas aos equipamentos, à pureza dos reagentes, amostragem e técnico [43, 58].

Incerteza associada à interpolação de uma curva de calibração

Relativamente à incerteza de uma concentração interpolada qualquer, x_0 , é dada pela combinação da incerteza da determinação do valor medido e a incerteza da estimativa dos coeficientes de regressão. Pela propagação de erros, para cada valor de x_0 existe um intervalo de confiança do verdadeiro valor de y_0 , delimitado por duas hipérbolas que envolvem a reta de calibração. O desvio padrão estimado para uma determinada concentração, x_0 é dado pela equação 3.1.

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_0 - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}}$$

Equação 3.1 – Desvio padrão para estimar do intervalo de confiança de uma curva de calibração

Onde, $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração, b é o declive, N o número de pontos da curva, n o número de ensaios realizados para cada ponto da curva.

Os limites de confiança de x_0 são dados calculados pela equação 3.2.

$$x_0 \pm t \cdot S_{x_0}$$

Equação 3.2 – Intervalos de confiança de x_0

3.2.2 Quantificação das Componentes de Incerteza

Como referido as componentes de incerteza mais relevantes são quantificadas e a sua quantificação pode ser de dois tipos:

Tipo A – quando é sustentada pelo tratamento estatístico dos dados experimentais, através do cálculo da média estatística de séries de observações repetidas.

Tipo B – quando é sustentada por informação que pode provir de diversas fontes, tais como histórico de dados, experiência ou conhecimento geral do comportamento ou propriedades de instrumentos e materiais, especificação de reagentes, materiais ou equipamentos, dados produzidos através de certificados de medição e calibração ou ainda através de dados de referência retirados da bibliografia [59].

Devem expressar-se todas as contribuições de incerteza de um resultado, x_i , como incertezas padrão, $u(x_i)$, isto quer dizer que são expressas como desvio padrão.

Para a incerteza do tipo A, efetuam-se determinações da média aritmética (equação 3.3) e do desvio padrão (equação 3.4) de uma amostra de n resultados e o erro padrão da média ou incerteza padrão, considerando que os resultados seguem uma distribuição normal [52].

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Equação 3.3 – Determinação da média aritmética

$$S = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})}{n - 1}$$

Equação 3.4 – Determinação do desvio padrão

$$u_{\bar{x}} = S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Equação 3.5 – Determinação da incerteza padrão

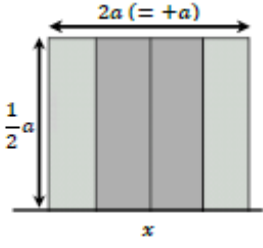
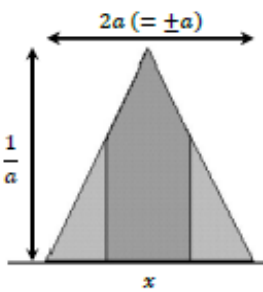
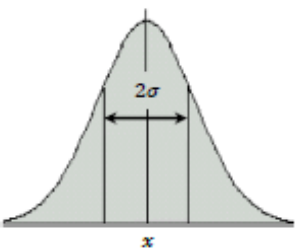
A melhor forma de caracterizar a dispersão de valores em torno do valor médio é através do desvio-padrão dado pela equação 3.4. Este parâmetro determina a contribuição para a incerteza proveniente da avaliação tipo A. A incerteza associada à precisão é dada pela equação 3.5.

A incerteza do tipo B pode encontrar-se expressa sob várias configurações geométricas bem definidas, baseadas nas distribuições retangular, triangular e normal, para as quais o desvio padrão pode ser obtido.

A incerteza padrão é definida como um desvio padrão e é dada pela razão entre a incerteza e um número associado à distribuição probabilística assumida.

Na próxima tabela 3.2 encontram-se os vários tipos de incerteza que são usados quando é feita uma estimativa de incerteza pelo tipo B [43].

Tabela 3.2 - Tipos de distribuição e avaliação da incerteza do tipo B [43]

Forma	Distribuição	Incerteza
	<p style="text-align: center;"><u>Retangular</u></p> <p>Usada quando um certificado ou uma especificação limita sem especificar um nível de confiança.</p> <p>É realizada uma estimativa sob a forma de uma faixa máxima ($\pm a$), sem ter conhecimento do formato da distribuição.</p>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}}$
	<p style="text-align: center;"><u>Triangular</u></p> <p>Usada quando a informação relativa a x é menos limitada, do que para uma distribuição retangular. Valores próximos de x são mais prováveis do que próximos dos limites.</p> <p>É realizada uma estimativa sob a forma de uma faixa máxima ($\pm a$), descrita por uma distribuição simétrica.</p>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}}$
	<p style="text-align: center;"><u>Normal</u></p> <p>É realizada uma estimativa baseada em observações repetidas de um processo de variação aleatória.</p> <p>É dada uma incerteza sob a forma de desvio padrão, s, um desvio padrão relativo s/\bar{x}, ou um coeficiente de variação sem se especificar a distribuição.</p> <p>É dada uma incerteza sob a forma de um intervalo $x \pm c$ com determinada percentagem de confiança, sem se especificar a distribuição.</p>	$u(x) = s$ $u(x) = \frac{(\%)CV}{100} \times x$ $u(x) = \frac{c}{2}, c \text{ a } 95\%$ $u(x) = \frac{c}{3}, c \text{ a } 99,7\%$

3.3 Abordagem baseada em dados de validação do método

Este tipo de abordagem é usado para obter a incerteza do método, visto que faz uma abordagem baseada em dados de validação usando parâmetros de avaliação global do método.

3.3.1 Incerteza Associada à Precisão do Método

Nos ensaios químicos a componente da incerteza associada à precisão é a que mais contribui para a incerteza global. Por esta razão a incerteza associada à precisão deve ser o mais realista possível, sendo aconselhável que esta seja avaliada em condições de precisão intermédia, em vez de condições de repetibilidade. Uma vez que em condições intermédias conseguem-se variações do desempenho do método em função de modificações de parâmetros experimentais que são mantidos constantes caso o estudo seja efetuado em repetibilidade [52]. Se os ensaios forem realizados em dias diferentes assume-se que existe uma variação de grande parte dos parâmetros experimentais que contribuem para o desempenho do método [60, 61].

A componente da incerteza relacionada com a precisão dos resultados é calculada de diversas formas, de onde se destaca, a sua determinação pelo coeficiente de variação dos duplicados ou repetibilidade de um padrão, equação 3.6.

$$u'_{\text{precisão}} = \frac{S_{\text{precisão}}}{y} = (\%)CV$$

Equação 3.6 – Cálculo da incerteza para ensaios em repetibilidade

$\left(\frac{S_{\text{precisão}}}{y}\right)$ representa o desvio-padrão relativo (ou coeficiente de variação).

A precisão pode ser determinada também a partir do resultado dos duplicados de diversas amostras ou padrões. A incerteza relativa à precisão pode também ser estimada com base na amplitude relativa média dos duplicados, através da equação 3.7.

$$u'_{\text{precisão}} = \frac{\bar{A}'}{1,128}$$

Equação 3.7 – Cálculo da incerteza para ensaios em duplicado

Onde \bar{A}' representa a amplitude média relativa dos duplicados e 1,128, o valor tabelado, quando se faz o duplicado de uma amostra ou padrão.

3.3.2 Incerteza Associada à Exatidão do Método

Segundo o Nordetest TR 537 de 2012 e a norma ISO 11352:2012 a exatidão de método pode ser avaliada através de MRC, ou de recuperações ou ainda de ensaios interlaboratoriais (EIL).

A componente da incerteza associada ao MRC é estimada com base na equação 3.8.

$$u'(\text{bias}) = \sqrt{(bias_{rel})^2 + \left(\frac{S_{bias}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(Cref)^2}$$

Equação 3.8 – Cálculo da incerteza associada ao MRC

Na equação 3.8 $bias_{rel}$ é o erro relativo entre o valor do laboratório e o valor do certificado, S_{bias} é o desvio padrão dos vários ensaios de MRC, n representa o número de ensaios e $u(Cref)^2$ incerteza-padrão relativa associada ao valor de referência do MRC. Quando $u(Cref)^2$ tem uma contribuição mínima para a incerteza pode ser desprezado [56,62].

3.3.3 Incerteza Combinada

Depois dos componentes de incerteza serem expressos como incerteza padrão deve calcular-se a incerteza combinada, desprezando-se todas as fontes que sejam inferiores a 1/3 da incerteza maior [43, 60].

Posteriormente, a serem estimadas as incertezas associadas à precisão e exatidão do método, calcula-se a incerteza padrão combinada, através da equação 3.9:

$$u_{combinada} = \sqrt{u_{precisão}^2 + u_{exatidão}^2}$$

Equação 3.9 – Estimativa da incerteza combinada

3.3.4 Incerteza Expandida

Por fim, tem de ser calculada a incerteza expandida, U, pela equação 3.10. Quando as incertezas associadas à exatidão e precisão são estimadas através de um número de ensaios considerável, isto é, superior ou igual a 6, a incerteza expandida é obtida pela multiplicação de um fator de expansão, k, que varia entre 2 e 3 estando essa escolha associada ao nível de confiança de 95% ou 99%, respetivamente. Normalmente utiliza-se $k=2$ [60].

$$U(y) = k \times u_{combinada}(y)$$

Equação 3.10 – Determinação da Incerteza Expandida

Após a determinação da incerteza expandida o resultado está pronto a ser reportado. Recomenda-se que a incerteza não tenha mais do que dois algarismos significativos e que a mensuranda seja apresentada com o mesmo número de casas decimais que a incerteza. O resultado deve ser representado, tal como indicado na equação 3.11 [43,60,61].

$$\text{“Resultado: } y \pm U(y)\text{” (unidades)}$$

Equação 3.11 – Resultado de uma medição analítica

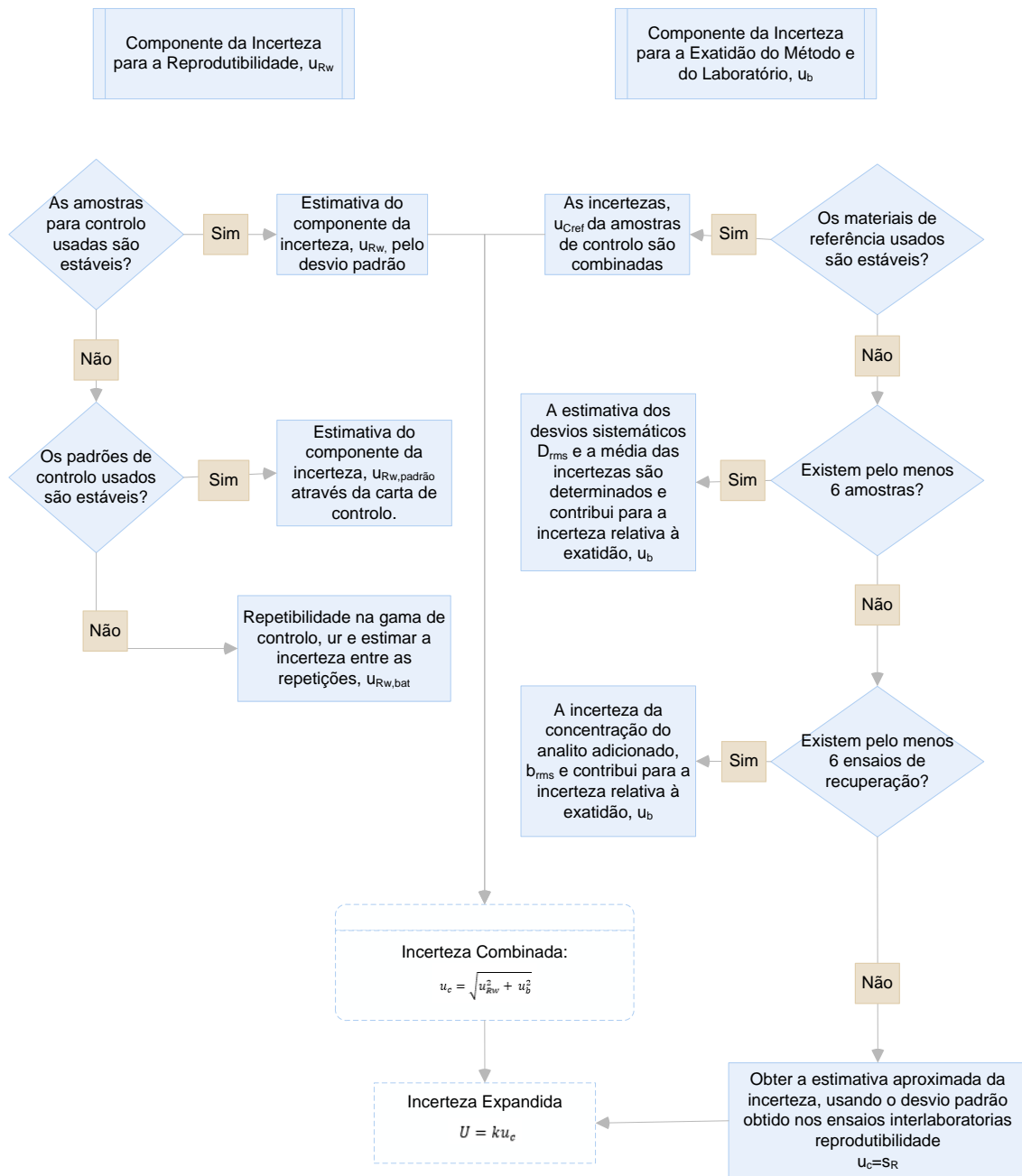


Figura 3.2 – Esquema Determinação Incertezas baseado na ISO 11352:2012 [63]

4 Importância do Controlo de Qualidade

Este capítulo da dissertação visa mostrar o quão vantajoso é para uma empresa investir num sistema de controlo de qualidade (SCQ) dos seus produtos/serviços de forma a assegurar bons resultados.

Existem vários modelos que evidenciam a importância da qualidade, propostos ao longo dos anos. Nomeadamente, Shewhart, Demming e Juran contribuíram para a desmistificação do conceito de qualidade, que era reconhecido apenas como um aumento de custos nos processos. O modelo de Demming encontra-se representado na figura 4.1 [38, 89].

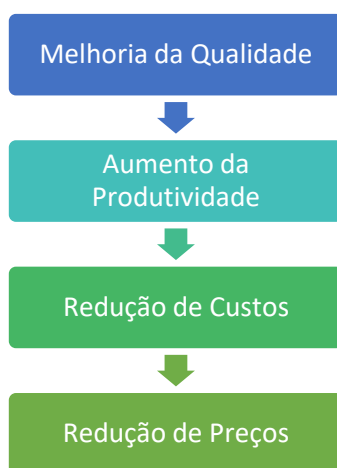


Figura 4.1 – Modelo da Qualidade segundo Demming

Segundo este modelo deve melhorar-se constantemente qualquer processo, produção e/ou fornecimento de um serviço de forma a satisfazer os clientes. Não basta conduzir um negócio exclusivamente pelo preço final do produto/serviço.

O controlo de qualidade trata-se de um conjunto de medidas organizacionais que privilegiam a prevenção e o desencadeamento de ações corretivas aumentando a interoperabilidade do mercado, a qualidade a médio/longo prazo e a redução de custos do processo. Ao garantir a qualidade, garante-se a confiança nos resultados exigidos pelos clientes num mercado cada vez mais competitivo e globalizado.

A finalidade de uma medição analítica é obter resultados consistentes e confiáveis. Não há dúvida que medições incorretas ou de fraca exatidão podem conduzir a grandes custos, por exemplo, pelos reagentes gastos, por outro lado levam também à perda de confiança do laboratório por parte dos seus clientes.

Deste modo, qualquer laboratório deve fazer todos os possíveis para garantir medições confiáveis dentro de critérios de aceitação estabelecidos previamente e prevenir resultados tendenciosos ou menos conformes. Por isso, também através de um processo de validação devidamente controlado se consegue ter o método sob controlo e perceber desde logo as suas limitações, não só nessa fase importante como depois da implementação do método e nos processos de revalidação subsequentes para avaliação da sua adequabilidade ao uso [38].

Para cumprirem com os critérios de qualidade os laboratórios definem um sistema de controlo de qualidade apropriado ao tipo de ensaios, à gama e ao volume de trabalho sendo estes

descritos no Manual da Qualidade ou procedimentos conexos do laboratório, para além de utilizarem os métodos de ensaio validados.

A importância da qualidade advém do facto de ser um parâmetro decisivo na análise dos resultados laboratoriais conducentes a inúmeras decisões que influenciam a vida de todos e custos inerentes aos processos que suportam [34]. Trata-se de um meio diferenciador para provar a prestação de um serviço seguro.

De forma a haver um melhor controlo dos resultados de determinado processo/método devem haver registos técnicos, importantes para se detetarem mais facilmente falhas e/ou resultados tendenciosos e desencadear medidas corretivas atempadamente [54].

A garantia da qualidade de resultados de ensaios e calibração é um dos requisitos de competência da Norma de Acreditação de Laboratórios NP EN ISO/IEC 17025:2005. Sendo um dos seus objetivos a criação de políticas de gestão do laboratório relativas à boa prática profissional, providenciando um controlo rigoroso de documentos e a qualidade dos seus ensaios. Nomeadamente, a norma citada refere no ponto 5.9.1 que: “ (...) os dados daí resultantes devem ser registados por forma a que se possam detetar tendências e, sempre que praticável, ser aplicadas técnicas estatísticas na análise dos resultados” [34].

A certificação de uma empresa é realizada por um Sistema de Gestão e Qualidade (SGQ) fundamentado na norma NP EN ISO 9001:2008. Esta norma é reconhecida internacionalmente e especifica os requisitos para um SGQ, de forma que um produto ou serviço se adequa às necessidades dos clientes. A aplicação dos sistemas de gestão da qualidade e das normas ISO 9001 visam um conjunto de benefícios de onde se podem salientar o facto de haver uma clarificação e hierarquização de responsabilidades, uma diminuição da produção de produtos/serviços não conformes, uma identificação mais precoce de possíveis falhas com rápida intervenção no sentido de as eliminar [64].

Uma das formas de analisar um problema em estudo, por exemplo um método de ensaio será através de um diagrama de Ishikawa cujo autor foi Kaouru Ishikawa, o diagrama é também designado por causa-efeito ou ainda espinha de peixe dadas as suas semelhanças. Foi desenvolvido em 1943, com o intuito de mostrar através de um *brainstorming* quais as várias causas que podem levar à ocorrência de um determinado problema, tratando-se portanto de uma ferramenta de controlo de qualidade. Para ser mais fácil e rápida a leitura do diagrama as causas são agrupadas em seis subgrupos: Meio Ambiente, Mão-de-obra, Máquinas, Método, Medição e por fim Material [65, 66].

A investigação da equipa segue de acordo com a organização das causas e pela probabilidade de serem a origem do problema. A constituição de grupos e a deteção do problema que existe num método, num processo, numa empresa em geral é a etapa essencial para o sucesso, visto permitir destrinçar a complexidade da situação para construir relações causa-efeito e assim conseguir equacionar possíveis soluções. Este diagrama também ajuda na determinação da incerteza para o método em estudo uma vez que ajuda a conhecê-lo mais detalhadamente.

4.1.1 Controlo de qualidade interno e externo

O controlo de qualidade de um método analítico divide-se em controlo interno e controlo externo.

O controlo de qualidade interno foca-se sobretudo na precisão do método e corresponde às ações realizadas internamente pelo laboratório. Nomeadamente são realizados com uma periodicidade definida pelo laboratório, padrões de controlo, duplicados, fortificação de amostras, brancos e ainda amostras cegas para que sejam detetadas eventuais contaminações e resultados que não estejam em conformidade com a qualidade definida.

Entende-se por duplicado a realização de ensaios sobre duas tomas de amostra submetidas em separado a todo o processo analítico [54].

A avaliação de duplicados tem sobretudo dois benefícios nomeadamente a deteção de erros grosseiros (*outliers*) e os erros aleatórios podem ser reduzidos. Segundo a norma ISO 13530:2009, caso seja necessária uma elevada precisão dos resultados, o número de análises de duplicados deve ser maior que 6 [51].

Segundo o guia nº3 da relacre devem ser realizados duplicados em todas as amostras desconhecidas e em 10% das amostras de rotina.[44] Já o guia da IPAC é mais flexível e recomenda a realização de análises de duplicados com uma frequência não inferior a 5% das amostras analisadas. Contudo, com base no método em análise, a realização de análise em duplicado deverá ser efetuada pelo menos 24 vezes ao longo de um ano, em amostras representativas [54].

A percentagem referente ao critério de aceitação de duplicados é obtida através da equação 4.1.

$$(\%) \textit{ Amplitude Relativa} = \frac{x_1 - x_2}{\bar{x}} \times 100$$

Equação 4.1 – Amplitude relativa de duplicados

Sendo x_1 e x_2 os valores obtidos para a amostra/padrão e respetivo duplicado e \bar{X} a média de ambos os duplicados.

Cabe aos laboratórios definirem os critérios de aceitação/rejeição para a qualidade dos seus resultados seja controlada [44].

Relativamente ao controlo externo depende de uma intervenção externa ao laboratório, neste controlo são usados materiais de referência certificados (MRC) e ensaios interlaboratoriais (EIL). Este controlo foca-se sobretudo na exatidão dos resultados do método.

A periodicidade da realização destes depende da sua frequência, sendo a frequência mínima um ano e do nível de confiança exigido.

4.1.2 Tratamento Estatístico de Dados

Algumas das ferramentas fundamentais usadas num sistema de controlo de qualidade rotineiro são os testes estatísticos, servindo para ajudar na interpretação de resultados e na tomada de decisões.

4.1.3 Teste F – Fisher

O teste F é usado para se saber se a gama de trabalho está ou não bem ajustada, ou seja, se há homogeneidade de variâncias. São definidas duas hipóteses para explicar uma observação.

- Hipótese nula, H_0 , que afirma que as variâncias que estão a ser comparadas não apresentam diferenças significativas;
- Hipótese alternativa, H_1 , que afirma que essas grandezas apresentam diferenças significativas, para um determinado nível de significância, α . Sendo este habitualmente $\alpha=0,05$. Porém, pode também diminuir para $\alpha=0,01$.

Quando se pretende fazer a comparação de variâncias de distribuições normais, aleatórias e independentes.

Assim determina-se o quociente entre as variâncias dos dois pontos extremos da curva, pois são os valores que normalmente assumem maiores variâncias.

Quando a variância do último padrão é superior à do primeiro recorre-se à equação 4.2, caso contrário usa-se a equação 4.3.

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_{10}^2 > S_1^2$$

Equação 4.2 – Teste PG - Quociente entre as variâncias

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2} \text{ quando } S_1^2 > S_{10}^2$$

Equação 4.3- Teste PG - Quociente entre as variâncias

Depois de ser calculado do valor de F este deverá ser comparado com os valores tabelados, para N_1-1 e N_2-1 graus de liberdade de onde se concluirá que:

- Se $PG > F$ significa que as diferenças de variâncias são significativas, implicando uma redução da gama de trabalho, rejeita-se a hipótese nula.
- Se $PG \leq F$ significa que as diferenças de variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada, aceita-se a hipótese nula [39, 55].

4.1.4 Teste t-student das diferenças (amostras emparelhadas)

Utiliza-se este teste estatístico t de *student* para comparar dois métodos, através da diferença, d, entre cada par de resultados dado para cada amostra. Se não houver diferença entre os dois métodos, essas diferenças terão média nula. O teste exige que o número de ensaios seja igual para os dois métodos.

$$t = \frac{d\sqrt{n}}{S_d}$$

Equação 4.4 – Teste estatístico t de *student*

Onde d, corresponde à diferença entre cada par de resultados, dados por cada método para cada amostra, n representa o número de determinações e s_d o desvio padrão das diferenças.

Os dois métodos de análise terão de ser comparados através da determinação da concentração de determinado parâmetro, por exemplo o CQO. As amostras terão de ser analisadas em cada método para ver se os resultados obtidos pelos dois métodos diferem ou não.

Se o valor $t_{\text{calculado}}$, em valor absoluto, for inferior ou igual ao t_{tabelado} para N-1 graus de liberdade os métodos não apresentam desvios significativos [39, 55].

4.1.5 Teste de Grubbs

Os analistas estão habituados a terem situações práticas em que num conjunto de dados exista um ou mais valores que diferem dos restantes, ainda que não que hajam razões aparentes para a sua ocorrência.

Por isso torna-se relevante analisar os dados criteriosamente e perceber se se têm valores dispares de forma a poder corrigir erros em situações futuras ou retirar esse(s) valor(es) do conjunto de dados, considerando-os aberrantes.

Para tal existem técnicas estatísticas sensíveis à presença de *outliers*, independentemente da causa do seu aparecimento.

O teste de Grubbs é uma das ferramentas comumente usadas para a descoberta de valores atípicos, aplicando-se para se confirmar se um resultado que difere do conjunto obtido é aberrante ou não. Este teste analisa o desvio do valor suspeito em relação à média com o desvio padrão do conjunto de dados. Muitas vezes é retirado de um conjunto dos dados o valor mais anómalo, isto é o que está mais distante da média e faz-se uma segunda avaliação onde pode surgir outro, e assim sucessivamente. Este último efeito descrito é denominado de *swamping*.

Entende-se por valor aberrante ou *outlier* um valor que não pertence a uma determinada distribuição. O teste de Grubbs é definido por duas hipóteses:

- Hipótese nula, H_0 , em que o valor em análise (suspeito) não é *outlier*, dado não diferir do valor médio do conjunto de valores obtidos;
- Hipótese alternativa, H_1 , em que esse valor suspeito é de facto um *outlier*.

$$G_p = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s_x}$$

Equação 4.5 – Teste de Grubbs

Na equação 4.5, x_i representa o valor suspeito, \bar{x} o valor médio, s_x o desvio padrão dos valores experimentais, incluindo o valor posto em causa. Este valor só é excluído caso exceda o valor crítico tabelado referente a um grau de 95% de confiança, para o número total de valores experimentais. O teste mencionado assume uma distribuição normal [55].

5 Métodos para Validação

O laboratório de Beírolas analisa as águas residuais através de um conjunto de parâmetros por métodos analíticos baseados em normas internacionais ou no Standard Methods.

O facto dos métodos clássicos usados serem muito demorados e muito dependentes do analista, levaram o laboratório à procura de um método em *scale down* que permitisse analisar os parâmetros de depuração de uma AR, mas mais rapidamente, trazendo benefícios para o processo em *scale up*.

5.1 Espectrofotometria

Os micro métodos que irão ser implementados no laboratório são métodos por espectrofotometria de absorção molecular.

Esta estuda a interação entre a radiação e a matéria em função do comprimento de onda (λ). A radiação eletromagnética é caracterizada através da energia, velocidade, amplitude, frequência, e comprimento de onda.

Todas as radiações eletromagnéticas têm a mesma velocidade no ar e no vácuo, cerca de aproximadamente $3,0 \times 10^8$ m/s, contudo diferem umas das outras em termos de frequência e comprimentos de onda.

O Homem só tem capacidade para ver uma parte muito restrita do espectro da radiação, radiação visível, compreendida entre 400-700 nm, tal como é possível verificar pela figura 5.1.

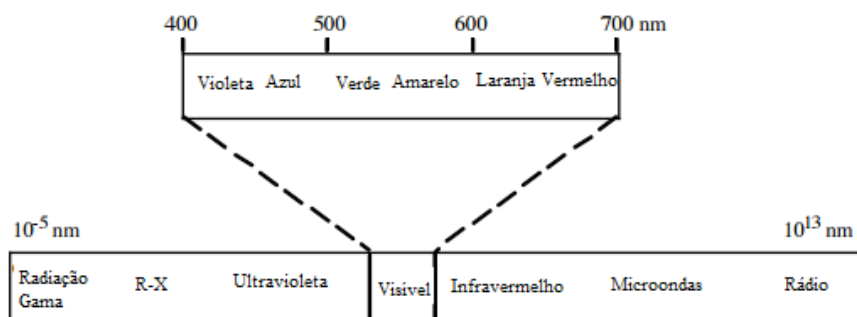


Figura 5.1 – Espectro eletromagnético [67]

A radiação, ao incidir numa amostra, pode ser absorvida, transmitida ou refletida. A energia é transferida do fóton proveniente da radiação eletromagnética e uma parte é absorvida pelo analito existente na amostra, promovendo a passagem dos eletrões do analito de um estado de energia mais baixo para um mais elevado, ou seja, para o estado excitado. A intensidade dos fótons que passam através de uma amostra contendo o analito é diminuída pelo fenómeno de absorção. Essa diminuição é proporcional à turvação da amostra e à concentração de analito na amostra.

A absorção surge quando a energia do fóton corresponde à diferença de energia, ΔE , entre dois níveis de energia. A zona da molécula responsável pela absorção de luz denomina-se cromóforo [49, 68]. A relação entre a absorvância e a concentração de uma amostra baseia-se na lei de Lambert-Beer, expressa na equação 5.1.

$$A = \epsilon b C$$

Equação 5.1 – Lei de Lambert-Beer

Onde, ε é absorvividade molar, b o percurso ótico e C a concentração da amostra.

Os requisitos de um espectrofotómetro *split beam*, como o DR 3900 da Hach Lange® estão representados na figura 5.2. Como se pode observar, um feixe de luz, proveniente de uma fonte com emissão espectral contínua (monocromador) é dividida em dois feixes que atravessam simultaneamente as células de referência e da amostra antes de atingir o detetor. Ao incidir numa amostra, contida num *kit* com uma espessura b , o feixe atravessa a amostra e a radiação incidente (I_0) sofre fenómenos de dispersão e de absorção de acordo com os diferentes níveis energéticos. Depois de atravessar a amostra, a radiação remanescente (I) é medida num detetor e comparada com a radiação incidente (I_0). As vantagens da utilização de espectrofotómetro são o facto de haver menor instabilidade devido ao envelhecimento da lâmpada e diminui eventuais flutuações de tensão não afetando assim as medições [69].

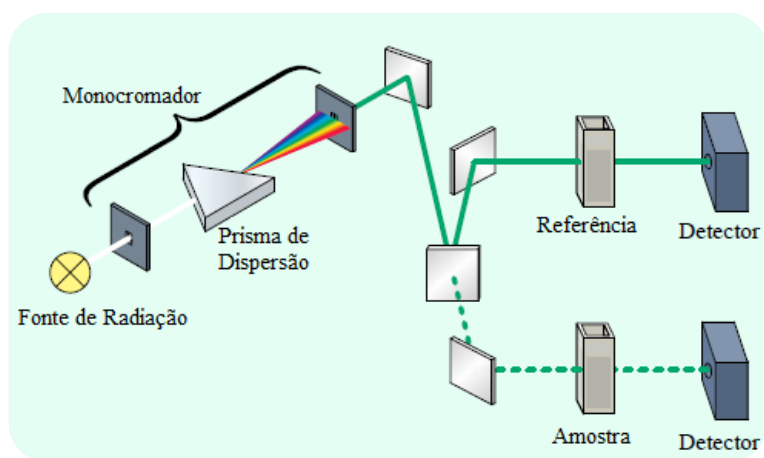


Figura 5.2 – Componentes de um espectrofotómetro [69]

Para que este procedimento possa ser aplicado, todos os interferentes de absorção de luz devem ser mínimos ou nulos. Através da figura 5.3 pode ter-se uma perceção do que acontece, quando existem interferentes na amostra, estes não permitem a chegada da radiação ao detetor levando à obtenção de resultados pouco fidedignos. As interferências de um método espectrofotométrico podem ter origem química ou física, destacam-se as suspensões de sólidos e as coloidais, uma vez que amostras com muitos sólidos em suspensão são demasiado turvas, o que perturba as leituras das absorvâncias [70].

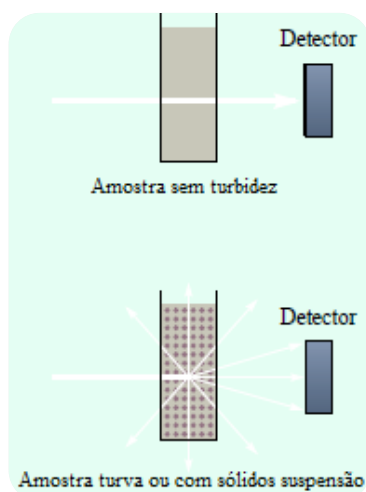


Figura 5.3 – Interferentes presentes na amostra [69]

5.2 Determinação da Carência Química de Oxigênio – Método Clássico

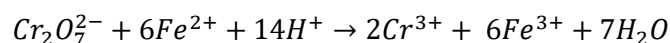
Um dos parâmetros mais importantes na análise de uma água residual é o parâmetro CQO uma vez que avalia a matéria orgânica presente nas AR (industriais e/ou domésticas). Na realidade os componentes orgânicos e inorgânicos de uma amostra são sujeitos a oxidação, mas na maioria dos casos o componente orgânico predomina [71].

O método clássico de determinação de carência química de oxigênio (CQO) usado no laboratório é um método de refluxo aberto baseado na ISO 6060:1989.

O procedimento para determinação de CQO em águas residuais quantifica a concentração (em massa) de oxigênio equivalente à fração orgânica da amostra oxidada por ação do reagente químico – dicromato de potássio, $K_2Cr_2O_7$.

Quando a matéria orgânica é oxidada pelo dicromato em meio ácido, a temperaturas elevadas a maior parte do carbono é convertido em CO_2 e o hidrogênio presente é convertido em H_2O [72]. Nestas condições reacionais garante-se que a maioria dos compostos orgânicos é oxidada. Segundo o *Standard Methods* o método de refluxo do CQO é responsável por eliminar cerca de 95 a 100% do valor teórico da matéria orgânica presente nas amostras de AR [71].

A oxidação deve ser realizada na presença de um catalisador, sulfato de prata, este é fundamental sobretudo para oxidar compostos alifáticos de cadeia linear, compostos como a piridina, hidrocarbonetos aromáticos que são mais resistentes à oxidação [71, 72]. Pode-se traduzir o anteriormente mencionado através da seguinte reação química:



Após a digestão procede-se à titulação do $K_2Cr_2O_7$, através da solução titulante de sulfato de ferro (II) e amônio, de forma a determinar-se a quantidade de $K_2Cr_2O_7$ consumido. Como a matéria orgânica oxidável é proporcional ao consumo de dicromato de potássio tem-se desta forma uma boa estimativa do estado da água [72]. Em cada tubo, figura 5.4 é colocada a amostra a analisar, o dicromato, o ácido sulfúrico – sulfato de prata, seguindo-se a digestão durante 120 minutos a $148 \pm 3^\circ C$, no digestor representado na figura 5.5. Depois é adicionada água a cada tubo e cerca de três gotas de ferroína (solução indicadora). Segue-se a titulação com agitação contínua, vai-se adicionando o titulante até mudança de cor do indicador que sinaliza o ponto final da titulação, tal como se pode ver pela figura 5.6. Através da equação química e do volume do titulante gasto, a quantidade de matéria orgânica presente na amostra pode ser determinada [72].



Figura 5.4 – Preparação dos tubos de ensaio – método clássico CQO



Figura 5.5 – Método Refluxo Aberto - Digester DK 20 Heating Digester (Velp Scientifica)



Figura 5.6 – Determinação do Ponto de Equivalência CQO

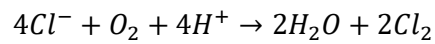
Este método volumétrico é aplicado somente a amostras de AR em que o CQO está compreendido no intervalo de concentrações de 30 a 700 mg/L O₂. Nos casos em que o valor de CQO da amostra de AR excede o limite máximo referenciado a amostra terá de sofrer uma diluição, para se obter um resultado dentro da gama de trabalho estabelecida [72].

5.2.1 Interferências e Limitações

Um grande inconveniente deste método é a presença de cloretos, uma vez que têm a capacidade de reagir com o ião prata inibindo assim a atividade deste catalisador. É por esta razão que o sulfato de mercúrio (HgSO₄) é usado no método de forma a reagir com os iões cloreto, gerando um precipitado, cloreto de mercúrio. A proporção utilizada para esta eliminação de interferência é de 10:1 (HgSO₄: Cl⁻¹) [71].

Nas situações em que as amostras apresentam uma quantidade igual ou superior a 1000 mg/l deste sal tem de proceder-se a uma diluição das amostras por forma a reduzir a quantidade de cloretos presentes e diminuir a sua interferência. Estas interferências reduzem a ação do agente oxidante - dicromato de potássio.

As concentrações elevadas de cloretos podem dar origem a interferências positivas, causada pela reação de oxidação dos iões cloreto a cloro, tal como explicitado na equação química 5.2.



Equação 5.2 – Equação Química oxidação dos iões cloreto a cloro

Os cloretos surgem nas amostras naturalmente, através do contacto da água com rochas, solos, intrusão do mar em água doce, ou através da ação antropogénica através de esgotos e descargas industriais petrolíferas [71-73].



Figura 5.7 – Amostras acidificadas para análise de CQO

5.3 Determinação da Carência Química de Oxigênio – Micro Método

O método de refluxo fechado à pequena escala ou micro método é baseado numa análise espectrofométrica de absorção molecular, tendo por base também uma digestão com o dicromato de potássio em meio ácido. Pelo facto de ser um método em refluxo fechado permite que os compostos orgânicos voláteis (COV) sofram uma oxidação maior devido a um contacto maior entre eles e o agente oxidante [71].

Segundo a ISO 15705:2002, norma para a determinação de CQO à pequena escala, a quantidade de dicromato usada no processo é determinada pela medição da absorvância do Cr^{3+} e Cr^{6+} , respetivamente para comprimentos de onda de $600\pm 20\text{nm}$, $348\pm 15\text{nm}$ ou em alternativa a $440\pm 20\text{nm}$ [74]. As gamas CQO são definidas pelo fabricante, neste caso concreto a Hach Lange®. Pelo que tal como é referenciado na norma enunciada estas gamas comerciais, não deverão ser excedidas. As gamas do fabricante escolhidas pelo laboratório estão apresentadas na figura 5.8. Contudo, importa evidenciar que a Hach Lange® disponibiliza ao cliente cerca de 10 gamas diferentes permitindo na esmagadora maioria dos casos determinações diretas.

No início deste estudo de validação avaliou-se também a gama pertencente ao LCK 114, [150-1000] mg/L O_2 , com a evolução do estudo o laboratório decidiu prescindir desta gama, em detrimento de ter a gama de 100 a 2000 mg/L O_2 . Conseguindo mesmo sem essa gama ajustar as suas amostras [75, 74].

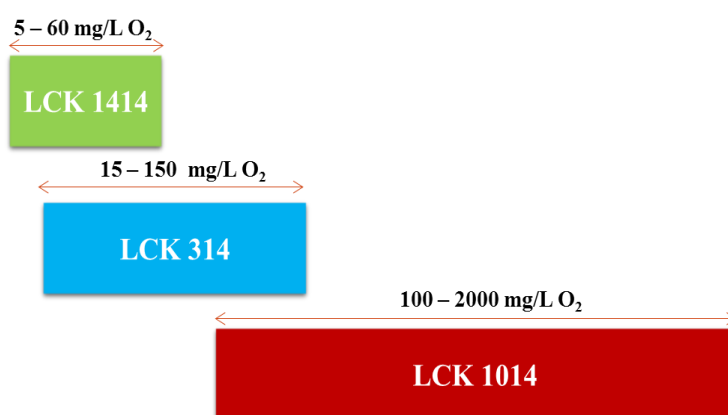


Figura 5.8 – Gamas de Trabalho dos kits da Hach Lange®, para o parâmetro CQO



Figura 5.9 - Embalagens das gamas em análise da Hach Lange® para a determinação de CQO

5.3.1 Procedimento Experimental

Tal como é referido na norma do micro método de determinação de CQO, ISO 15705:2002, os técnicos de laboratório deverão seguir as instruções fornecidas pelos fabricantes para a realização do método. Desta forma, apresenta-se na figura 5.10 e 5.11 o procedimento experimental utilizado ao longo do trabalho, indicado pelo fornecedor.

O micro método do CQO consegue eliminar interferências de cloretos até concentrações de 1500 mg/L, nas gamas baixa e intermédia, correspondentes ao LCK 1414 e LCK 314. Na gama alta LCK 1014 o método consegue suportar concentrações maiores de cloretos e elimina interferências até 4000 mg/L. Acima destes valores os cloretos causam interferências nas análises, pelo que nessas situações as amostras deverão ser previamente diluídas [76-78].

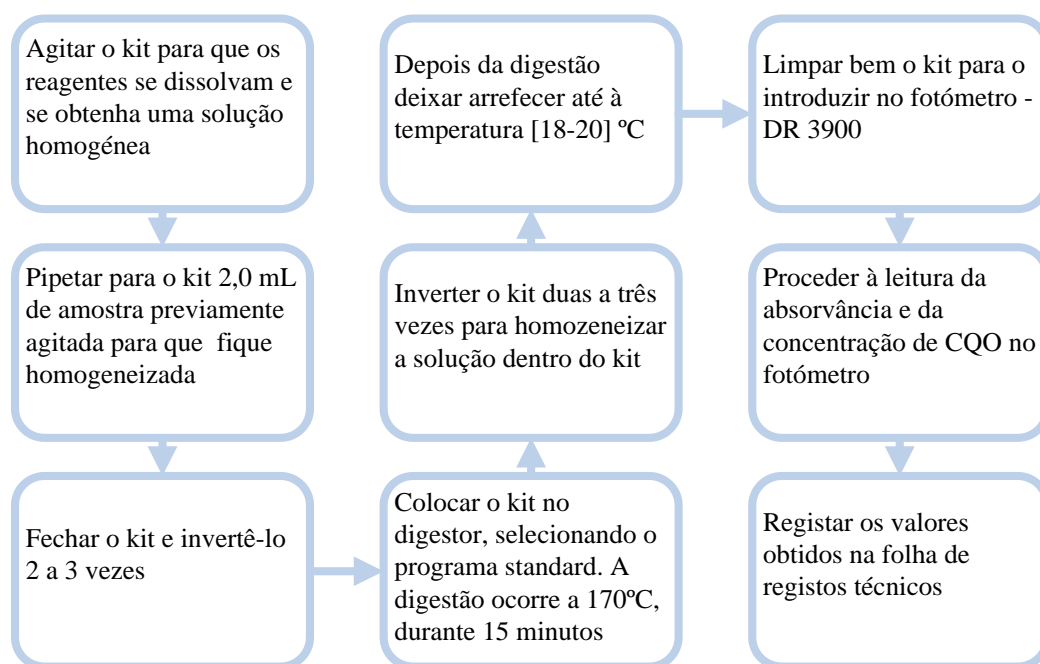


Figura 5.10 – Fluxograma do procedimento experimental do micro método para o parâmetro CQO

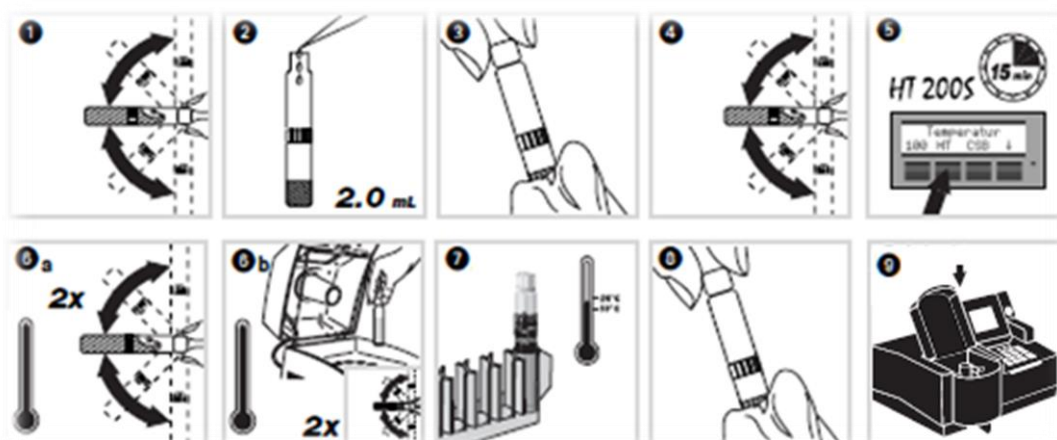


Figura 5.11 – Procedimento Experimental do método em pequena escala para o parâmetro CQO [77]

5.4 Determinação de Azoto

5.5 Azoto Total

O azoto é um elemento extremamente importante para os seres vivos, uma vez que faz parte da estrutura de algumas moléculas essenciais à vida tais como as proteínas e os ácidos nucleicos. Existe em grande quantidade na atmosfera terrestre, uma vez que cerca de 79% desta camada gasosa é constituída por azoto, contudo a forma gasosa não é utilizada pela maior parte dos organismos devido à sua elevada estabilidade molecular.

O ciclo do azoto apresentado na figura 5.12 é um dos principais ciclos de nutrientes dos ecossistemas naturais [31].



Figura 5.12 – Ciclo do Azoto [31]

O azoto existente nas águas residuais pode existir de diversas formas nomeadamente, na forma de amoníaco (NH₃), ião amónia (NH₄⁺), azoto molecular (N₂), nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻) e azoto orgânico (N-orgânico).

A poluição azotada das águas residuais está associada à utilização de fertilizantes sintéticos, degradação do material vegetal, animal e excreção de resíduos de origem animal (ureia, ácido úrico, purinas e pirimidinas). O azoto é também libertado pelos microrganismos nos sistemas de tratamento, durante o seu metabolismo, morte e lise celular. Relativamente ao teor de nitratos presente numa água pode resultar da dissolução mineral, da oxidação de águas residuais ou lixiviação de terrenos agrícolas fortemente adubados.

A descarga de águas residuais ricas em compostos azotados tem consequências nefastas para o meio ambiente e para o Homem. O excesso de azoto nas AR implica:

- Um processo de eutrofização acelerado;
- Um aumento do consumo de oxigénio dissolvido (OD) no meio aquático devido à oxidação da amónia a nitrito e nitrato;
- Problemas graves de saúde pública pela presença de nitrato e/ou nitrito nas águas. O perigo deve-se à transformação dos nitratos em nitritos pelo organismo humano, que está na origem de compostos cancerígenos. Os nitratos podem causar um distúrbio no sangue, designado por metemoglobinemia, vulgarmente conhecido como a doença do bebé azul

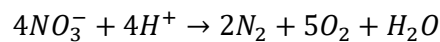
que afeta sobretudo crianças. O que acontece é que os nitratos preferem ligar-se à hemoglobina, impedindo a ligação desta ao O₂ resultando em asfixia [17].

A etapa de remoção do azoto amoniacal (N-NH₄) das AR consiste num processo de depuração biológica, realizada sequencialmente pela amonificação, nitrificação e desnitrificação:

1. **Processo Amonificação** - conversão do azoto orgânico a amónia pela atividade microbiana e hidrólise;
2. **Processo Nitrificação** - conversão aeróbia da amónia a nitrato pela oxidação biológica da amónia:



3. **Processo Desnitrificação** - conversão do nitrato a azoto molecular pela redução biológica do nitrato, através do consumo de carbono orgânico, sob condições anóxicas:



Os processos 2 e 3 expostos precisam de duas espécies de bactérias autotróficas aeróbias específicas, as Nitrosomonas e as Nitrobacter, respetivamente. As bactérias mencionadas são muito sensíveis à temperatura, pH, quantidade de oxigénio dissolvido que tem de ser suficiente para que ocorra a oxidação da amónia e à presença de algumas substâncias. O pH para que estas reações ocorram tem de estar entre 7,5 e 8,0, caso o pH esteja entre os 5,8 ou 6,0 o processo de nitrificação baixa 10 a 20% quando comparado com um pH de 7. As razões que explicam este fenómeno da influência do pH ainda não estão claramente entendidas. Relativamente às substâncias tóxicas para estas bactérias, que poderão inibir as reações apresentadas destacam-se: solventes orgânicos, benzeno, aminas, compostos fenólicos, álcoois, éteres e metais [19].

A determinação do teor de azoto total em águas residuais pode ser efetuada recorrendo à metodologia de determinação do azoto Kjeldahl (NTK) e nitratos (NO₃) sendo a soma desta duas formas aproximadamente igual ao azoto total, assumindo que a concentração de nitritos é desprezável. Para o NTK a amostra é inicialmente submetida a uma digestão ácida, seguida das etapas de destilação e titulação. Os nitratos podem ser determinados por diferentes metodologias, designadamente por espetrofotometria de absorção molecular.

O azoto total resulta da soma do azoto Kjeldahl, dos nitratos e dos nitritos, tal como indicado pela equação 5.3 ou mais detalhadamente pela figura 5.13.

$$\text{Azoto Total} = \text{Azoto Kjeldahl} + \text{Nitratos} + \text{Nitritos}$$

Equação 5.3 – Determinação de azoto total

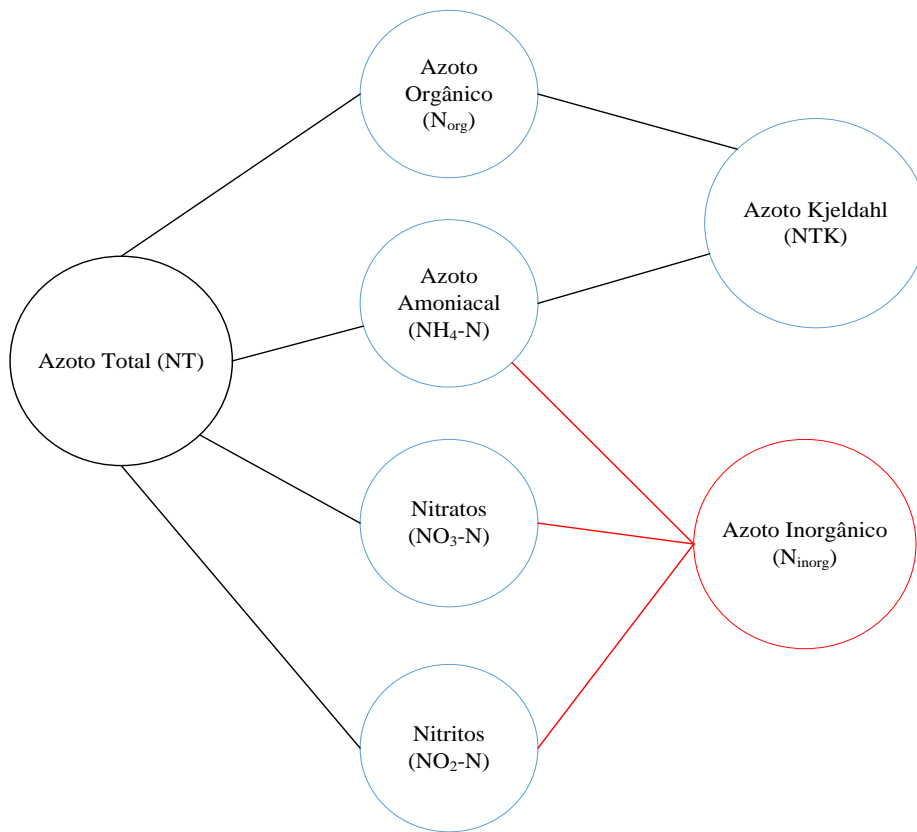


Figura 5.13 – Esquema da determinação do azoto total (NT) [79]

5.6 Determinação Azoto Total – Micro Método

Visto que, os métodos analíticos implementados fazem da determinação de azoto um método moroso e com elevada taxa de ocupação dos técnicos, também é objetivo do laboratório a implementação de um micro método para determinação de azoto total. Desta forma, abordou-se de uma forma breve o micro método de azoto total.

Este micro método é aplicado na análise de águas residuais e naturais e está baseado na norma ISO 11905-1:1997. Segundo a norma enunciada, este método tem capacidade para oxidar amónia, nitritos e azoto orgânico existente nas amostras de águas residuais a nitratos, usando para tal o peroxidissulfato como agente oxidante num sistema alcalino [80].

Sendo este um método espectrofométrico as medições para determinação do azoto total são realizadas a um comprimento de onda de 345 nm.

As gamas da Hach Lange® escolhidas pelo laboratório estão indicadas na figura 5.14.

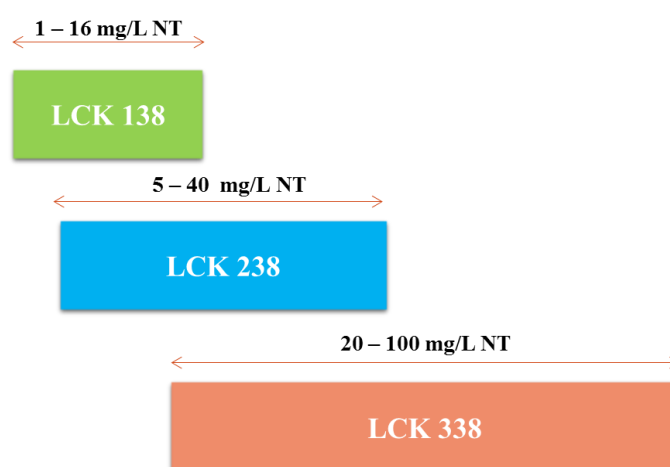


Figura 5.14 - Gamas de Trabalho dos kits da Hach Lange®, para o parâmetro NT



Figura 5.15 – Embalagens das gamas em análise da Hach Lange® para a determinação de NT

5.6.1 Interferências e Limitações

Relativamente aos interferentes do método conforme indicado pela Hach Lange®, os kits de determinação do azoto conseguem fornecer uma análise de amostras fiável mesmo com cloretos até concentrações que não ultrapassem as estipuladas na tabela 5.1 [81].

Tabela 5.1 – Concentração máxima admissível de interferentes – cloretos, para cada gama de NT [81]

LCK	Gama de Trabalho Comercial	Concentração Máxima Admissível de Iões Cloreto (mg/L Cl⁻)	CQO (mg/L O₂)
138	[1-16] mg/L NT	800	400
238	[5-40] mg/L NT	2000	1000
338	[20-100] mg/L NT	5000	2500

Para além dos cloretos, tal como indica a norma 11905-1:1997, também podem ocasionar interferências a matéria orgânica dissolvida ou sólidos suspensos presentes nas amostras, uma vez que diminuem a capacidade de oxidação do peroxidissulfato e causam turbidez.

Por outro lado, nem todos os compostos orgânicos são convertidos em nitratos pela oxidação, sobretudo a norma refere que compostos com ligações duplas ou triplas entre átomos de azoto ou com o grupo -C=NH (grupo amina) são os mais difíceis de oxidar e portanto podem ter taxas de recuperação baixas [80].

5.6.2 Procedimento Experimental

Na figura 5.16 e 5.17 apresenta-se o procedimento experimental usado, para a gama [1-16] mg/L NT, ou seja LCK 138. Os procedimentos das restantes gamas diferem na quantidade de amostra e de hidróxido de sódio que vai a digerir. Podem ver-se procedimentos das restantes gamas, da Hach Lange® no Anexo B.

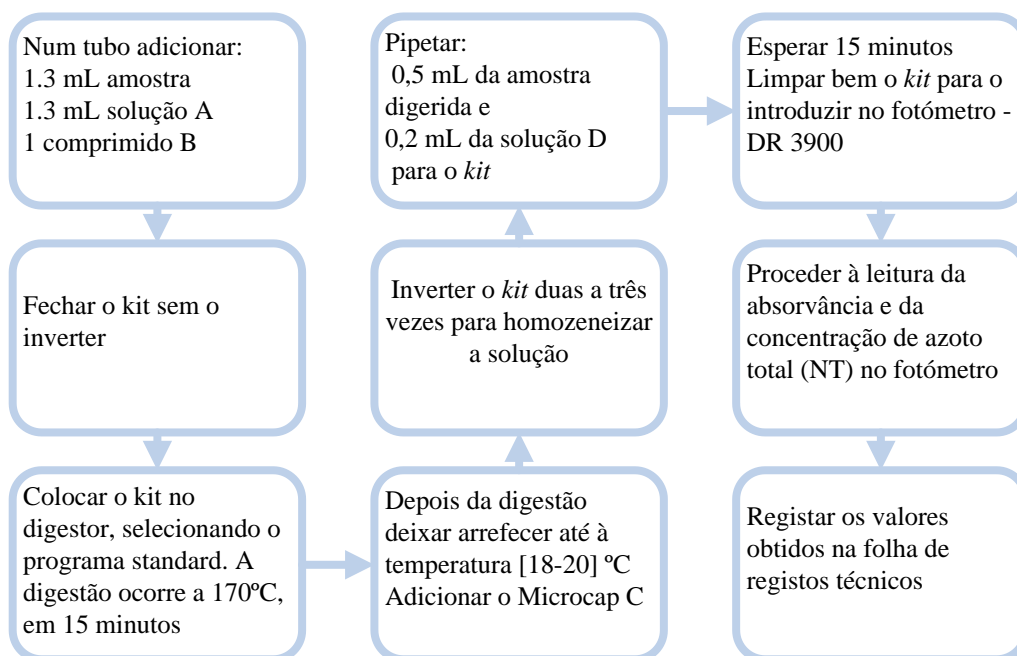


Figura 5.16 - Fluxograma do procedimento experimental do micro método para o parâmetro NT – LCK 138

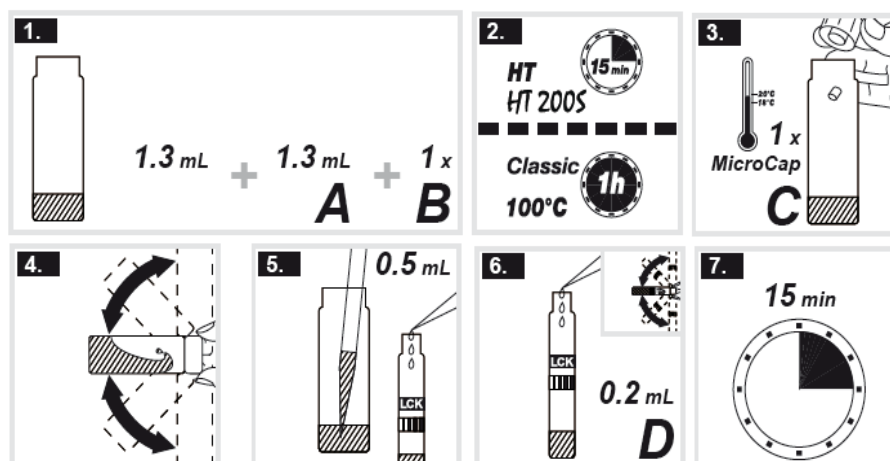


Figura 5.17 – Procedimento para o LCK 138 – micro método - Azoto Total

Nota:

Solução A: Hidróxido de sódio

Solução B: Peroxidissulfato de potássio e metaborato de sódio

Solução C: *Microcap C* (microcápsula de sulfato de sódio e azida de sódio)

Solução D: 2,6-dimetilfenol em mistura ácida (ácido sulfúrico e ácido fosfórico)



Figura 5.18 – Frascos de vidro onde é realizada a digestão - Micro método NT

A digestão das amostras, padrões e brancos no micro método do azoto total ocorre em frascos de vidro de 20 mm de diâmetro, iguais aos representados na figura 5.18.

5.7 Vantagens dos Micro Métodos

A ideia inicial do fabrico destes micro métodos era obter-se uma análise rápida do processo, sendo esta realizada *in situ* por operadores. Posteriormente houve a sua adoção para análise laboratorial dados os seus benefícios, uma vez que se provou fornecerem resultados fiáveis e reprodutíveis.

O facto de o laboratório precisar de analisar um grande número de amostras, reduzir tempos de resposta face aos métodos implementados de CQO e o facto de não existir um método clássico implementado no laboratório que avalie diretamente o azoto total de uma água residual levou-o a apostar nos micro métodos de CQO e de NT. Sendo que o laboratório optou por iniciar os estudos de validação com o parâmetro CQO.

As vantagens decorrentes da implementação dos micro métodos são:

- ✓ A diminuição da utilização da quantidade de material de vidro em relação aos métodos clássicos, consequentemente levando a uma diminuição do espaço físico necessário.
- ✓ A existência no mercado de várias gamas para análise destes parâmetros o que facilita, a escolha das gamas que melhor se adaptam ao trabalho de rotina do laboratório, facilitando desta forma o trabalho dos técnicos em bancada comparativamente aos métodos clássicos, permitindo-lhes em muitos casos evitar diluições.
- ✓ A redução dos riscos de segurança para os técnicos de laboratório, uma vez que a exposição a químicos com fatores de toxicidade elevada é substancialmente reduzida pela utilização de misturas previamente doseadas (*kits*) pelo fabricante o que não obriga ao manuseamento de reagentes nocivos (como o dicromato de potássio ou o sulfato de mercúrio no caso do CQO).
- ✓ Redução de eventuais contaminações dos reagentes preparados, tornando o trabalho operacional com uma precisão maior [74].
- ✓ Diminuição da produção de resíduos tóxicos, nomeadamente de resíduos de mercúrio, crómio hexavalente e ácido sulfúrico.
- ✓ Para além disso, os *kits* apresentam-se como uma solução ambientalmente menos agressiva, visto conseguirem uma redução até 90% em geral dos produtos químicos utilizados comparativamente ao método clássico [82]. Um exemplo é a diminuição de cinco vezes do consumo de mercúrio nos *kits* de CQO em comparação com o método clássico [83].
- ✓ Redução da libertação de gases tóxicos, tais como HCN (ácido cianídrico) e H₂S (ácido sulfídrico) no caso do CQO [74].
- ✓ Por outro lado, os compostos orgânicos voláteis reagem de forma proporcional ao contacto com o oxidante, se o método é realizado em refluxo fechado promove-se esse contacto, e deixam de haver perdas desses compostos voláteis.
- ✓ Visto estes métodos serem mais céleres que os clássicos permitem uma amplificação do trabalho em bancada, isto é, um aumento da capacidade de analisar mais amostras.

Desde há muito tempo que são sobejamente conhecidos os impactos negativos na saúde causados pelos testes de CQO através do método clássico, uma vez que utiliza substâncias perigosas em quantidades consideráveis como por exemplo o dicromato de potássio. Este oxidante usado há mais de 70 anos para oxidar a matéria orgânica, dada a relação entre as suas características intrínsecas por exemplo a sua estabilidade à temperatura ambiente e o seu poder enquanto oxidante [73].

Apesar do micro método do CQO também ser baseado no método de dicromato de potássio, como utiliza menos quantidade é benéfico uma vez que este é considerado uma "substância que suscita grande preocupação", por ser cancerígena e mutagénica. E por outro lado, o facto do dicromato estar incluído na Lista de Substâncias Candidatas a Autorização para utilização, desde 2008, para eventual inclusão nessa lista (anexo XIV do Regulamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals*)), dadas as características apresentadas está previsto o fim da sua comercialização a partir de Setembro de 2017.

Também a ECHA (Agência Europeia de Produtos Químicos) requereu à Comissão Europeia uma recomendação para que 13 substâncias, entre elas o dicromato de potássio que não sejam usadas sem autorização.



Figura 5.19 – Comparação entre método clássico e *kits* - redução até 90% dos reagentes necessários [74,83]

Tabela 5.2 – Comparação dos tempos de digestão no macro e micro método de CQO

Parâmetro: CQO	Temperatura Digestão (°C)	Tempo Digestão (min)
Método Clássico	140±3	120
Micro Método	170±1°C	15

Posteriormente à análise dos *kits*, estes podem ser reciclados diminuindo desta forma o impacto ambiental, tornando-os assim numa opção irrecusável do ponto de vista da segurança ambiental. A empresa Hach Lange® dispõe desde 1978, de um serviço de eliminação dos *kits* onde deixou somente de recolher os reagentes para os começar a reciclar. Cerca de 70% do material recebido no seu centro de ambiente em Düsseldorf é reciclado.

Depois da reciclagem, os materiais dos *kits* podem ser reutilizados para múltiplos fins, nomeadamente para o fabrico de lã de vidro para a indústria de materiais de construção, recipientes de plástico e cerdas para vassouras [84].

5.8 Amostragem e Preservação das Amostras

Apesar da etapa de amostragem e preservação de amostras estar fora do âmbito do presente trabalho, convém assinalar o importante papel do controlo de qualidade da recolha de amostras e da manipulação das mesmas. Uma vez que esta etapa constitui o primeiro passo antes da análise laboratorial, logo é uma etapa determinante do procedimento analítico. As amostras são recolhidas em recipientes de vidro ou em frascos de polietileno.

Depois de recebidas no laboratório devem ser analisadas com a maior brevidade possível, visto que os resultados são mais confiáveis quando obtidos a partir de amostras frescas. Se não for possível uma análise imediata ter-se-á de conservar as amostras. Para tal devem ser acidificadas, com ácido sulfúrico concentrado, 97-99%, massa/volume, garantindo-se um pH inferior a 2, tal como indica a tabela 5.3 baseada no documento interno designado IMP 5.8.02 [85].

Tabela 5.3 – Modo de conservação de amostras - métodos clássicos [85]

Método	Modo Conservação Amostras	Período Mínimo Conservação de Amostras (dias)	Período Máximo Conservação de Amostras (dias)
Carência Química de Oxigénio	Acidificação com H ₂ SO ₄ (pH<2) e Refrigeração	1	7
Azoto Kjeldahl	Acidificação com H ₂ SO ₄ (pH<2) e Refrigeração	1	28
Nitratos	Acidificação com H ₂ SO ₄ (pH<2) e Refrigeração	1	7

6 Materiais e Métodos

Nas tabelas 6.1, 6.2 e 6.3 são apresentados os materiais de laboratório, os reagentes e os equipamentos usados nos ensaios laboratoriais.

6.1.1 Material de laboratório

Tabela 6.1 – Material de vidro usado nos ensaios laboratoriais

Material de Vidro	Capacidade (mL)	Incerteza (mL)	Temperatura Referência de Calibração (°C)
Balões Volumétricos	50	± 0,06	20
	100	± 0,1	
	200	± 0,15	
	500	± 0,25	
	1000	± 0,4	
Bureta	25	± 0,03	20
Gobelés	100	-	20

Tabela 6.2 – Equipamento diverso usado nos ensaios laboratoriais

Equipamento	Marca/Modelo	Capacidade	Calibração
Balança Analítica	SARTORIUS/BP 221 S	220 ±0,0001 g	Anual
Estufa	MEMMERT/ UM 600	104±1°C	Anual
Micropipetas	Brand Transferpette® S	100 ≤ V ≤ 1000 µL	Anual
	Brand Transferpette® S	500 ≤ V ≤ 5000 µL	
Dispensete	Brand®	-	-

Tabela 6.3 - Identificação dos Reagentes para análise de CQO e NT

Método	Reagente	Marca	Lote	Fórmula Química	Massa Molecular (g/mol)
CQO	Hidrogenoftalato de Potássio	Merck® kGaA	A0472874 333	C ₈ H ₅ KO ₄	204,22
NT	Nitrato de Potássio	VWR®	14D170026	KNO ₃	101,10
	Ureia	VWR®	28877-260	CH ₄ N ₂ O	60,06

6.2 Equipamento

Os testes de CQO e NT são realizados em *kits* tal como referido anteriormente. Para proceder à sua análise é necessário equipamento específico adquirido do fornecedor Hach Lange®.

6.2.1 Digestor HT 200 S

Para a análise das águas residuais, segundo os métodos anteriormente descritos é necessário um digestor para proceder à digestão das amostras. Para esse fim usou-se o modelo HT 200 S, da Hach Lange® representado na figura 6.1, dado estar associado a uma tecnologia HSD (*High Speed Digestion*) permite que a digestão das amostras seja rápida. Este termostato tem 12 compartimentos de 13 mm e temperaturas programáveis até $170 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 6.1 – Digestor HT 200 S - HACH LANGE®

6.2.2 Espectrofotómetro DR 3900

Após a digestão e depois de algum tempo de arrefecimento os *kits* são colocados no espectrofotómetro, tal como representado na figura 6.2, para ser determinada a absorvância e/ou a concentração da amostra/padrão em estudo. O modelo usado foi o DR 3900, que tem capacidade para medir na zona do ultravioleta e visível, absorvâncias com comprimento de onda compreendido no intervalo $\lambda = [320; 1100]$ nm, com uma precisão de 1,5 nm [68, 86].

O espectrofotómetro está pré-programado com vários métodos analíticos para análise de águas residuais e águas de consumo entre eles destacam-se o CQO e NT.



Figura 6.2 – Espectrofotômetro DR 3900 - HACH LANGE®

Os *kits* têm implementado um código de barras (IBR) que é reconhecido pelo *software* integrado no espectrofotômetro, assim este identifica automaticamente o tipo de teste a que determinado *kit* pertence, o comprimento de onda, assegurando eventuais falhas dos técnicos em bancada. Por outro lado, este sistema permite ter acesso ao lote e ao seu prazo de expiração, sendo este nunca inferior a 1 ano. Os *kits* vêm etiquetados individualmente com uma cor específica da gama de trabalho, *ver* figura 6.3 a que pertencem de forma a facilitar a sua identificação.



Figura 6.3- Identificação HACH LANGE® das diferentes gamas de trabalho, por cor [87]

O DR 3900 tem um *software* que fornece dois modos de leitura, tal como explicitado na figura 6.5. O fotômetro procede à leitura do *kit* pelo sistema IBR (sistema código de barras) fornecendo posteriormente o resultado médio ao efetuar 10 medições rotativas, de acordo com a figura 6.4, excluindo valores aberrantes, provenientes por exemplo da sujidade do *kit*. Este equipamento tem ainda a capacidade de gerar uma curva de calibração, aquando da leitura das soluções padrão, nesses casos o equipamento mediante a introdução das concentrações teóricas fornece apenas a absorvância correspondente [83].

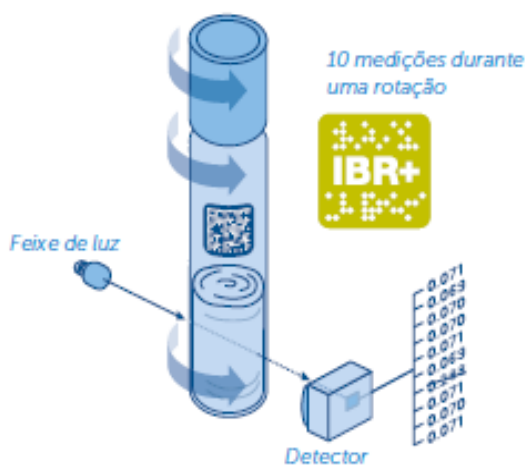


Figura 6.4 - Rotação do *kit* dentro do fotômetro DR 3900, para obtenção de uma medição média [83]

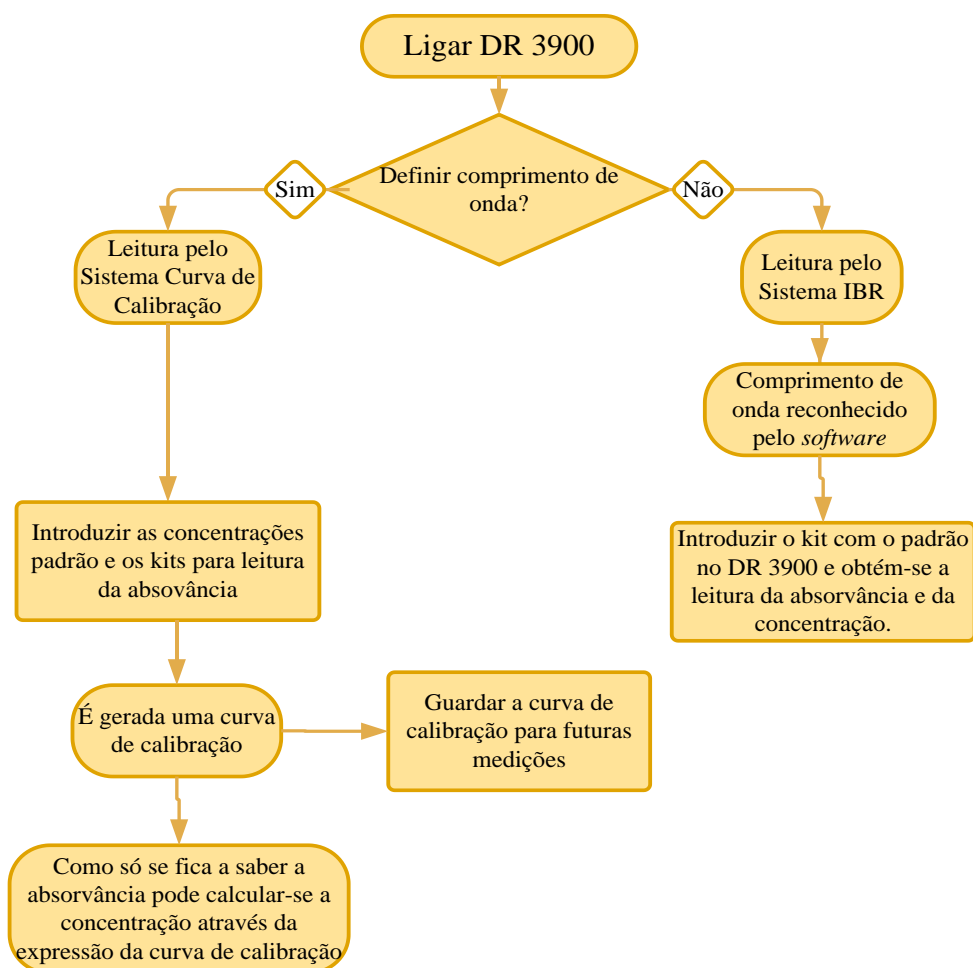


Figura 6.5 – Sistemas de leitura do espectrofotómetro DR 3900

Ambos os equipamentos supracitados, HT 200 S e DR 3900, são pré-calibrados e anualmente reajustados pelo fabricante, de forma a garantir o bom desempenho dos mesmos.

6.3 Preparação das Soluções Padrão

Neste estudo começou por se preparar soluções de concentração conhecida para a análise de CQO e NT para as gamas de trabalho em estudo. Os padrões da curva de calibração são preparados com o maior rigor analítico possível para que a fonte de erro associada seja minimizada ao máximo. Os padrões preparados pelo técnico devem obedecer a determinadas condições:

- Possuir elevada pureza;
- Possuir homogeneidade na sua composição;
- Ser representativo (propriedades físico-químicas semelhantes aos analitos a utilizar);
- Apresentar elevada estabilidade;
- Boas condições de armazenamento;
- Baixo custo.

6.4 Carência Química de Oxigénio

Preparação Solução Padrão de Hidrogenoftalato de Potássio:

Concentração 10 000 mg/L O₂

No caso do CQO é recomendado pela norma ISO 15705:2002 o uso do padrão hidrogenoftalato de potássio, C₈H₅KO₄.

Inicialmente preparou-se a solução mãe com uma concentração de 10 000 mg/L O₂, tal como descrito na norma, contudo por ser uma solução demasiado concentrada optou-se por preparar soluções com concentrações inferiores para se fazerem as curvas de calibração para as diferentes gamas de CQO [75]. Todas as soluções descritas devem ser preparadas mensalmente e têm de ser armazenadas no frigorífico entre um intervalo de temperatura de 2°C a 8°C. Dissolver 4,251 ± 0,002 g de hidrogenoftalato de potássio C₈H₅KO₄ previamente seco na estufa a cerca de 105 ± 5°C, durante 2 horas ± 10 minutos. Depois diluir num balão volumétrico de 500 mL a quantidade pesada.

Concentração 5 000 mg/L O₂

Dissolver 2,126 ± 0,002 g de hidrogenoftalato de potássio C₈H₅KO₄ previamente seco na estufa a cerca de 105 ± 5°C, durante 2 horas ± 10 minutos. Depois diluir num balão volumétrico de 500 mL a quantidade pesada.

Concentração 1 000 mg/L O₂

Dissolver 0,425 ± 0,002 g de hidrogenoftalato de potássio, C₈H₅KO₄ previamente seco na estufa a cerca de 105 ± 5°C, durante 2 horas ± 10 minutos. Depois diluir num balão volumétrico de 500 mL a quantidade pesada.

Concentração 500 mg /L O₂

Dissolver 0,213 ± 0,002 g de hidrogenoftalato de potássio, C₈H₅KO₄ previamente seco na estufa a cerca de 105 ± 5°C, durante 2 horas ± 10 minutos. Depois diluir num balão volumétrico de 500 mL a quantidade pesada.

6.5 Azoto Total

No estudo da avaliação do azoto total pelo micro método começou por se usar o padrão de nitrato de potássio, padrão também utilizado pelo fornecedor Hach Lange® para obter as curvas de calibração implementadas no fotómetro DR 3900.

Preparação Solução Padrão de Nitrato de Potássio:

Concentração 1 000 mg/L NT

Secar numa cápsula durante 2 horas a uma temperatura de $105^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ uma porção de nitrato de potássio, KNO_3 .

Dissolver $7,218 \pm 0,001$ g do nitrato de potássio, previamente seco num balão de 1000 mL e aferir com água desmineralizada, no fim homogeneizar a solução preparada. Esta solução é estável durante 2 meses.

Concentração 500 mg/L NT

1. Retirar 500 mL da solução de nitrato de potássio (KNO_3) de concentração 1 000 mg/L, para um balão de 1000 mL.
 2. Perfazer o volume com água até ao traço e homogeneizar.
 3. Por fim, guardar a solução num frigorífico num intervalo de temperatura entre 2°C a 8°C .
- Este procedimento de preparação da solução padrão deve ser realizado com periodicidade mensal.

Concentração 100 mg/L NT

1. Retirar 50 mL da solução de nitrato de potássio (KNO_3) de concentração 1 000 mg/L, com uma pipeta calibrada, para um balão aferido de 500 mL.
 2. Perfazer o volume com água até ao traço e homogeneizar.
 3. Por fim, guardar a solução num frigorífico num intervalo de temperatura entre 2°C a 8°C .
- Este procedimento de preparação da solução padrão deve ser realizado com periodicidade mensal.

7 Resultados Experimentais e Discussão

Neste capítulo da dissertação apresentam-se os resultados experimentais referentes à validação dos métodos de ensaio para as águas residuais, dos parâmetros de CQO e NT.

7.1 Carência Química de Oxigénio

7.1.1 Curvas de Calibração - Linearidade

Iniciou-se o processo da validação com a realização de curvas de calibração. Para tal procedeu-se à execução de curvas de calibração com 10 pontos. Escolheram-se valores de concentrações que fossem distribuídas equitativamente pelas gamas de trabalho dos *kits*. De seguida, traçaram-se as curvas de calibração, que demonstram a relação existente entre o sinal (absorvância) do equipamento e a concentração das soluções preparadas.

É importante salientar que foram realizadas várias curvas de calibração (próprias), ou seja, em que era definido o comprimento de onda, acabando por não utilizar as que estão definidas no espectrofotómetro e assim não se realizar as curvas nas condições de avaliação das amostras. Apesar de se ter obtido boas linearidades, optou-se por colocar neste trabalho somente as curvas que foram lidas exatamente pelo mesmo processo da leitura em rotina de amostras, isto é, usando a curva do fotómetro. Para tal, foram repetidos e excluídos os ensaios anteriores.

Assim, após estudos exaustivos tomou-se esta opção de escolher de entre as curvas realizadas nos ensaios de validação do método as mais representativas, isto é, as curvas com o maior número de pontos.

LCK 1414 – Gama Baixa CQO [5-60] mg/L O₂

1ª Curva Calibração:

Apresentam-se na tabela 7.1 os resultados obtidos para o estudo da curva de calibração.

Tabela 7.1 – Dados Primários – 1ª curva calibração – LCK 1414 – Gama Baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida ($\lambda=348$ nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
5	4,03	1,633	-19%
10	10,5	1,492	5%
15	14,3	1,408	-5%
20	19,6	1,293	-2%
30	30,5	1,054	2%
40	38,6	0,878	-4%
45	43,1	0,779	-4%
50	47,7	0,680	-5%
55	53,9	0,544	-2%
60	57,5	0,465	-4%

Em química analítica é frequente haver um sinal, no caso em estudo, esse sinal é a absorvância, que é proporcional à concentração de analito. Essa representação dos dados relativos à absorvância e concentração teórica da tabela 7.1 está representado na figura 7.1.

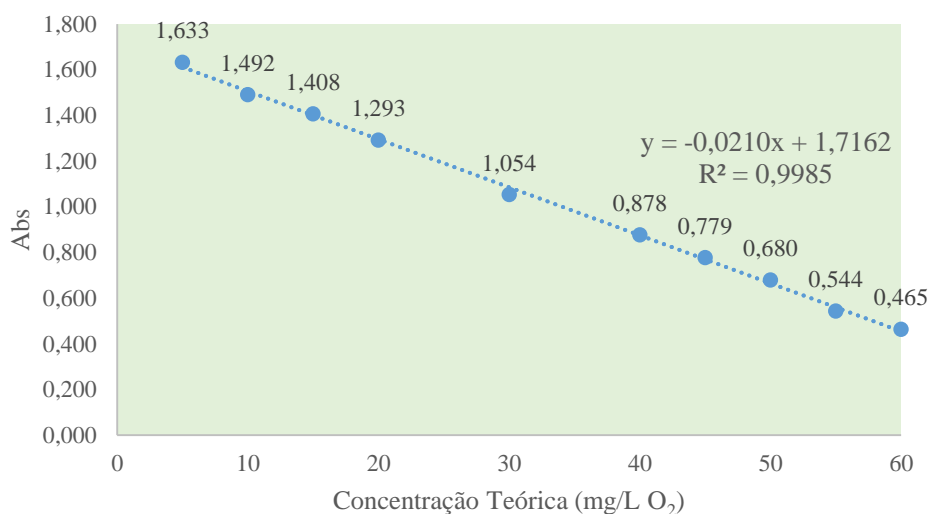


Figura 7.1- Absorvância vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 1414

Como é possível verificar pela figura 7.1 a curva de calibração encontra-se invertida em relação aos casos habituais. Uma vez que, nesta gama baixa referente ao LCK 1414, a quantidade de dicromato necessária para oxidar a matéria orgânica é medida espectrofotometricamente a 348 nm. Ou seja, a absorção é efetuada através da quantificação/absorção dos componentes que não reagiram, isto é faz-se a quantificação do ião crómio no estado hexavalente, Cr^{6+} .

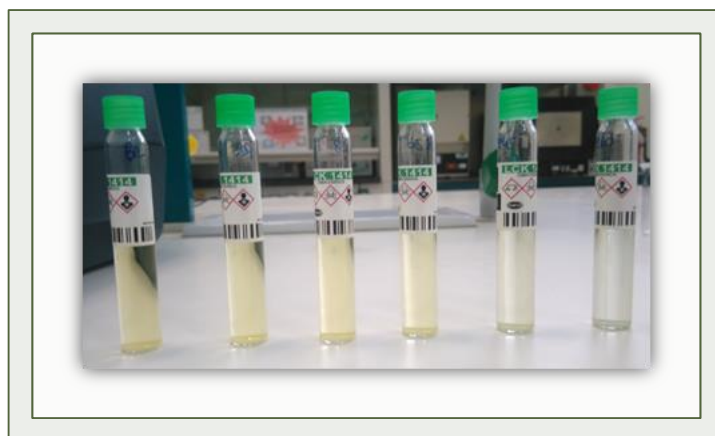


Figura 7.2 – Variação Cor ao longo da gama LCK 1414 [5-60] mg/L O₂

Posto este facto, tornou-se importante fazer a representação como apresentada na figura 7.3, da concentração lida em função da concentração teórica, com o intuito de se obter um declive positivo.

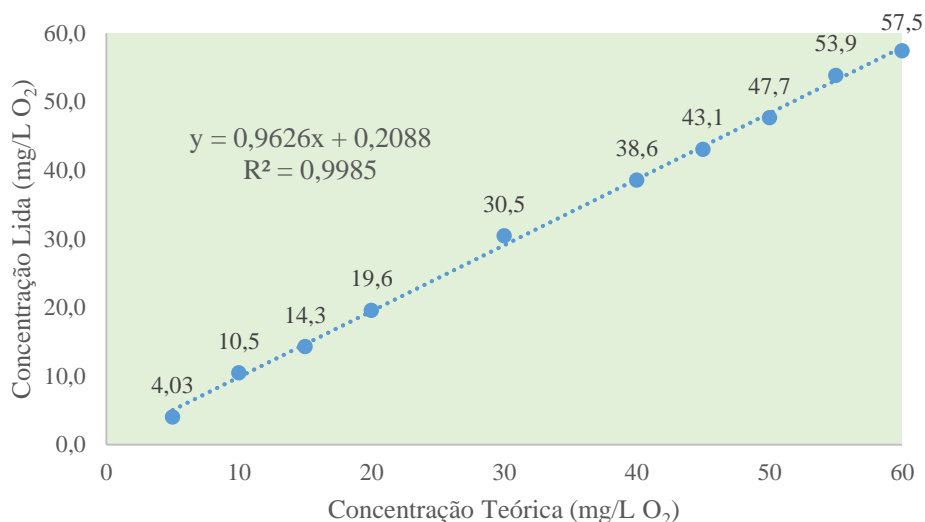


Figura 7.3 – Concentração Lida vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 1414

2ª Curva Calibração:

Na tabela 7.2 apresentam-se os dados primários de uma segunda curva realizada para a gama baixa do CQO.

Tabela 7.2 – Dados Primários – 2ª curva calibração – LCK 1414 – Gama Baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=348 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
5	3,19	1,651	-36%
10	8,75	1,530	-13%
15	15,4	1,385	3%
20	19,7	1,291	-2%
30	28,9	1,089	-4%
40	38,5	0,879	-4%
45	42,7	0,788	-5%
50	47,4	0,686	-5%
55	52,0	0,584	-5%
60	57,4	0,467	-4%

De seguida, na figura 7.4 apresenta-se a curva de calibração relativa aos dados da tabela 7.2.

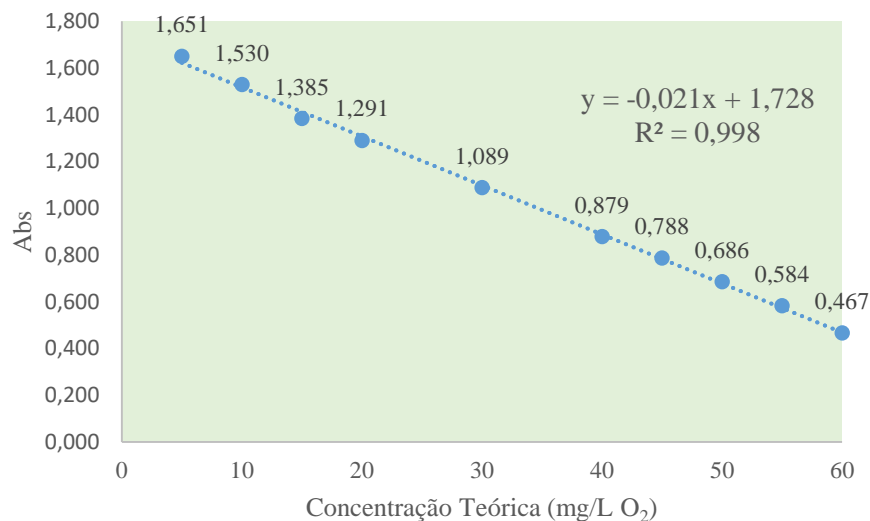


Figura 7.4 - Absorvância vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 1414

Na figura 7.5, representa-se a concentração lida em função da concentração teórica, com esta representação pretendeu-se obter um gráfico com declive positivo.

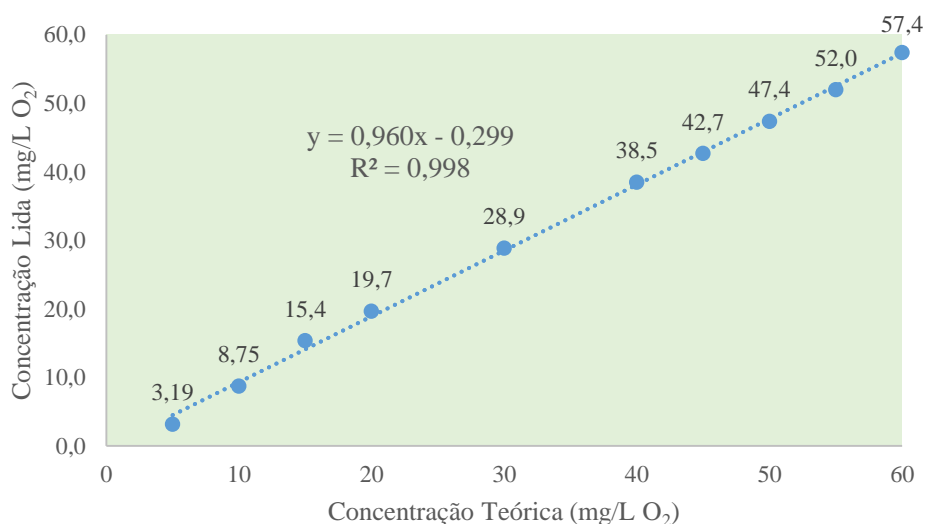


Figura 7.5 –Concentração Lida vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 1414

Pelo facto do ponto da curva de concentração 5 mg/L O₂ ter tido uma percentagem de erro relativo de 36% foi analisar-se estatisticamente através de um teste F se este era um *outlier* ou não.

Tabela 7.3 - Resultado da avaliação do ponto 5 mg/L O₂ (ponto suspeito)

Resultados com Ponto Suspeito		Resultados sem Ponto Suspeito	
Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Abs Lida ($\lambda=348$ nm)	Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Abs Lida ($\lambda=348$ nm)
5	1,651		
10	1,530	10	1,530
15	1,385	15	1,385
20	1,291	20	1,291
30	1,089	30	1,089
40	0,879	40	0,879
45	0,788	45	0,788
50	0,686	50	0,686
55	0,584	55	0,584
60	0,467	60	0,467
Declive	-0,021	-0,021	
Ordenada	1,728	1,712	
Desvio Padrão Residual, S _y	0,017	0,013	
n	10	9	
F_{calculado} =	6,98		
F(g1=1, g2=N-3, P99%) =	12,25		

Conclusão:

Retirando o ponto com o maior erro relativo (-36%) pode verificar-se por aplicação do teste estatístico F, para uma probabilidade estatística de 99% que apesar de ter um erro relativo superior a 20% no ponto 5 mg/L O₂ este não representa um *outlier* na curva de calibração, uma vez que o $F_{\text{calculado}} \leq F_{\text{tabelado}}$.

3ª Curva Calibração:

Na tabela 7.4 apresentam-se os dados primários da terceira curva de calibração para a gama baixa do CQO.

Tabela 7.4 - Dados Primários – 3ª curva calibração – LCK 1414- Gama Baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=348 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
5	4,11	1,631	-18%
10	8,87	1,527	-11%
15	14,3	1,408	-5%
20	19,1	1,303	-4%
30	26,6	1,140	-11%
40	37,8	0,894	-6%
45	44,0	0,760	-2%
50	48,8	0,655	-2%
55	53,1	0,561	-3%
60	58,6	0,441	-2%

De seguida, na figura 7.6 apresenta-se a curva de calibração relativa aos dados da tabela 7.4.

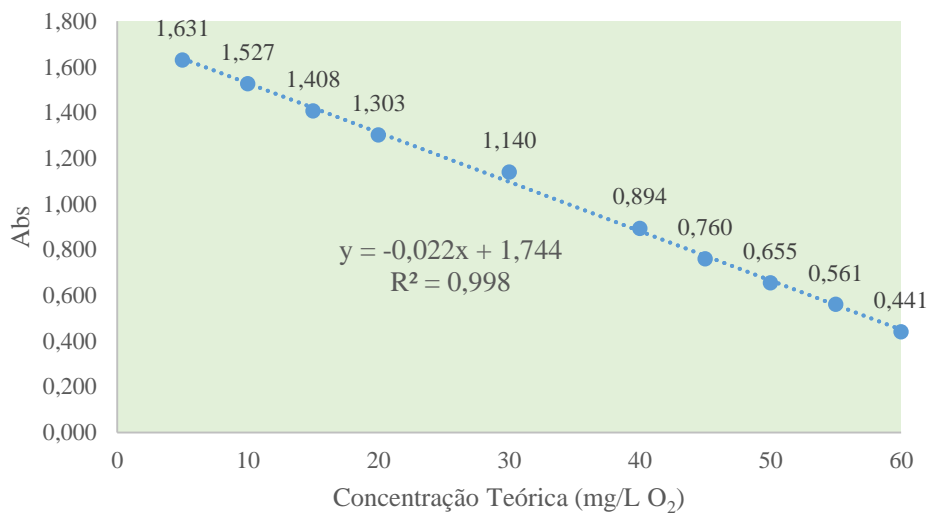


Figura 7.6 - Absorvância vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 1414

Na figura 7.7, representa-se a concentração lida em função da concentração teórica, com esta representação pretendeu-se obter um gráfico com declive positivo.

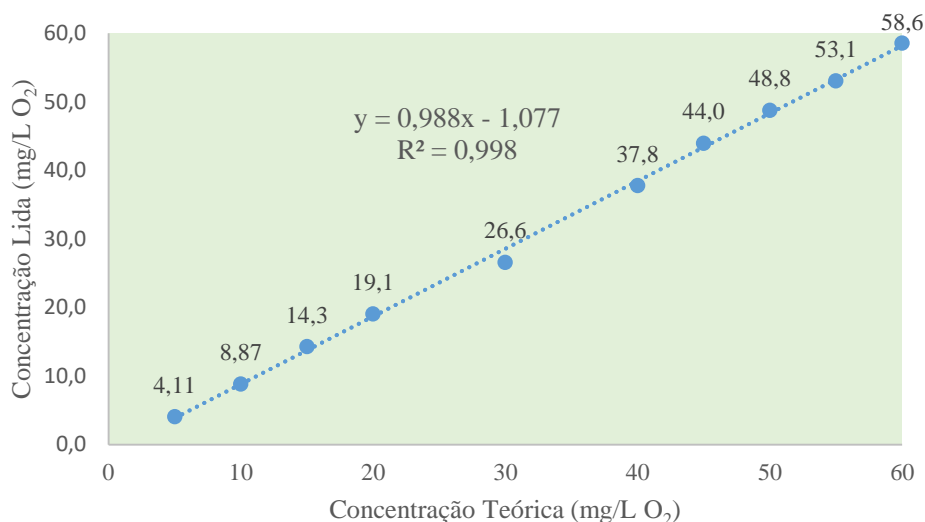


Figura 7.7 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 1414

Através das representações anteriores pode concluir-se que:

- Pelas figuras 7.1, 7.4 e 7.6, existe uma boa linearidade verificada visualmente e também através da obtenção de coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,990, valor correspondente ao critério de aceitação do coeficiente de correlação ($r \geq 0,995$).
- Há uma boa relação entre as concentrações lida e teórica.

Os resultados para cada curva para o teste de linearidade são apresentados na tabela 7.5.

Tabela 7.5 – Resumo Teste Mandel - Curvas de Calibração Abs vs Conc.Teórica LCK 1414

Nº Curva Calibração	Nº Pontos Curva	Teste Mandel - Linearidade									
		r	r ²	a	b	S _{y1}	S _{y2}	DS ²	PG	F _{tabelado}	Conclusão
1	10	-0,999	0,998	1,7162	-0,0210	0,0173	0,0169	0,0004	1,40	12,25	Melhor Ajuste é Linear
2	10	-0,999	0,998	1,7276	-0,0210	0,0172	0,0148	0,0008	3,80	12,25	Melhor Ajuste é Linear
3	10	-0,999	0,998	1,7440	-0,0216	0,0183	0,0176	0,0005	1,67	12,25	Melhor Ajuste é Linear

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

1ª Curva Calibração:

Apresentam-se na tabela 7.6 os resultados obtidos para o estudo da curva de calibração.

Tabela 7.6 - Dados Primários – 1ª curva calibração – LCK 314- Gama Intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=448 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
15	15,9	0,755	6%
30	30,3	0,698	1%
60	65,2	0,559	9%
90	94,3	0,443	5%
120	120	0,342	0%
150	155	0,203	3%

De seguida, na figura 7.8 apresenta-se a curva de calibração relativa aos dados da tabela 7.6.

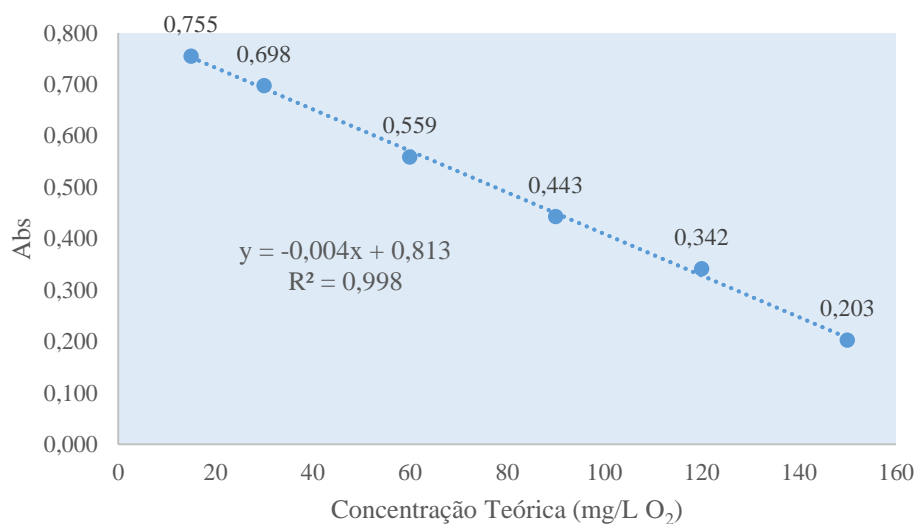


Figura 7.8 - Absorvância vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 314

Pela figura 7.8 verifica-se que a curva de calibração se encontra invertida, tal como na gama baixa, porque também nesta gama intermédia referente ao LCK 314, se faz a quantificação do ião crómio no estado hexavalente.

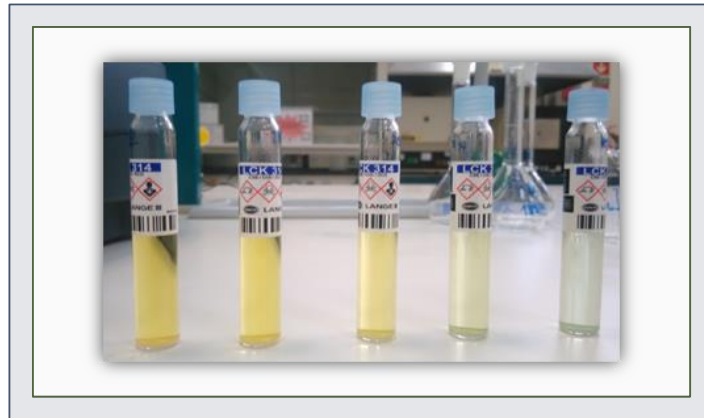


Figura 7.9 - Variação Cor ao longo da gama LCK 314 [15-150] mg/L O₂

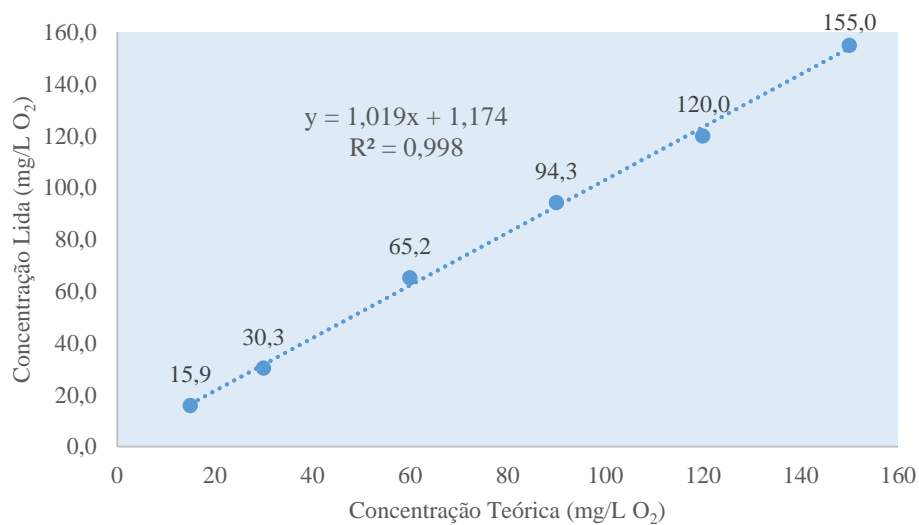


Figura 7.10 – Concentração Lida vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 314

2ª Curva Calibração:

Apresentam-se na tabela 7.7 os resultados obtidos para o estudo da curva de calibração.

Tabela 7.7 - Dados Primários – 2ª curva calibração – LCK 314- Gama Intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=448 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
15	15,7	0,755	5%
30	30,6	0,697	2%
60	58,7	0,585	-2%
90	87,5	0,471	-3%
120	117	0,352	-3%
150	148	0,229	-1%

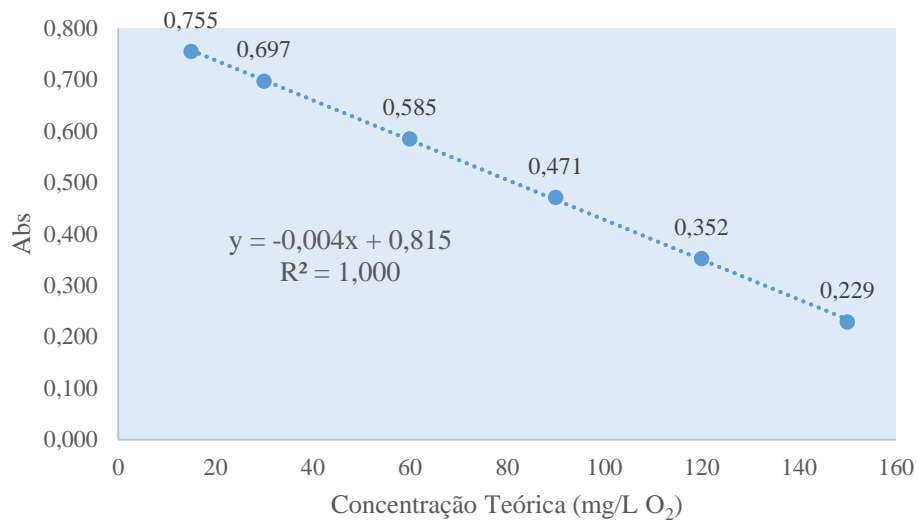


Figura 7.11 - Absorvância vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 314

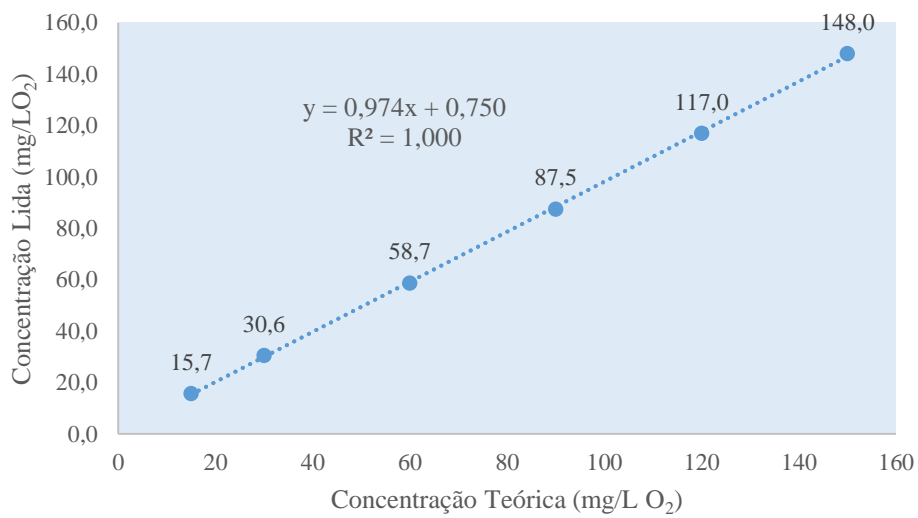


Figura 7.12 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 314

3ª Curva Calibração:

Tabela 7.8 - Dados Primários – 3ª curva calibração – LCK 314 - Gama Intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=448 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
15	11,9	0,771	-21%
30	31,6	0,692	5%
45	47,1	0,631	5%
60	58,1	0,587	-3%
90	90,8	0,457	1%
120	118	0,351	-2%
135	131	0,296	-3%
150	147	0,234	-2%

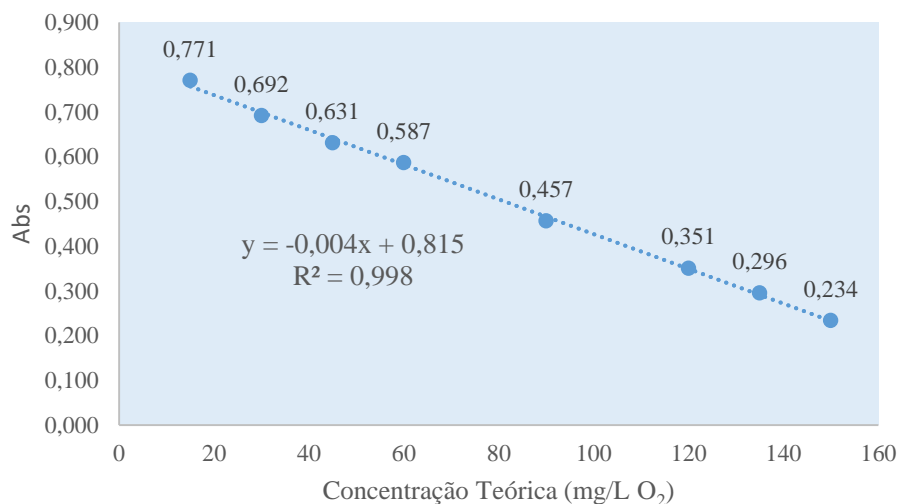


Figura 7.13 - Absorvância vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 314

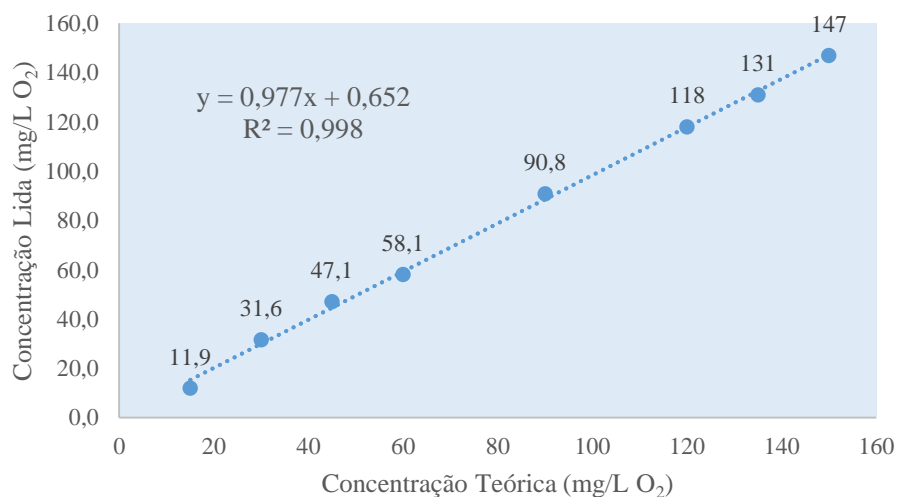


Figura 7.14 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 314

Através das representações anteriores pode concluir-se que:

- Pelas figuras 7.8, 7.11 e 7.13, existe uma boa linearidade verificada visualmente e também através da obtenção de coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,990, valor correspondente ao critério de aceitação do coeficiente de correlação ($r \geq 0,995$).
- Há uma boa relação entre as concentrações lida e teórica.
- Apesar de se ter verificado a linearidade aplicou-se o teste estatístico de Mandel, para confirmar a existência de linearidade para todas as curvas.

Os resultados para cada curva para o teste de linearidade são apresentados na tabela 7.9.

Tabela 7.9 – Resumo Teste Mandel - Curvas de Calibração Abs vs Conc. Teórica LCK 314

Nº Curva Calibração	Nº Pontos Curva	Teste Mandel - Linearidade									
		r	r^2	a	b	S_{y1}	S_{y2}	DS^2	PG	F_{tabelado}	Conclusão
1	6	-0,999	0,998	0,8133	-0,0040	0,0103	0,0116	0,00003	0,19	34,12	Melhor Ajuste é Linear
2	6	-1,000	1,000	0,8154	-0,0039	0,0039	0,0014	0,00006	27,10	34,12	Melhor Ajuste é Linear
3	8	-0,999	0,998	0,8154	-0,0039	0,0088	0,0081	0,00013	1,99	16,26	Melhor Ajuste é Linear

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

1ª Curva Calibração:

Apresentam-se na tabela 7.10 os resultados obtidos para o estudo da curva de calibração.

Tabela 7.10 – Dados Primários da Curva Calibração LCK 1014 – Gama Alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=605 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
100	98,9	0,100	-1%
300	302	0,193	1%
500	496	0,281	-1%
700	721	0,384	3%
900	911	0,470	1%
1100	1078	0,546	-2%
1300	1326	0,659	2%
1500	1518	0,747	1%
1700	1724	0,841	1%
2000	1947	0,943	-3%

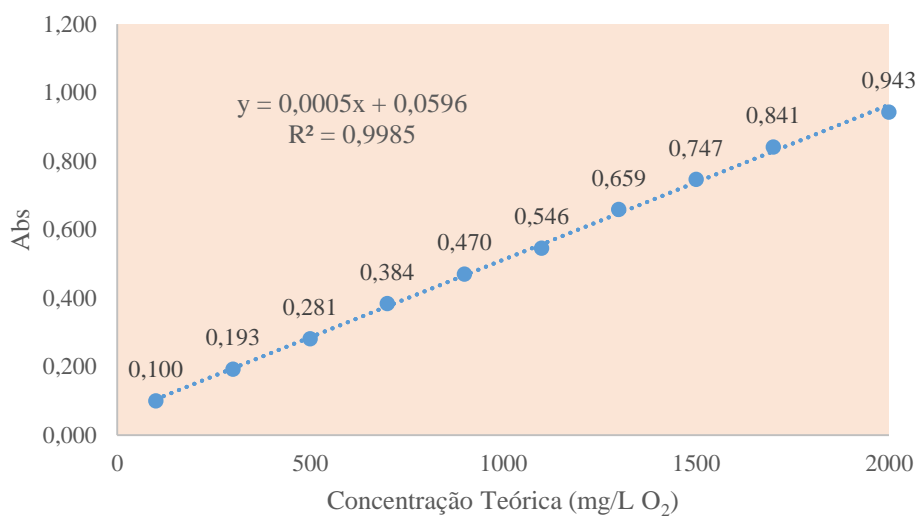


Figura 7.15 – Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 1014

Relativamente à gama alta do CQO, que abrange o intervalo de 100 a 2000 mg/L O₂ obteve-se linearidade, tal como se pode verificar pela figura 7.15. À semelhança do que foi feito para as outras gamas também nesta, se representou a concentração lida vs concentração teórica, na figura 7.16.

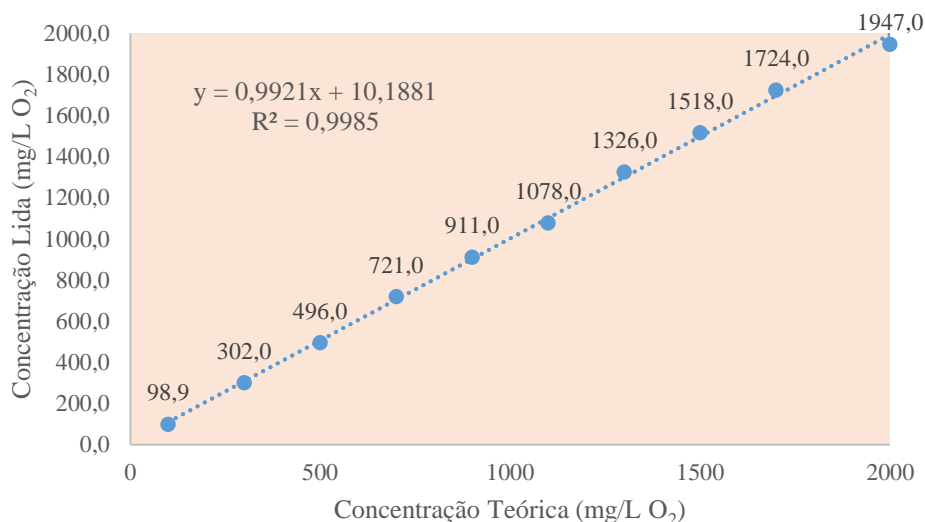


Figura 7.16 – Concentração Lida vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 1014

Nesta gama alta relativa ao LCK 1014, a quantidade de dicromato necessária para oxidar a matéria orgânica é medida espectrofotometricamente a 605 nm. Ou seja, a absorção é efetuada através da quantificação/absorção dos componentes que reagiram, isto é faz-se a quantificação resultante da reação redox da variação do ião crómio do estado hexavalente, Cr^{6+} para o estado trivalente Cr^{3+} . Essa transição de estado é perceptível visualmente pela mudança da tonalidade laranja para verde, tal como se pode confirmar na figura 7.17.

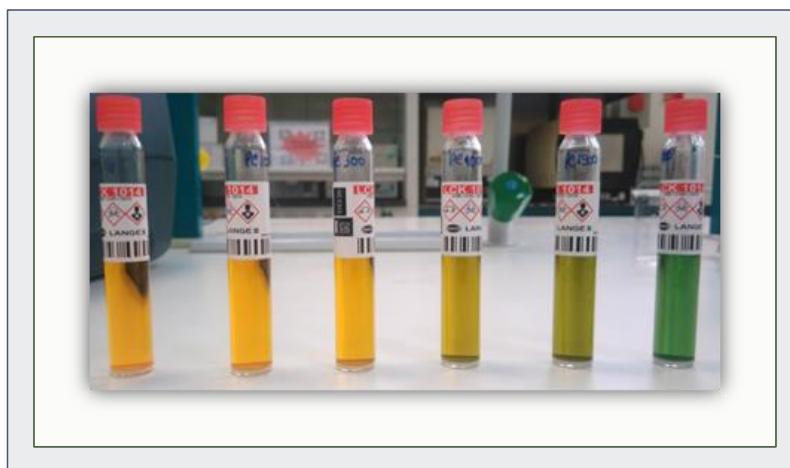


Figura 7.17 – Variação da cor dos kits ao longo da gama de trabalho LCK 1014

2ª Curva Calibração:

Apresentam-se na tabela 7.11 os resultados obtidos para o estudo da curva de calibração.

Tabela 7.11 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 1014 – Gama Alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=605 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
100	107	0,104	7%
300	294	0,189	-2%
500	534	0,298	7%
700	694	0,371	-1%
900	886	0,459	-2%
1300	1251	0,625	-4%
1500	1518	0,747	1%
1700	1698	0,829	0%
2000	2037	0,984	2%

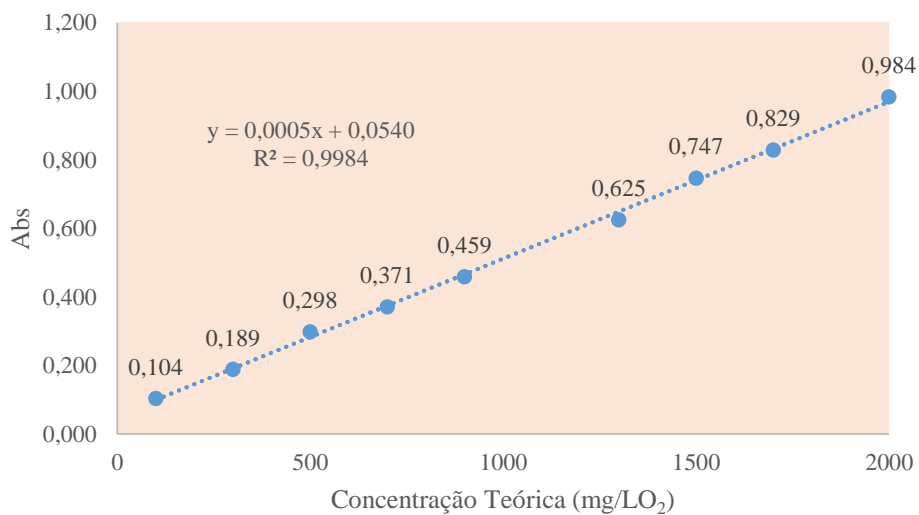


Figura 7.18 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 1014

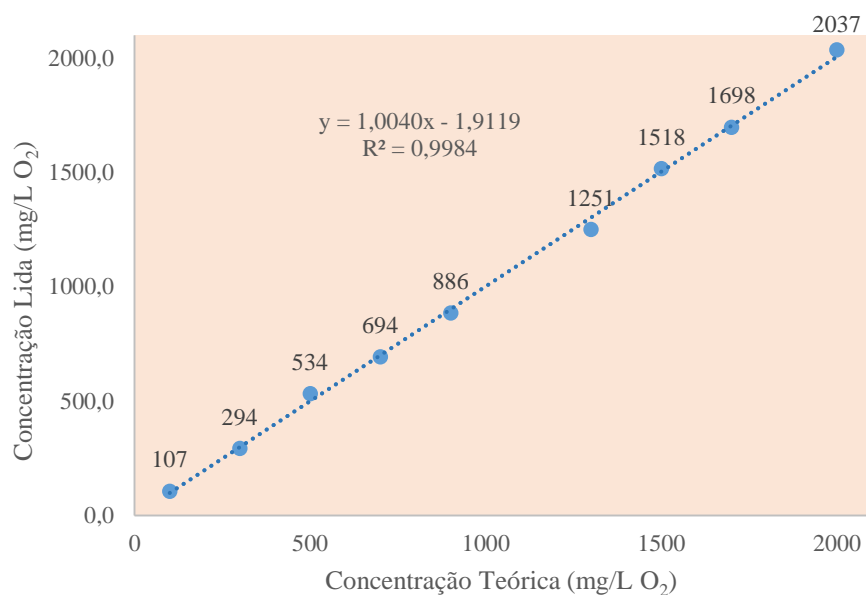


Figura 7.19 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 1014

3ª Curva Calibração:

Apresentam-se na tabela 7.12 os resultados obtidos para o estudo da curva de calibração.

Tabela 7.12 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 1014 – Gama Alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Concentração Teórica (mg/L O ₂)	Concentração Lida (mg/L O ₂) DR 3900	Abs Lida (λ=605 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
100	104	0,102	4%
300	319	0,200	6%
500	519	0,291	4%
700	716	0,381	2%
900	904	0,467	0%
1100	1068	0,542	-3%
1300	1248	0,624	-4%
1500	1505	0,741	0%
1700	1684	0,822	-1%
2000	2007	0,970	0%

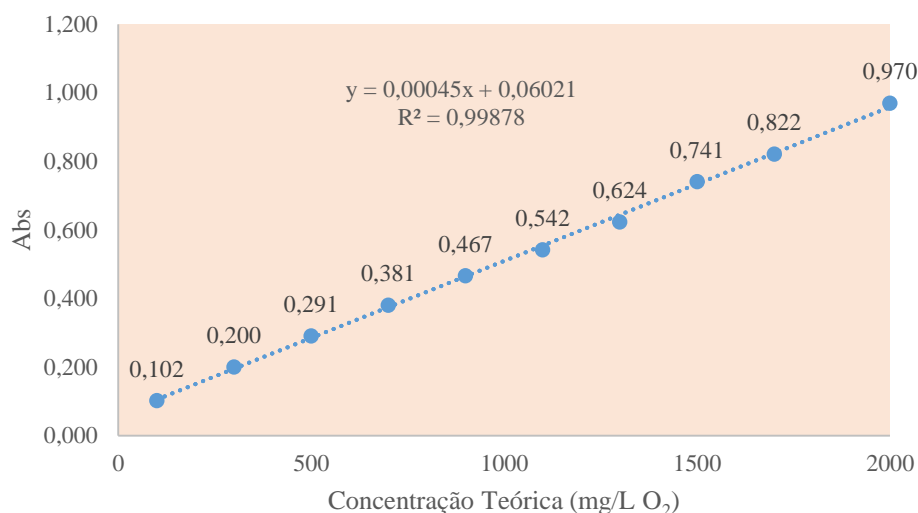


Figura 7.20 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 1014

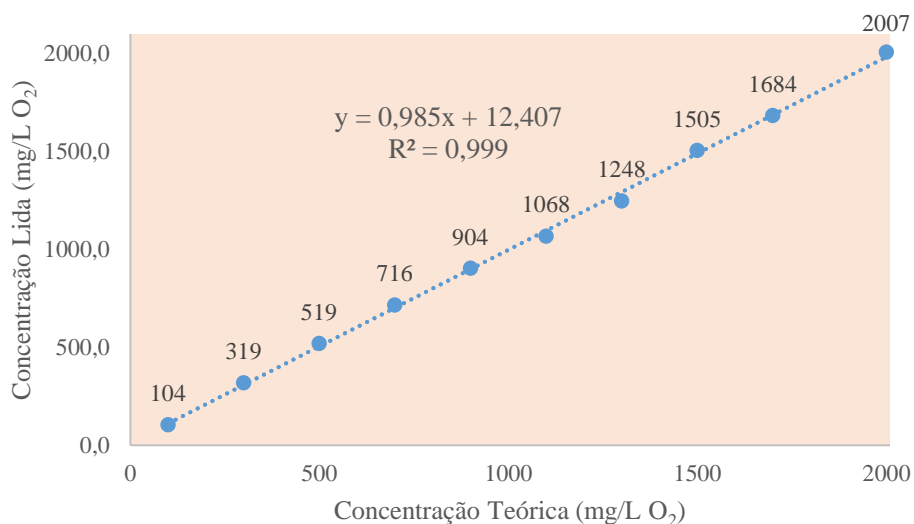


Figura 7.21 - Concentração Lida vs Concentração Teórica – LCK 1014

Através das representações anteriores pode concluir-se que:

- Pelas figuras 7.15, 7.18 e 7.20, existe uma boa linearidade verificada visualmente e também através da obtenção de coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,990, valor correspondente ao critério de aceitação do coeficiente de correlação ($r \geq 0,995$).
- Há uma boa relação entre as concentrações lida e teórica, tal é possível verificar pelas figuras 7.16, 7.19 e 7.21.
- Apesar de se ter verificado a linearidade aplicou-se o teste estatístico de Mandel, para confirmar a existência de linearidade para todas as curvas.

Os resultados para cada curva para o teste de linearidade são apresentados na tabela 7.13.

Tabela 7.13 – Resumo Teste Mandel - Curvas de Calibração Abs vs Conc.Teórica LCK 1014

Nº Curva Calibração	Nº Pontos Curva	r	r ²	Teste Mandel - Linearidade							Conclusão
				a	b	S _{y1}	S _{y2}	DS ²	PG	F _{tabelado}	
1	10	0,999	0,999	0,0596	0,0005	0,0115	0,0105	0,00029	2,60	12,25	Melhor Ajuste é Linear
2	9	0,999	0,998	0,0540	0,0005	0,0128	0,0115	0,00035	2,65	13,75	Melhor Ajuste é Linear
3	10	0,999	0,999	0,0602	0,0005	0,0104	0,0102	0,00014	1,34	12,25	Melhor Ajuste é Linear

7.1.2 Limiares Analíticos

A primeira abordagem na determinação dos limiares analíticos do método em validação foi a partir das curvas de calibração obtidas.

Através das curvas concentração lida vs concentração teórica anteriormente apresentadas para a gama baixa do CQO, obteve-se um limite de quantificação experimental médio para o método de CQO de 8,3 mg/L O₂.

Tabela 7.14- Determinação dos limiares analíticos do micro método CQO gama [5-60] mg/L O₂ – LCK 1414

Curva Calibração nº	1	2	3
S _{x/y}	0,786	0,795	0,837
Declive	0,963	0,960	0,988
LQ (mg/L O ₂)	8,2	8,3	8,5
LD (mg/L O ₂)	2,7	2,7	2,8

Tendo em conta a tabela 7.14, verifica-se que o limite de quantificação referente ao parâmetro CQO foi sempre superior ao início da gama do fornecedor e por isso daqui conclui-se que o LQ deverá ser majorado para 8 mg/L O₂.

Cada método tem apenas um limite de quantificação e um limite de deteção. Significando, portanto que para as restantes gamas foram apenas verificados os limites inferiores de cada gama, inicialmente através das curvas de calibração e os resultados obtidos estão apresentados na tabela 7.15.

Tabela 7.15 – Verificação dos Limiares Analíticos para a gama intermédia e alta CQO

Curva Calibração nº	LCK 314 [15-150]mg/LO ₂			LCK 1014 [100-2000]mg/LO ₂		
	1	2	3	1	2	3
S _{x/y}	2,530	0,908	2,206	25,459	27,966	22,995
Declive	1,019	0,974	0,977	0,992	1,004	0,985
Limite Inferior Quantificação (mg/L O ₂)	24,8	9,3	22,6	256,6	278,5	233,4
Limite Inferior Deteção (mg/L O ₂)	8,2	3,1	7,4	84,7	91,9	77,0

No entanto, visto o processo de validação dos limiares ter outras opções de cálculo, fez-se um estudo para a estimativa dos limiares em condições de repetibilidade, com o padrão de concentração inferior da gama comercial. Para além desse também foi estudado o padrão 8 mg/L O₂. Apresentam-se os resultados na tabela 7.16.

Tabela 7.16 – Estudo Repetibilidade Padrão 5 e 8 mg/L O₂ para determinação limiares analíticos

Gama Trabalho:	[5-60]			
	(mg/L O₂)			
PC:	5		8	
Repetição nº	Conc. Lida (X)	 X_i-X_{i-1} 	Conc. Lida (X)	 X_i-X_{i-1}
1	5,7	-	8,3	-
2	5,5	0,2	8,8	0,5
3	5,9	0,4	8,2	0,6
4	5,7	0,2	8,7	0,5
5	6,3	0,6	7,8	0,9
6	5,3	1,0	7,8	0,0
7	4,9	0,4	7,8	0,0
8	5,8	0,9	8,5	0,7
9	5,3	0,4	8,4	0,1
10	5,7	0,4	9,2	0,8
Média	5,6		8,4	
Desvio Padrão	0,4		0,5	
Variância (mg/L O ₂) ²	0,2		0,2	
%CV	6,8%		5,7%	
%Erro Relativo (C.A. ≤15%)	12%		4%	
Limite repetibilidade (r)	1,1		1,3	
LD (mg/L O₂)	1,3		1,5	
LQ (mg/L O₂)	3,8		4,5	

Da apreciação da tabela 7.16, o LQ do método de CQO poderia ser 5 mg/L O₂. Uma das razões da implementação do micro método de CQO foi a necessidade do laboratório diminuir o LQ que tem estabelecido para o método clássico (30 mg/L O₂), e esse objetivo foi conseguido com os *kits*, representando uma mais-valia para o cliente interno. Contudo, não se considera necessário que o LQ do método de CQO seja tão baixo como o limite do fornecedor da gama baixa e portanto considerou-se ser mais adequado nas condições iniciais de validação majorá-lo para 8 mg/L O₂.

Nas restantes gamas foram também verificados em condições de repetibilidade os limites inferiores do fornecedor e os resultados encontram-se na tabela 7.17.

Tabela 7.17 – Estudo Repetibilidade Padrão 15 (LCK 314) e 100 mg/L O₂ (LCK 1014)

Gama Trabalho:	[15-150]		[100-2000]	
	(mg/L O ₂)			
PC:	15		100	
Repetição n°	Conc. Lida (X)	X _i -X _{i-1}	Conc. Lida (X)	X _i -X _{i-1}
1	14,3	-	99,3	-
2	13,1	1,2	94,9	4,4
3	13,8	0,7	99,3	4,4
4	12,8	1,0	97,1	2,2
5	14,6	1,8	103,7	6,6
6	14,3	0,3	97,1	6,6
7	14,3	0,0	103,7	6,6
8	14,1	0,2	105,8	2,1
9	13,8	0,3	97,1	8,7
10	15,8	2,0	92,7	4,4
Média	14,1		99,1	
Desvio Padrão	0,8		4,2	
Variância (mg/L O ₂) ²	0,7		17,5	
%CV	5,9%		4,2%	
%Erro Relativo (C.A. ≤15%)	-6%		-1%	
Limite repetibilidade (r)	2,3		11,7	
Limite Detecção Inferior da Gama (mg/L O₂)	2,7		13,8	
Limite Quantificação Inferior da Gama (mg/L O₂)	8,3		41,9	

Em virtude de se terem obtido variâncias baixas na repetibilidade no início de cada gama não se vê razão para aumentar a concentração inicial, e portanto o laboratório nas condições iniciais de validação irá aceitar os limites inferiores de cada gama definida pelo fornecedor, à exceção da gama baixa.

Contudo, de modo a que a precisão seja o mais realista possível é recomendável que seja feita uma abordagem em condições de precisão intermédia e verificar nessas condições os limiares do método [37]. Nesse estudo dever-se-á fazer um número suficiente de replicados para obter uma estimativa adequada do desvio padrão, tipicamente deverá estar entre 6 a 15 replicados, sendo o mais usado em processos de validação 10 replicados [37].

7.1.3 Análise Estabilidade Método e Sensibilidade

A sensibilidade do método é constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive porque a curva de calibração é explicada por um modelo linear. Na tabela 7.18 reúnem-se os declives das retas anteriormente estudadas.

Tabela 7.18 – Resumo resultados sensibilidade micro método CQO

Estudo Estabilidade	LCK 1414 [5-60] mg/L O ₂			LCK 314 [15-150] mg/L O ₂			LCK 1014 [100-2000] mg/L O ₂		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Curva Calibração n ^o									
b ≡ declive curva Abs vs Conc. Teórica	-0,0210	-0,0210	-0,0216	-0,0040	-0,0039	-0,0039	0,0005	0,0005	0,0005
Média	-0,0212			-0,0039			0,0005		
Desvio Padrão	0,0003			0,0001			0,0000		
%CV	✕	-0,10%	-1,56%	✕	-2,94%	-2,38%	✕	0,00%	0,00%
b ≡ declive curvas Conc. Lida vs Conc. Teórica	0,9626	0,9604	0,9880	1,0186	0,9742	0,9772	0,9921	1,0040	0,9851
Média	0,9703			0,9900			0,9937		
Desvio Padrão	0,0154			0,0248			0,0096		
%CV	✕	0,16%	1,58%	✕	3,15%	2,51%	✕	0,85%	0,96%

Conclusão:

Estudou-se a estabilidade das retas de calibração dos *kits*, através da realização de curvas de calibração para as várias gamas, em dias diferentes. Verifica-se pela tabela 7.18 que não há grande variação do declive (o que é verificado também pelo coeficiente de variação entre cada declive ser sempre inferior a 10%), e da ordenada (a), indicada para cada gama nas tabelas 7.5, 7.9, 7.13, concluindo-se assim que o método é estável e que por isso não é necessário grande controlo da curva de calibração, o que se revela ser um ponto forte do método. Ainda assim, é de salientar que é sempre importante fazer-se um controlo das curvas, sobretudo na introdução de um novo lote em rotina de trabalho.

7.1.4 Gamas de Trabalho

Para realizar a validação da gama de trabalho inicialmente procedeu-se a uma análise das variâncias nos extremos da gama definida pelo fabricante, neste caso a Hach Lange®.

O teste de homogeneidade de variâncias foi realizado com base na ISO 8466-1:1990, e para tal efetuaram-se 10 ensaios em repetibilidade para o primeiro e último padrão da curva de calibração.

Através do teste estatístico de Fisher pretendeu-se saber se existiam ou não diferenças significativas nos padrões analisados e perceber se era necessário ajustar a gama.

LCK 1414 – Gama baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Começou por se analisar a existência de homogeneidade entre as variâncias dos padrões extremos da gama de trabalho mais baixa do CQO.

Tabela 7.19 – Teste de Homogeneidade de Variâncias gama [5-60] mg/L O₂

Teste Homogeneidade LCK 1414 – [5-60] mg/L O ₂				
	5 mg/L O ₂	60 mg/L O ₂	8 mg/L O ₂	60 mg/L O ₂
1	1,596	0,419	1,541	0,419
2	1,601	0,456	1,530	0,456
3	1,591	0,444	1,541	0,444
4	1,596	0,466	1,531	0,466
5	1,583	0,526	1,550	0,526
6	1,605	0,482	1,551	0,482
7	1,614	0,506	1,550	0,506
8	1,595	0,444	1,535	0,444
9	1,605	0,439	1,538	0,439
10	1,597	0,510	1,521	0,510
Média (mg/L O₂)	1,598	0,469	1,539	0,469
Desvio Padrão (mg/L O₂)	0,009	0,035	0,010	0,035
Variância (mg/L O₂)²	7,27E-05	1,26E-03	9,77E-5	1,26E-03
%CV	0,53%	7,55%	0,64%	7,55%
nº ensaios	10	10	10	10
nº graus liberdade	9	9	9	9
PG	17,27		12,84	
F_{tabelado} (g.l N-1; 99%)	5,35			

Como o valor de $PG \geq F_{\text{tabelado}}$ conclui-se que existem diferenças significativas entre as variâncias, pelo que não existe homogeneidade de variâncias na gama de [5-60] mg/L O₂. Com base neste resultado teve de se ajustar a gama, e uma vez que o LQ foi majorado para 8 mg/L O₂, optou-se por se aplicar o teste entre [8-60] mg/L O₂, mas também se concluiu que existem diferenças significativas entre as variâncias, pelo que não existe homogeneidade de variâncias.

Pela figura 7.22, é verificável a diferença das variâncias entre os pontos extremos, por esta figura conclui-se que a variância no ponto 5 mg/L O₂ é inferior à variância do ponto 60 mg/L O₂, o mesmo acontece com o ponto 8 e o 60 mg/L O₂. Posto isto, a gama do fornecedor foi “dividida” em segmentos, nomeadamente [8-15] e [15-60] mg/L O₂. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 7.20.

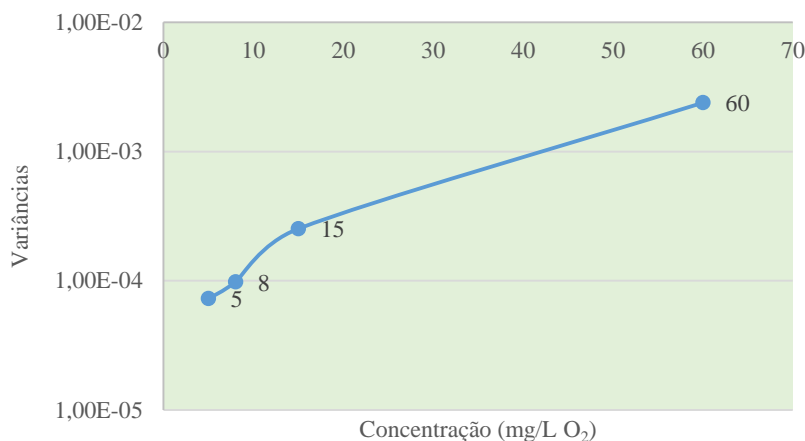


Figura 7.22 – Estudo do comportamento das variâncias ao longo da gama [5-60] mg/L O₂ – CQO

Tabela 7.20 - Teste de Homogeneidade de Variâncias gama [8-15] e [15-60] mg/L O₂

Teste Homogeneidade LCK 1414 – [5-60] mg/L O₂			
	8 mg/L O ₂	15 mg/L O ₂	60 mg/L O ₂
1	1,541	1,406	0,419
2	1,530	1,415	0,456
3	1,541	1,421	0,444
4	1,531	1,386	0,466
5	1,550	1,397	0,526
6	1,551	1,419	0,482
7	1,550	1,385	0,506
8	1,535	1,381	0,444
9	1,538	1,393	0,439
10	1,521	1,380	0,510
Média (mg/L O₂)	1,539	1,398	0,469
Desvio Padrão (mg/L O₂)	0,010	0,016	0,035
Variância (mg/L O₂)²	9,77E-05	2,53E-04	1,26E-03
% CV	0,64%	1,14%	7,55%
nº ensaios	10	10	10
nº graus liberdade	9	9	9
PG	2,59		-
PG	-	4,97	
F_{tabelado} (g,1 N-1; 99%)	5,35		

Como o valor de $PG \leq F_{\text{tabelado}}$ conclui-se que não existem diferenças significativas entre as variâncias, pelo que existe homogeneidade de variâncias na gama de [8-15] e [15-60] mg/L O₂.

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Após a conclusão do estudo da gama baixa de CQO, estudou-se a existência de homogeneidade de variâncias para a gama intermédia.

Tabela 7.21 - Teste de Homogeneidade de variâncias gama [15-150] mg/L O₂

Teste Homogeneidade LCK 314		
[15-150] mg/L O₂		
	15 mg/L O ₂	150 mg/L O ₂
1	0,761	0,205
2	0,766	0,212
3	0,763	0,209
4	0,767	0,207
5	0,760	0,204
6	0,761	0,204
7	0,762	0,210
8	0,762	0,199
9	0,763	0,217
10	0,755	0,203
Média (mg/L O₂)	0,762	0,207
Desvio Padrão (mg/L O₂)	0,003	0,005
Variância (mg/L O₂)²	1,09E-05	2,67E-05
% CV	0,43%	2,49%
nº ensaios	10	10
nº graus liberdade	9	9
PG	2,45	
F_{tabelado} (g.I N-1; 99%)	5,35	

Ao estudar os pontos extremos desta gama conseguiu-se obter homogeneidade de variâncias, uma vez que a variância no ponto 15 mg/L O₂ é bastante idêntica (são da mesma ordem de grandeza) à variância do ponto 150 mg/L O₂.

Conclui-se que não existem diferenças significativas entre as variâncias, uma vez que o valor de $PG \leq F_{\text{tabelado}}$, pelo que existe homogeneidade de variâncias na gama de [15-150] mg/L O₂.

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Também na gama alta foi feito o estudo de homogeneidade de variâncias em cada extremo da gama.

Tabela 7.22 - Teste de Homogeneidade de variâncias gama [100-2000] mg/L O₂

Teste Homogeneidade LCK 1014		
[100-2000] mg/L O₂		
	100 mg/L O ₂	2000 mg/L O ₂
1	0,100	0,970
2	0,098	0,993
3	0,100	0,968
4	0,099	0,937
5	0,102	0,976
6	0,099	0,971
7	0,102	0,954
8	0,099	0,966
9	0,097	0,961
10	0,103	0,930
Média (mg/L O₂)	0,100	0,963
Desvio Padrão (mg/L O₂)	0,002	0,019
Variância (mg/L O₂)²	3,66E-06	3,40E-4
%CV	1,91%	1,92%
n° ensaios	10	10
n° graus liberdade	9	9
PG	93,14	
F_{tabelado} (g.l N-1; 99%)	5,35	

Como o valor de $PG \geq F_{\text{tabelado}}$ conclui-se que existem diferenças significativas entre as variâncias, pelo que não existe homogeneidade de variâncias na gama de [100-2000] mg/L O₂.

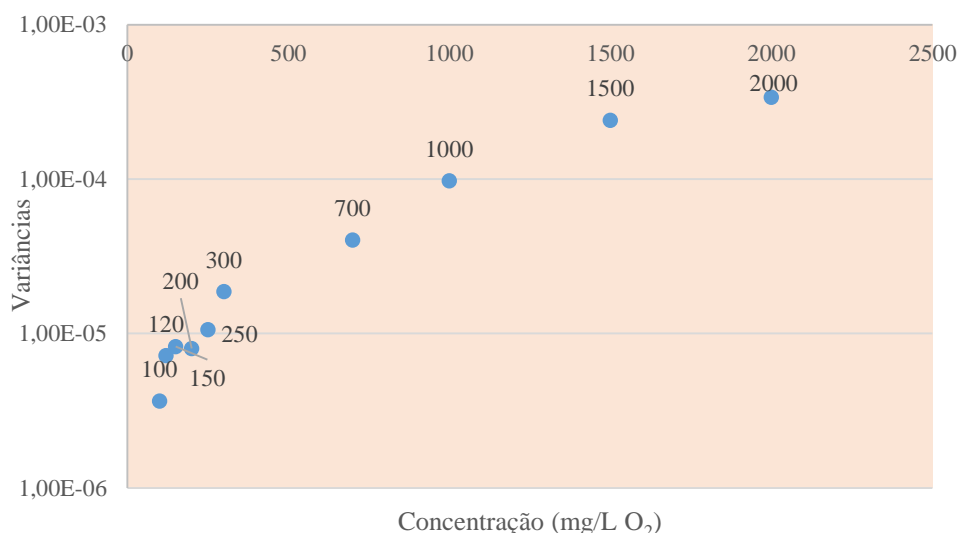


Figura 7.23 - Estudo do comportamento das variâncias ao longo da gama [100-2000] mg/L O₂ - CQO

Seguidamente a ter sido feita esta primeira abordagem e de não se ter obtido homogeneidade na maioria das gamas, estudaram-se outros pontos para além dos extremos em cada uma das gamas para ter noção do comportamento das variâncias com as concentrações.

Pela tabela 7.22 e pela figura 7.23 conclui-se que a variância no ponto 100 mg/L O₂ é bastante inferior à variância do ponto 2000 mg/L O₂, e pelo facto da gama ser muito grande não se conseguiu obter homogeneidade de variâncias.

Apresenta-se de seguida a tabela 7.23 com o resumo com os testes de homogeneidade realizados e as respetivas conclusões.

Tabela 7.23 – Resumo Testes Homogeneidade Variâncias Gama Alta CQO [100-2000] mg/L O₂ - LCK 1014

Resumo do Estudo de Homogeneidade de Variâncias						
	Subgamas:	100 - 1000	100 - 2000	300 - 1000	300 - 2000	1000-2000
Início_gama_A	100	100	100	300	300	1000
Fim_gama_B	300	1000	2000	1000	2000	2000
Variância_A	3,66E-06	3,66E-06	3,66E-06	1,87E-05	1,87E-05	9,80E-05
Variância_B	1,87E-05	9,80E-05	3,40E-04	9,80E-05	3,40E-04	3,40E-04
PG	5,12	26,80	93,14	5,24	18,20	3,48
F_tabelado	5,35	5,35	5,35	5,35	5,35	5,35
Há_Homogeneidade ?	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM

Apesar da regressão linear (reta de calibração) ser claramente a abordagem que mais se adapta aos resultados obtidos, verificou-se por um teste de homogeneidade que as gamas de trabalho baixa e alta não respondiam de forma positiva ao teste estatístico F, isto é, a homogeneidade de variâncias não é cumprida. De facto, a utilização a nível laboratorial de uma única gama de trabalho é mais vantajosa, mas nem sempre é possível, muitas vezes porque se está perante intervalos de concentração amplos como é o caso. Uma das possíveis alternativas a este teste será a verificação do “peso” que cada concentração tem e assim perceber de que forma influencia a reta de calibração, através da regressão ponderada.

Nas próximas figuras 7.24 e 7.25 verifica-se que apesar das variâncias variarem com a concentração, como visto anteriormente, a gama baixa e alta estão validadas. No Anexo C encontram-se os cálculos referentes à figura 7.24 e 7.25.

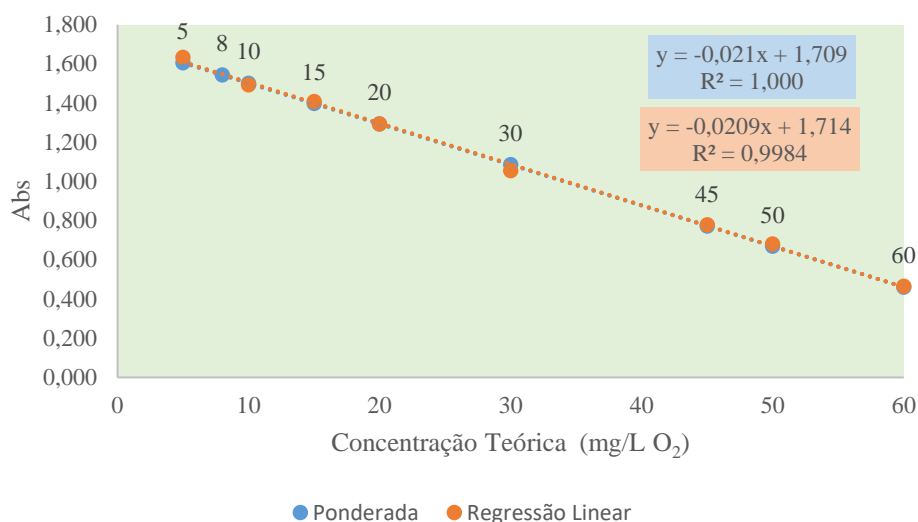


Figura 7.24 – Regressão Linear e Ponderada – LCK 1414 [5-60] mg/L O₂

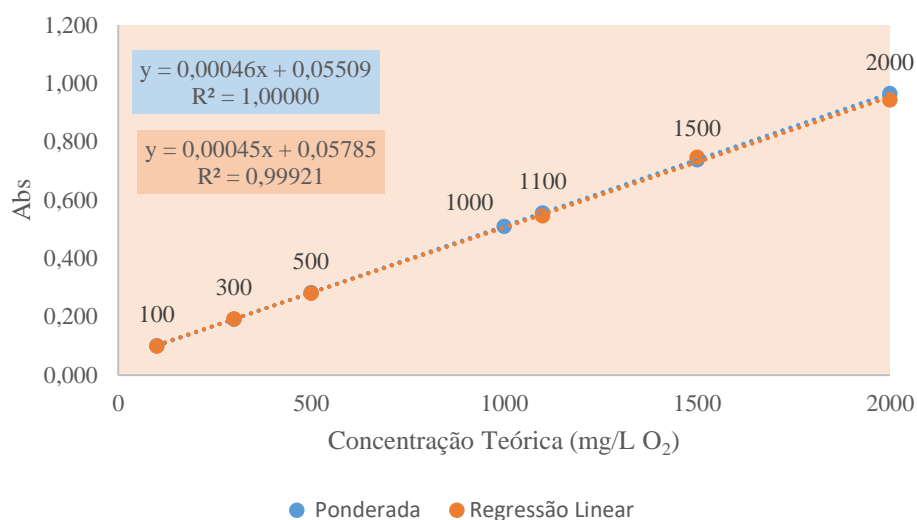


Figura 7.25 - Regressão Linear e Ponderada – LCK 1014 [100-2000] mg/L O₂

Conclusões:

Pelo facto de a equação de cada uma das regressões ser muito semelhante e porque ambas as retas se sobrepõem na figura 7.24 e 7.25 conclui-se assim que as gamas estão validadas.

De acordo com a norma ISO 8466-1:1990 quando não se tem homogeneidade de variâncias, pode verificar-se a gama de trabalho recorrendo à estimativa do seu intervalo de confiança. Para tal, escolheram-se quatro pontos em repetibilidade para a gama baixa e alta e 3 para a gama intermédia, situados nos extremos e centro da mesma, de forma a repercutirem resultados representativos. O intuito é verificar se as gamas de trabalho estão efetivamente bem determinadas, caso existam incertezas grandes tal é observado através da formação de hipérbolos

que envolvem a curva de calibração. Os pontos mais propícios onde se espera ter maior incerteza são as zonas extremas de cada gama, pelo que na prática são normalmente zonas a evitar.

Os resultados para cada gama encontram-se nas tabelas e figuras 7.24 a 7.26 e 7.26 a 7.28, respetivamente. Fez-se mais esta abordagem para justificar e validar as gamas de trabalho que irão ser usadas em rotina.

Tabela 7.24- Estimativa do intervalo de confiança da reta de calibração da gama [5-60] mg/L O₂

y	x estimado (mg/L O ₂)	u(x)	Limite inf. (mg/L O ₂)	Limite sup. (mg/L O ₂)	u(X)%
0,469	60,028	-0,625	59,403	60,653	1,0
0,521	57,532	-0,598	56,934	58,129	1,0
0,572	55,036	-0,571	54,465	55,607	1,0
0,623	52,540	-0,545	51,995	53,085	1,0
0,674	50,044	-0,520	49,524	50,564	1,0
0,726	47,548	-0,496	47,053	48,044	1,0
0,777	45,052	-0,473	44,579	45,525	1,0
0,828	42,556	-0,451	42,105	43,008	1,1
0,880	40,060	-0,431	39,629	40,492	1,1
0,931	37,564	-0,413	37,151	37,978	1,1
0,982	35,069	-0,397	34,672	35,466	1,1
1,034	32,573	-0,383	32,189	32,956	1,2
1,085	30,077	-0,372	29,705	30,449	1,2
1,136	27,581	-0,363	27,217	27,944	1,3
1,188	25,085	-0,358	24,727	25,443	1,4
1,239	22,589	-0,356	22,233	22,945	1,6
1,290	20,093	-0,357	19,736	20,449	1,8
1,342	17,597	-0,361	17,237	17,958	2,0
1,393	15,101	-0,368	14,734	15,469	2,4
1,444	12,605	-0,378	12,228	12,983	3,0
1,496	10,109	-0,390	9,719	10,499	3,9
1,547	7,613	-0,405	7,208	8,019	5,3
1,598	5,117	-0,422	4,695	5,540	8,3

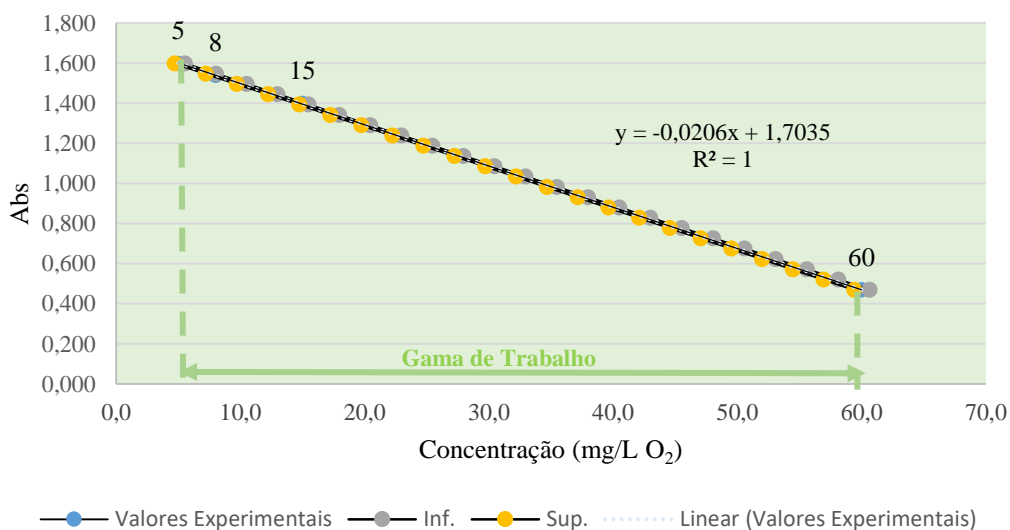


Figura 7.26 – Intervalo de confiança da gama [5-60] mg/L O₂

Tabela 7.25 - Estimativa do intervalo de confiança da reta de calibração da gama [15-150] mg/L O₂

y	x estimado (mg/L O ₂)	u(x)	Limite inf. (mg/L O ₂)	Limite sup. (mg/L O ₂)	u(X)%
0,207	149,995	-0,803	149,192	150,798	0,5
0,232	143,857	-0,768	143,089	144,625	0,5
0,257	137,719	-0,735	136,984	138,454	0,5
0,283	131,581	-0,703	130,878	132,284	0,5
0,308	125,443	-0,672	124,771	126,116	0,5
0,333	119,305	-0,644	118,662	119,949	0,5
0,358	113,167	-0,617	112,551	113,784	0,5
0,384	107,029	-0,592	106,437	107,621	0,6
0,409	100,891	-0,570	100,321	101,461	0,6
0,434	94,753	-0,551	94,203	95,304	0,6
0,459	88,615	-0,534	88,081	89,150	0,6
0,485	82,478	-0,521	81,956	82,999	0,6
0,510	76,340	-0,512	75,827	76,852	0,7
0,535	70,202	-0,507	69,695	70,708	0,7
0,560	64,064	-0,505	63,558	64,569	0,8
0,585	57,926	-0,508	57,418	58,434	0,9
0,611	51,788	-0,515	51,273	52,302	1,0
0,636	45,650	-0,525	45,125	46,175	1,2
0,661	39,512	-0,539	38,973	40,051	1,4
0,686	33,374	-0,556	32,818	33,930	1,7
0,712	27,236	-0,576	26,660	27,812	2,1
0,737	21,098	-0,599	20,499	21,697	2,8
0,762	14,960	-0,625	14,335	15,585	4,2

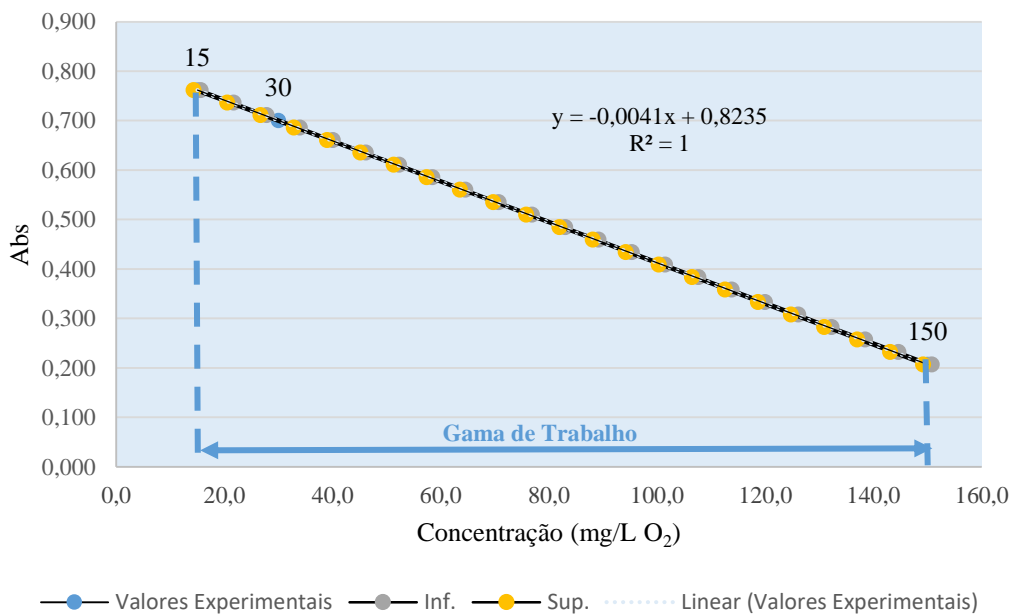


Figura 7.27 - Intervalo de confiança da gama [15-150] mg/L O₂

Tabela 7.26 - Estimativa do intervalo de confiança da reta de calibração da gama [100-2000] mg/L O₂

y	x estimado (mg/L O ₂)	u(x)	limite sup. (mg/L O ₂)	limite inf. (mg/L O ₂)	u(X)%
0,100	100,602	19,077	119,679	81,526	19,0
0,139	186,824	18,186	205,010	168,639	9,7
0,178	273,046	17,366	290,412	255,680	6,4
0,218	359,268	16,628	375,896	342,640	4,6
0,257	445,490	15,983	461,473	429,508	3,6
0,296	531,712	15,442	547,154	516,270	2,9
0,335	617,934	15,017	632,952	602,917	2,4
0,374	704,156	14,719	718,875	689,438	2,1
0,414	790,378	14,554	804,932	775,824	1,8
0,453	876,600	14,527	891,127	862,073	1,7
0,492	962,822	14,639	977,462	948,183	1,5
0,531	1049,044	14,888	1063,932	1034,156	1,4
0,570	1135,266	15,265	1150,531	1120,001	1,3
0,610	1221,488	15,763	1237,251	1205,725	1,3
0,649	1307,710	16,369	1324,079	1291,341	1,3
0,688	1393,932	17,073	1411,005	1376,859	1,2
0,727	1480,154	17,863	1498,017	1462,291	1,2
0,767	1566,376	18,728	1585,104	1547,648	1,2
0,806	1652,598	19,658	1672,256	1632,940	1,2
0,845	1738,820	20,644	1759,464	1718,176	1,2
0,884	1825,042	21,679	1846,721	1803,363	1,2
0,923	1911,264	22,756	1934,020	1888,508	1,2
0,963	1997,486	23,870	2021,355	1973,616	1,2

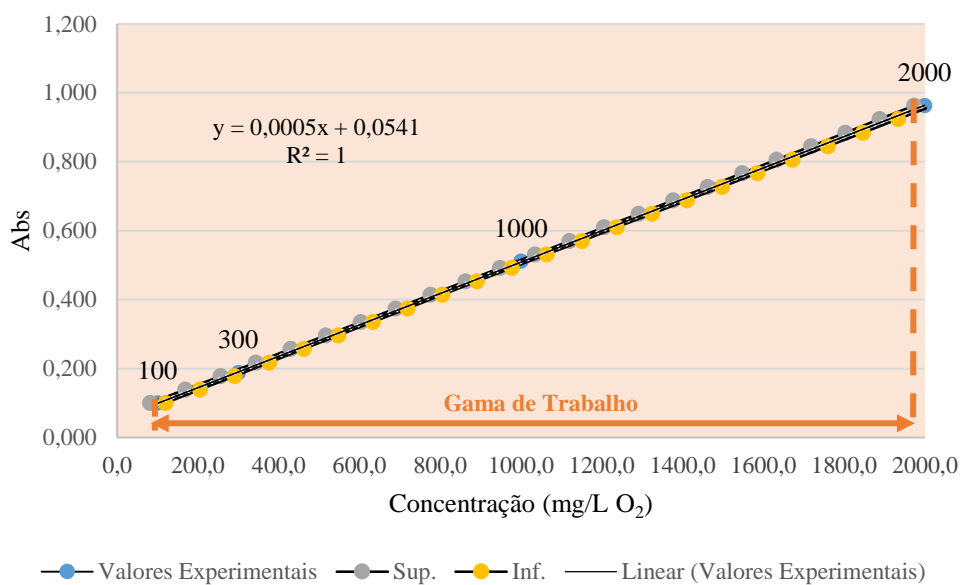


Figura 7.28 – Intervalo de confiança da gama [100-2000] mg/L O₂

Conclusões:

De acordo com esta abordagem, verifica-se que os extremos das gamas sobretudo os iniciais são zonas de maior incerteza e por isso deve evitar-se trabalhar nessas zonas, tal como se esperava. A gama mais baixa de CQO está bem ajustada, muito embora tenha sido feita a majoração do LQ para 8 mg/L O₂, por ter sido considerado o mais adequado para a fase inicial do estudo de validação. A gama intermédia como se obteve homogeneidade confirma-se de acordo com os resultados usados nesta abordagem que se poderá utilizar esta gama para ler concentrações entre 15 e 150 mg/L O₂. Relativamente à gama alta poderá começar em 100 mg/L O₂, mesmo não se tendo obtido homogeneidade.

Segundo esta abordagem comprova-se pelos resultados resumidos nas tabelas 7.27, 7.28 e 7.29, uma vez mais que, se consegue um bom coeficiente de variação da reta ($\leq 10\%$) e uma boa linearidade avaliada pelo teste de Mandel ($PG \leq F_{\text{tabelado}}$) e pelo coeficiente de correlação. Confirma-se também o limite inferior de quantificação da gama, logo confirma-se a possibilidade do laboratório usar a gama do fabricante em toda a sua amplitude.

Tabela 7.27 – Resultados da interpolação da curva de calibração gama [5-60] mg/LO₂

Parâmetro	Critérios		Resultados	Conclusão
Coefficiente de Correlação	$r \geq$	0,995	-1,000	Ok
Coefficiente de Variação do método	$\%CV \leq$	10%	-0,64%	Ok
Linearidade	$PG \leq$	4052	400,9	Ok
Homogeneidade de Variâncias	$PG \leq$	5,35	17,27	Não Há

Tabela 7.28- Resultados da interpolação da curva de calibração gama [15-150] mg/LO₂

Parâmetro	Critérios		Resultados	Conclusão
Coefficiente de Correlação	$r \geq$	0,995	-1,000	Ok
Coefficiente de Variação do método	$\%CV \leq$	10%	-0,09%	Ok
Linearidade	$PG \leq$	-	-	Não Avaliado ⁴
Homogeneidade de Variâncias	$PG \leq$	5,35	2,45	Há

Tabela 7.29 – Resultados da interpolação da curva de calibração gama [100-2000] mg/LO₂

Parâmetro	Critérios		Resultados	Conclusão
Coefficiente de Correlação	$r \geq$	0,995	1,000	Ok
Coefficiente de Variação do método	$\%CV \leq$	10%	0,67%	Ok
Limite Inferior Detecção (mg/L O₂)	$LD =$	30,0	17,1	Ok
Limite Inferior Quantificação (mg/L O₂)	$LQ <$	100,0	57,1	Ok
Linearidade	$PG \leq$	4052	0,97	Ok
Homogeneidade de Variâncias	$PG \leq$	5,35	93,14	Não Há

É importante referir que nas gamas baixa e intermédia não foram considerados na tabela quer o LQ do método (gama baixa), quer o limite inferior de quantificação da gama (intermédia)

⁴ Critério não avaliado porque são necessários pelo menos 4 pontos (devido aos graus de liberdade serem N-3)

uma vez que os valores obtidos com a curva de abs vs concentração dão negativos e não fazem sentido valores de concentração negativos.

Aplicou-se o teste de Grubbs, apresentado na tabela 7.30 para analisar cada conjunto de repetibilidades aquando do estudo de homogeneidade de variâncias de forma a verificar se existiam *outliers*.

Tabela 7.30-Aplicação do teste de Grubbs aos dados do estudo homogeneidade de variâncias

LCK 1414 [5-60] mg/L O ₂								
Padrão (mg/L O ₂)	5		8		15		60	
Ponto testado:	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior	Inferior	Superior
G _p =	1,79	1,84	1,8	1,23	1,15	1,43	1,42	1,6
LCK 314 [15-150] mg/L O ₂								
Padrão (mg/L O ₂)	15		150					
Ponto testado:	Inferior	Superior	Inferior	Superior				
G _p =	2,12	1,52	1,55	1,94				
LCK 1014 [100-2000] mg/L O ₂								
Padrão (mg/L O ₂)	100		2000					
Ponto testado:	Inferior	Superior	Inferior	Superior				
G _p =	1,52	1,62	1,77	1,65				
G _{tabelado} (5%) =	2,29							

Conclusão:

Com a aplicação do teste verifica-se que quer o ponto inferior, quer o superior de cada conjunto de resultados não são *outliers*, uma vez que o valor calculado (G_p) é inferior ao G_{tabelado}.

7.1.5 Precisão

Os estudos sempre que possível devem ser conduzidos por forma a fornecer um levantamento realista e representativo do tipo de amostras que irão ser realizadas em rotina aquando da implementação do método no laboratório e por isso devem abranger toda a gama de concentração.

Duplicados

A realização de duplicados é necessária para estudar a precisão do método.

LCK 1414 – Gama baixa CQO [5-60] mg/L O₂

A tabela 7.31 apresenta os resultados obtidos para ensaios de duplicados realizados em precisão intermédia no processo de validação da gama baixa do micro método de CQO.

Tabela 7.31 – Duplicados de Amostras na gama baixa de CQO – [5-60] mg/LO₂ – LCK 1414

Amostra	Conc. Amostra (mg/L O ₂)	Conc. Duplicado (mg /L O ₂)	Média (mg/L O ₂)	Amplitude Absoluta (mg/L O ₂)	Amplitude Relativa (%)	C.A. Amplitude Relativa (17%)
1	21,2	21,8	21,5	0,6	2,8%	Aceite
2	24,1	23,4	23,8	0,7	2,9%	Aceite
3	19,9	22,1	21,0	2,2	10,5%	Aceite
4	22,9	21,9	22,4	1,0	4,5%	Aceite
5	18,3	19,3	18,8	1,0	5,3%	Aceite
6	19,9	19,3	19,6	0,6	3,1%	Aceite
7	20,4	19,1	19,8	1,3	6,6%	Aceite
8	14,8	16,8	15,8	2,0	12,7%	Aceite
9	28,6	28,3	28,5	0,3	1,1%	Aceite
10	33,5	27,3	30,4	6,2	20,4%	Não Aceite
11	23,8	24,0	23,9	0,2	0,8%	Aceite
12	19,4	18,8	19,1	0,6	3,1%	Aceite
13	24,5	24,6	24,6	0,1	0,4%	Aceite
14	20,5	24,1	22,3	3,6	16,1%	Aceite
15	17,9	21,7	19,8	3,8	19,2%	Não Aceite
Média				1,1	5,4%	-
Desvio Padrão				0,99	4,9%	-
Incerteza				0,97	4,8%	-
Nº ensaios				13		

Os resultados dos 15 duplicados realizados em condições de precisão intermédia (dias diferentes), na gama baixa de CQO indicam que:

- Apenas 2 por terem uma amplitude superior ao critério de 17%, não foram aceites, contudo pensa-se que o critério de aceitação se encontra bem definido para já e nas condições iniciais de trabalho;

- Existe uma amplitude média relativa de 5%, o que é indicativo da existência de uma baixa dispersão nos resultados obtidos;
- Pelos resultados obtidos é possível afirmar que o método em validação é preciso.

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

A tabela 7.32 exibe os resultados obtidos nos ensaios de duplicados realizados em precisão intermédia no processo de validação da gama intermédia do método de CQO.

Tabela 7.32- Duplicados de Amostras na gama intermédia de CQO – [15-150] mg/LO₂ – LCK 314

Amostra	Conc. Amostra (mg/L O ₂)	Conc. Duplicado (mg/L O ₂)	Média (mg/L O ₂)	Amplitude Absoluta (mg/L O ₂)	Amplitude Relativa (%)	C.A. Amplitude Relativa (20%)
1	20,3	20,4	20,4	0,1	0,5%	Aceite
2	25,6	21,3	23,5	4,3	18,3%	Aceite
3	35,7	37,3	36,5	1,6	4,4%	Aceite
4	20,1	15,3	17,7	4,8	27,1%	Não Aceite
5	91,3	91,5	91,4	0,2	0,2%	Aceite
6	52,5	46,5	49,5	6,0	12,1%	Aceite
7	42,4	40,2	41,3	2,2	5,3%	Aceite
8	69,3	69,0	69,2	0,3	0,4%	Aceite
9	50,5	52,9	51,7	2,4	4,6%	Aceite
10	49,3	53,6	51,5	4,3	8,4%	Aceite
11	35,0	41,6	38,3	6,6	17,2%	Aceite
Média				2,8	7,2%	-
Desvio Padrão				2,4	6,7%	-
Incerteza				2,5	6,4%	-
Nº ensaios				10		

Os resultados dos 11 duplicados realizados em condições de precisão intermédia (dias diferentes), na gama intermédia de CQO indicam que:

- Apenas 1 por ter uma amplitude de 27,1% foi não aceite pelo critério de 20%, de qualquer das formas por ter sido uma situação pontual para já e nas primeiras condições de trabalho não se vê necessidade de alterar o critério de aceitação;
- Existe uma amplitude média relativa de 7%, o que é indicativo da existência de uma baixa dispersão nos resultados obtidos;
- Pelos resultados obtidos é possível afirmar que o método em validação é preciso.

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

A tabela 7.33 contém os resultados obtidos os ensaios de duplicados realizados em precisão intermédia no processo de validação da gama alta do método de CQO.

Tabela 7.33 - Duplicados de Amostras na gama alta de CQO – [100-2000] mg/LO₂ – LCK 1014

Amostra	Conc. Amostra (mg O ₂ /L)	Conc. Duplicado (mg O ₂ /L)	Média (mg/L O ₂)	Amplitude Absoluta (mg/LO ₂)	Amplitude Relativa (%)	C.A. Amplitude Relativa (15%)
1	570,0	532,0	551,0	38,0	6,9%	Aceite
2	503,0	536,0	519,5	33,0	6,4%	Aceite
3	118,0	120,0	119,0	2,0	1,7%	Aceite
4	1432,0	1432,0	1432,0	0,0	0,0%	Aceite
5	262,0	263,0	262,5	1,0	0,4%	Aceite
6	392,0	339,0	365,5	53,0	14,5%	Aceite
7	159,0	157,0	158,0	2,0	1,3%	Aceite
8	342,0	358,0	350,0	16,0	4,6%	Aceite
9	440,0	462,0	451,0	22,0	4,9%	Aceite
10	408,0	392,0	400,0	16,0	4,0%	Aceite
11	230,0	248,0	239,0	18,0	7,5%	Aceite
12	1746,0	1753,0	1749,5	7,0	0,4%	Aceite
13	305,0	304,0	304,5	1,0	0,3%	Aceite
14	645,0	648,0	646,5	3,0	0,5%	Aceite
15	1340,0	1350,0	1345,0	10,0	0,7%	Aceite
Média				14,8	3,6%	-
Desvio Padrão				15,9	4,0%	-
Incerteza				13,1	3,2%	-
Nº ensaios				15		

Os resultados dos 15 duplicados realizados em condições de precisão intermédia (dias diferentes), na gama alta de CQO indicam que:

- Dos 15 duplicados nenhum ficou fora do critério de aceitação definido de 15%;
- Existe uma amplitude média relativa de 4%, o que é indicativo da existência de uma baixa dispersão nos resultados obtidos;
- Pelos resultados obtidos é possível afirmar que o método em validação é preciso.

Conclusões da análise dos duplicados:

Considera-se evidenciada a coerência entre os valores dos parâmetros associados à precisão e os resultados obtidos na rotina e simultaneamente revelam consistência com os C.A. (critérios de aceitação) pré-estabelecidos. Sendo os critérios para as gamas baixa e intermédia de 17% e 20% respetivamente e de 15% para a gama alta.

Repetibilidade

Para avaliar a repetibilidade do método CQO foi feito um estudo com 10 ensaios para a mesma amostra de uma amostra representativa do tipo de amostras que chegam regularmente ao laboratório, para cada gama em estudo.

LCK 1414 – Gama baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Na tabela 7.34 encontra-se o estudo de repetibilidade de duas amostras realizado para a gama baixa.

Tabela 7.34- Estudo de Repetibilidade na gama baixa CQO – [5-60] mg/LO₂ - LCK 1414

LCK 1414 [5-60] mg/L O ₂	Amostra 1		Amostra 2	
	Concentração (X) (mg/L O ₂)	X _i -X _{i-1}	Concentração (X) (mg/L O ₂)	X _i -X _{i-1}
Nº Ensaio				
1	21,4	-	38,5	-
2	21,7	0,3	37,6	0,9
3	21,5	0,2	37,3	0,3
4	20,0	1,5	37,5	0,2
5	21,2	1,2	39,2	1,7
6	21,2	0,0	37,5	1,7
7	19,8	1,4	37,3	0,2
8	19,9	0,1	37,6	0,3
9	21,1	1,2	37,6	0,0
10	20,8	0,3	37,7	0,1
Média (mg/L O₂)	20,9		37,8	
Variância (mg/L O₂)²	0,5		0,4	
Desvio Padrão (mg/L O₂)	0,7		0,6	
%CV	3,4%		1,6%	
Limite repetibilidade (r)	2,0		1,7	

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Na tabela 7.35 e 7.36 encontra-se o estudo de repetibilidade de duas amostras realizado para a gama intermédia e alta respetivamente.

Tabela 7.35 - Estudo de Repetibilidade na gama intermédia CQO – [15-150] mg/LO₂ - LCK 314

LCK 314 [15-150] mg/L O₂	Amostra 1	
Nº Ensaio	Concentração (X) (mg/L O₂)	 X_i-X_{i-1}
1	53,9	-
2	50,6	3,3
3	54,7	4,1
4	52,6	2,1
5	54,8	2,2
6	56,3	1,5
7	49,0	7,3
8	49,4	0,4
9	50,1	0,7
10	50,2	0,1
Média (mg/L O₂)	52,2	
Variância (mg/L O₂)²	6,9	
Desvio Padrão (mg/L O₂)	2,6	
%CV	5,0%	
Limite repetibilidade (r)	7,3	

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Tabela 7.36 - Estudo de Repetibilidade na gama alta CQO – [100-2000] mg /L O₂- LCK 1014

LCK 1014 [100-2000] mg/L O₂	Amostra 1	
Nº Ensaio	Concentração (X) (mg/L O₂)	 X_i-X_{i-1}
1	425,0	-
2	399,0	26,0
3	382,0	17,0
4	394,0	12,0
5	380,0	14,0
6	373,0	7,0
7	384,0	11,0
8	386,0	2,0
9	384,0	2,0
10	387,0	3,0
Média (mg/L O₂)	389,4	
Variância (mg/L O₂)²	207,6	
Desvio Padrão (mg/L O₂)	14,4	
%CV	3,7%	
Limite repetibilidade (r)	40,3	

Dado ter-se verificado que o ensaio 1, da repetibilidade da amostra pertencente à gama [100-2000] mg/L O₂ se afastava do valor médio optou-se por avaliar a repetibilidade com um teste de Grubbs e averiguar se se confirmava a suspeita. Da sua aplicação conclui-se que o ponto superior é de facto *outlier* como se verifica na tabela 7.37, G_p é superior ao valor tabelado.

Tabela 7.37 – Verificação do ponto superior e inferior – repetibilidade gama [100-2000] mg/L O₂

Ponto Testado:	373 mg/L O ₂	425 mg/L O ₂
G _p =	1,14	2,47
G _{tabelado (5%)} =	2,29	

Posto isto, retirou-se do estudo de repetibilidade o ponto 425 mg/L O₂ agora usando só 9 valores, apresenta-se a tabela 7.38.

Tabela 7.38 – Repetibilidade Amostra 1 sem *outlier* – [100-2000] mg/L O₂

LCK 1014 [100-2000] mg/L O ₂	Amostra 1	
Nº Ensaio	Concentração (X) (mg/L O ₂)	X _i -X _{i-1}
1	399,0	-
2	382,0	17,0
3	394,0	12,0
4	380,0	14,0
5	373,0	7,0
6	384,0	11,0
7	386,0	2,0
8	384,0	2,0
9	387,0	3,0
Média (mg/L O₂)	385,4	
Variância (mg/L O₂)²	57,5	
Desvio Padrão (mg/L O₂)	7,6	
%CV	2,0%	
Limite repetibilidade (r)	21,2	

Conclusões análise repetibilidade de amostras:

- A repetibilidade em todas as gamas estudadas encontra-se dentro dos parâmetros normais através da avaliação do coeficiente de variação. Uma vez que o coeficiente obtido foi sempre inferior a 10% nos casos estudados.
- A avaliação da repetibilidade através do limite de repetibilidade, r também permite concluir que o valor absoluto entre dois ensaios, considerando um nível de confiança de 95% é sempre inferior aos limites de repetibilidade, r obtidos.
- Em relação à gama alta verifica-se que se teve um *outlier* na repetibilidade de 10 ensaios, por isso fez-se a mesma usando só 9 ensaios e respondeu muito bem aos critérios de coeficiente de variação, sendo este inferior a 10%.
- Convém depois fazer análise a amostras, mas em condições de precisão intermédia.

7.1.6 Exatidão

Materiais de Referência Certificados

Os materiais de referência certificados são soluções preparadas e devidamente certificadas, servindo assim como uma referência para o laboratório. O MRC utilizado durante este estudo está identificado na tabela 7.39.

Tabela 7.39 – Identificação do MRC para CQO

Identificação do Material de Referência Certificado	
Marca:	MERCK
Lote:	HC55529732
Prazo Validade:	2018
MRC:	996 ± 11 mg/L O ₂

Para efetuar a análise aos valores obtidos pelo laboratório e os MRC recorre-se a alguns critérios de avaliação, enunciados no capítulo da validação do presente trabalho, nomeadamente erro relativo e z-score.

LCK 1414 – Gama baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Os valores obtidos para os ensaios em precisão intermédia (dias diferentes) do MRC 996±11mg/L O₂ para a gama [5-60] mg/L O₂, pertencente ao LCK 1414 encontram-se na tabela 7.40. É de salientar que foi feita uma diluição do MRC de aproximadamente 33,3.

Tabela 7.40 – Análise do MRC 996 ± 11 mg/L O₂ na gama [5-60] mg/L O₂

Dia	Valor Obtido Lab. MRC (mg/L O ₂)	Valor solução diluída MRC (mg/L O ₂)	Valor Final MRC (mg/L O ₂)	% Erro Relativo	C.A. (15%)	Z-score	Avaliação Z-score
1	29,4	29,880	980,0	-1,6%	Aceite	0,342	Satisfatório
2	31,2	29,880	1040,0	4,4%	Aceite	0,941	Satisfatório
3	29,7	29,880	990,0	-0,6%	Aceite	0,128	Satisfatório
4	31,8	29,880	1060,0	6,4%	Aceite	1,368	Satisfatório
5	32,8	29,880	1093,3	9,8%	Aceite	2,081	Questionável
6	32,4	29,880	1080,0	8,4%	Aceite	1,796	Satisfatório
Média	31,2		1040,6	4,5%			
Desvio Padrão	1,4		46,8	4,7%			
%CV	4,5%		4,5%	-			

Da análise da tabela 7.40 pode concluir-se que, dos 6 MRC realizados em condições de precisão intermédia (dias diferentes), estes se encontram dentro dos limites estabelecidos para a percentagem de erro relativo. Sendo esta sempre inferior ao critério de aceitação imposto pelo laboratório de 15%.

Na tabela encontram-se também os valores que depois de lidos no equipamento foram ajustados ao valor de referência do certificado do MRC, por um fator de diluição associado.

Porém, para além da avaliação dos MRC através do erro relativo pode também fazer-se uma avaliação dos MRC através do cálculo do z-score. Contudo, esta abordagem não é obrigatória sendo apenas mais uma alternativa e uma submissão dos dados laboratoriais a mais um critério de controlo de qualidade da exatidão do método.

Os valores são todos aceites para os 6 MRC avaliados, apesar do valor 2,08 ser questionável, este valor corresponde ao MRC 1093,3 mg/L O₂ onde se obteve o maior erro relativo do conjunto de ensaios apresentado. Não obstante, conclui-se que as duas abordagens apresentadas são concordantes.

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Os valores obtidos para os ensaios em precisão intermédia (dias diferentes) do MRC 996 ± 11 mg/L O₂, para a gama [15-150] mg/L O₂, pertencente ao LCK 314 encontram-se na tabela 7.41. É de salientar que foi feita uma diluição do MRC de aproximadamente 33,3.

Tabela 7.41 - Análise do MRC 996 ± 11 mg/L O₂ na gama [15-150] mg/L O₂

Dia	Valor Obtido Lab. MRC (mg/L O ₂)	Valor solução diluída MRC (mg/L O ₂)	Valor Final MRC (mg/L O ₂)	% Erro Relativo	C.A. (15%)	Z-score	Avaliação Z-score
1	34,0	29,880	1133,3	13,8%	Aceite	1,591	Satisfatório
2	30,6	29,880	1020,0	2,4%	Aceite	0,278	Satisfatório
3	30,0	29,880	1000,0	0,4%	Aceite	0,046	Satisfatório
4	27,1	29,880	903,3	-9,3%	Aceite	1,074	Satisfatório
5	26,4	29,880	880,0	-11,6%	Aceite	1,344	Satisfatório
6	26,0	29,880	866,7	-13,0%	Aceite	1,499	Satisfatório
7	31,5	29,880	1050,0	5,4%	Aceite	0,626	Satisfatório
8	29,8	29,880	993,3	-0,3%	Aceite	0,031	Satisfatório
9	28,9	29,880	963,3	-3,3%	Aceite	0,379	Satisfatório
Média	29,4		978,9	-1,7%			
Desvio Padrão	2,6		86,3	8,7%			
%CV	8,8%		8,8%	-			

Da análise da tabela 7.41 pode concluir-se que os 9 MRC realizados estes se encontram dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório para a percentagem de erro relativo (15%). Na mesma tabela apresentam-se também os valores que depois de lidos no equipamento foram ajustados ao valor de referência do certificado do MRC, por um fator de diluição associado.

A gama intermédia de [15-150] mg/L O₂ cumpre também com o critério de aceitação de 10% para a percentagem do coeficiente de variação (%CV).

Nesta gama à semelhança da gama anteriormente estudada também se avaliaram os MRC através do cálculo do z-score, apesar desta abordagem não ser obrigatória é mais uma alternativa

e uma submissão dos dados laboratoriais a um critério de controlo de qualidade da exatidão do método.

Os valores são todos satisfatórios para os 9 MRC avaliados, porque se encontram inferiores a 2. Embora também se possa verificar que o z-score maior assume o valor de 1,591 correspondente ao MRC 1133,3 mg/L, onde também se obteve um maior erro relativo, de 13,8%. Pelo que se conclui que as duas abordagens apresentadas são concordantes.

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Os valores obtidos para os ensaios em precisão intermédia (dias diferentes) do MRC 996 ± 11 mg/L O₂, para a gama [100-2000] mg/L O₂, pertencente ao LCK 1014 encontram-se na tabela 7.42. É de salientar que foi feita uma diluição do MRC de 2.

Tabela 7.42 - Análise do MRC 996 ± 11 mg/L O₂ na gama [100-2000] mg/L O₂

Dia	Valor Obtido Lab. MRC (mg/L O ₂)	Valor solução diluída MRC (mg/LO ₂)	Valor Final MRC (mg/L O ₂)	% Erro Relativo	C.A. (15%)	Z-score	Avaliação Z-score
1	514	498,000	1028	3,2%	Aceite	0,951	Satisfatório
2	536	498,000	1072	7,6%	Aceite	2,260	Questionável
3	566	498,000	1132	13,7%	Aceite	4,044	Insatisfatório
4	526	498,000	1052	5,6%	Aceite	1,665	Satisfatório
5	524	498,000	1048	5,2%	Aceite	1,546	Satisfatório
6	527	498,000	1054	5,8%	Aceite	1,725	Satisfatório
7	522	498,000	1044	4,8%	Aceite	1,427	Satisfatório
8	510	498,000	1020	2,4%	Aceite	0,714	Satisfatório
9	514	498,000	1028	3,2%	Aceite	0,951	Satisfatório
Média	526,6		1053,1	5,7%			
Desvio Padrão	16,8		33,6	3,4%			
%CV	3,2%		3,2%	-			

Da análise da tabela 7.42 pode concluir-se que os 9 MRC realizados, todos se encontram dentro dos limites estabelecidos para a percentagem de erro relativo. Sendo esta sempre inferior ao critério de aceitação imposto de 15%.

Na mesma tabela apresentam-se também os valores que depois de lidos no equipamento foram ajustados ao valor de referência do certificado do MRC, por um fator de diluição associado. A gama alta de [100-2000] mg/L O₂ cumpre também com os critérios de aceitação de 10% para a percentagem do coeficiente de variação (%CV), o que pode ser constatado pela tabela 7.42. À semelhança do que se fez para as outras gamas, também nesta se submeteram os MRC à avaliação através do cálculo do z-score.

Pela tabela 7.42, verifica-se que os valores de z-score obtidos, para os MRC 500 mg/L O₂ (preparados a partir do MRC 996±11mg/L O₂) realizados na gama alta são todos satisfatórios excetuando-se dois casos. Desses dois casos, um é questionável e outro insatisfatório. Ambos os

z-scores com avaliação menos satisfatória são os correspondentes aos MRC com maior erro relativo. Pelo que se conclui que ambas as análises realizadas aos MRC são concordantes.

Testes de Recuperação

Nos testes de recuperação analisam-se duas tomas da mesma amostra, sendo que numa delas se adicionou uma quantidade conhecida de analito. Neste estudo utilizou-se o hidrogenofalato de potássio para fazer a fortificação das amostras, com concentração específica para cada gama. A adição não deve provocar uma diluição da amostra superior a 1%, de forma a evitar influências no caso em que as amostras precisem de ser diluídas. O critério de aceitação é definido pelo próprio laboratório sendo que para os ensaios de recuperação, de cada gama, este se encontra no intervalo entre 80 e 120%.

LCK 1414 – Gama baixa CQO [5-60] mg/L O₂

A tabela 7.43 apresenta os resultados obtidos para ensaios de recuperação com analito realizados no processo de validação da gama baixa do método de CQO, correspondente ao LCK 1414.

Tabela 7.43 – Recuperação de Amostras na gama baixa de CQO – [5-60] mg/L O₂

Código Amostra	Conc. Amostra (mg/L O₂)	Amostra Reforçada (mg/L O₂)	% Recuperação	C.A. (80-120%)
1	21,5	30,8	95%	Aceite
2	19,7	29,9	104%	Aceite
3	19,7	30,9	114%	Aceite
4	23,8	32,2	86%	Aceite
5	21,0	30,1	93%	Aceite
6	18,7	28,4	99%	Aceite
7	19,3	27,4	83%	Aceite
8	19,8	28,7	91%	Aceite
9	15,8	26,6	110%	Aceite
10	28,0	36,2	84%	Aceite
11	9,9	19,3	96%	Aceite
12	27,3	37,3	102%	Aceite
13	23,9	33,0	93%	Aceite
Média	20,7	30,1	96%	-
Desvio Padrão	4,7	4,5	-	-

Os resultados das 13 recuperações realizadas em condições de precisão intermédia (dias diferentes), na gama baixa de CQO indicam que:

- Das 13 recuperações realizadas nenhuma se encontra fora do critério de aceitação para recuperações considerado pelo laboratório entre 80-120%;
- Perante os resultados obtidos a recuperação média é de 96%, o que é indicativo da existência de uma boa recuperação para a gama em estudo;
- Através dos resultados obtidos é possível afirmar que o método em validação é exato.

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

A tabela 7.44 apresenta os resultados obtidos para ensaios de recuperação com analito realizados no processo de validação da gama intermédia do método de CQO, correspondente ao LCK 314.

Tabela 7.44 - Recuperação de Amostras na gama intermédia de CQO – [15-150] mg/L O₂

Código Amostra	Conc. Amostra (mg/L O₂)	Amostra Reforçada (mg/L O₂)	% Recuperação	C.A. (80-120%)
1	20,0	39,2	100%	Aceite
2	23,5	35,8	64%	Não Aceite
3	35,6	56,7	110%	Aceite
4	17,7	41,2	122%	Não Aceite
5	91,4	101,0	50%	Não Aceite
6	49,5	65,6	84%	Aceite
7	23,8	39,2	80%	Aceite
8	41,3	57,5	84%	Aceite
9	16,6	44,0	142%	Não Aceite
10	69,2	81,0	62%	Não Aceite
11	51,7	63,8	63%	Não Aceite
12	51,4	68,5	89%	Aceite
13	38,3	64,6	137%	Não Aceite
Média	36,9	54,5	91%	-
Desvio Padrão	13,0	12,7	-	-

Os resultados das 13 recuperações realizadas em condições de precisão intermédia (dias diferentes), na gama intermédia de CQO indicam que:

- 6 encontram-se dentro do critério de aceitação para recuperações considerado pelo laboratório (80-120%);
- Perante os resultados obtidos a recuperação média é de 91%, o que é indicativo da existência de uma recuperação razoável para a gama em estudo;
- Contudo, dada a existência de algumas recuperações não aceites seria importante analisarem-se futuramente amostras fortificadas em repetibilidade ou fazerem-se curvas de adição padrão para perceber os efeitos de matriz.

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

A tabela 7.45 apresenta os resultados obtidos para ensaios de recuperação com analito realizados no processo de validação da gama alta do método de CQO, correspondente ao LCK 1014.

Tabela 7.45 - Recuperação de Amostras na gama alta de CQO – [100-2000] mg/L O₂ – LCK 1014

Código Amostra	Conc. Amostra (mg/L O₂)	Amostra Reforçada (mg/L O₂)	% Recuperação	C.A. (80-120%)
1	365,5	598,0	82%	Aceite
2	158,0	429,0	96%	Aceite
3	350,0	626,0	98%	Aceite
4	302,0	570,0	95%	Aceite
5	385,0	598,0	75%	Não Aceite
6	451,0	663,0	75%	Não Aceite
7	568,0	783,0	76%	Não Aceite
8	189,0	460,0	96%	Aceite
9	400,0	642,0	86%	Aceite
10	277,0	548,0	96%	Aceite
11	239,0	468,0	81%	Aceite
Média	285,1	542,6	91%	-
Desvio Padrão	85,9	81,0	-	-

Os resultados das 11 recuperações realizadas em condições de precisão intermédia (dias diferentes), na gama intermédia de CQO indicam que:

- Das 11 recuperações realizadas 3 encontram-se fora do critério de aceitação para recuperações considerado pelo laboratório (80-120%);
- Perante os resultados obtidos a recuperação média é de 91%, o que é indicativo da existência de uma boa recuperação para a gama em estudo;
- Contudo, dada a existência de algumas recuperações não aceites seria importante analisarem-se futuramente amostras fortificadas em repetibilidade ou fazerem-se curvas de adição padrão para perceber os efeitos de matriz.

Conclusões da análise das recuperações:

Em suma, depois de uma análise das tabelas 7.43, 7.44 e 7.45 verifica-se que as percentagens de recuperação obtidas para o método em causa são satisfatórias, uma vez que as percentagens de recuperação se encontram dentro do intervalo aceitável.

Comparação do Método Clássico com o Micro Método

Ao longo do processo de validação do micro método foram analisadas amostras reais em simultâneo utilizando o método a validar e o já validado. Assim, os valores obtidos nos ensaios com os *kits* foram comparados com o método clássico de análise de CQO.

Apesar de, nunca ter sido intenção quer deste trabalho, quer do laboratório fazer a validação por este caminho de comparação dos métodos, o método clássico foi tido sempre como uma referência e uma linha orientadora. Visto também a norma ISO 15705:2002 referir que foram realizados testes em que há uma comparação com o método da ISO 6060:1989, muito embora essa correlação seja afetada pela obtenção ou não de uma quantidade de amostra representativa no micro método e pela gama do método clássico ser mais pequena [75].

LCK 1414 – Gama baixa CQO [5-60] mg/L O₂

Na tabela 7.46 encontram-se os resultados de 8 amostras analisadas quer pelo método dos *kits*, quer pelo método de referência (ISO 6060:1989).

Tabela 7.46 - Dados obtidos para comparação de método de referência CQO com LCK 1414

	Método <i>Kits</i>	Método Referência (ISO 6060:1989)			
Código Amostra	Concentração (mg/L O ₂)	Concentração (mg/L O ₂)		Recuperação (%)	% Erro Relativo
1	21,0	≤LQ	26,1*	81%	-19%
2	22,4	≤LQ	28,0*	80%	-20%
3	19,6	≤LQ	26,0*	75%	-25%
4	19,8	≤LQ	25,0*	79%	-21%
5	28,5		36,9	77%	-23%
6	23,9		30,3	79%	-21%
7	19,1	≤LQ	22,7*	84%	-16%
8	22,3		31,4	71%	-29%
Média	22,1		28,3	78%	-22%

*Valores abaixo do LQ do método de referência (30 mg/L O₂)

Para fazer a comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos, estes são avaliados por uma equação do tipo $y=b.x+a$, como demonstrado na figura 7.29. Nesta figura os pontos a laranja correspondem aos valores abaixo do LQ no método clássico (de referência).

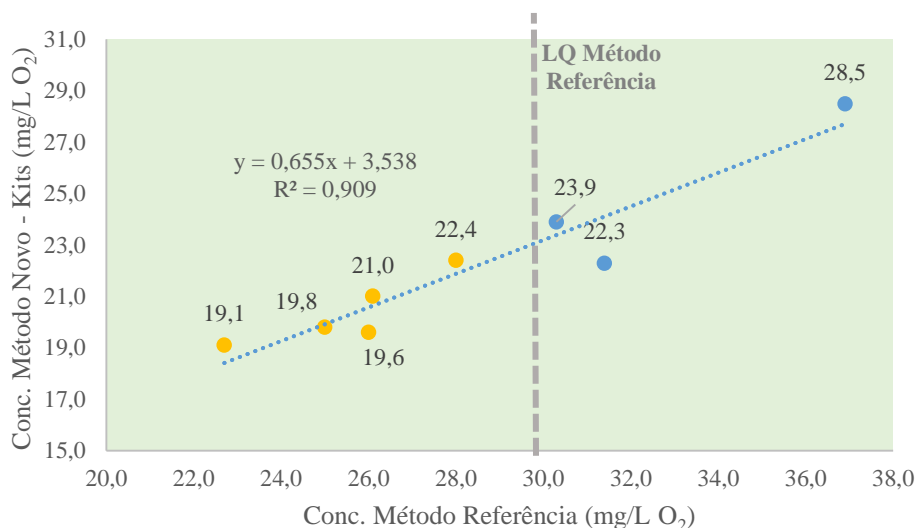


Figura 7.29 - Comparação Método *Kits* (LCK 1414) e Método ISO 6060:1989

Como referido anteriormente devem ser verificadas duas condições simultaneamente:

- 1) Intervalo de confiança associado à ordenada na origem ($a \pm S_a.t$) deve conter o valor zero;
- 2) Intervalo de confiança associado ao declive ($b \pm S_b.t$) deve conter o valor um 1.

Para esta gama os resultados encontram-se na tabela 7.47.

Tabela 7.47 – Resumo Resultados para determinação dos intervalos de confiança

a	3,54	
b	0,66	
S_a	2,42	
S_b	0,08	
t_(95%; N-2)	2,45	
	Limite Inferior	Limite Superior
a	-2,37	9,45
b	0,45	0,86

Tendo em consideração os resultados obtidos e as condições impostas verifica-se que a condição 1) é confirmada e a 2) não é confirmada. Por outro lado, o coeficiente de determinação não é satisfatório, como se pode verificar na figura 7.29. Estes resultados podem ser explicados, visto as amostras testadas apresentarem na sua maioria concentrações abaixo do LQ do método de referência (30 mg/L O₂), não tendo os valores obtidos a precisão e exatidão necessárias. Por isso, esta comparação deverá ser realizada com maior número de amostras, com concentrações superiores a 30 mg/L O₂.

Por essa razão não é possível fazer uma comparação estatística entre dois métodos devido ao método clássico ter um LQ de 30 mg/L O₂ e a gama dos *kits* em estudo ser de [5-60] mg/L O₂.

LCK 314 – Gama intermédia CQO [15-150] mg/L O₂

Na tabela 7.48 encontram-se os resultados de 8 amostras analisadas quer pelo método dos *kits*, quer pelo método de referência.

Tabela 7.48 - Dados obtidos para comparação de método de referência CQO com LCK 314

	Método <i>Kits</i>	Método Referência (ISO 6060:1989)		
Código Amostra	Concentração (mg/L O ₂)	Concentração (mg/L O ₂)	Recuperação (%)	% Erro Relativo
1	36,5	47,2	77,3%	-23%
2	91,4	97,8	93,5%	-7%
3	49,5	69,8	70,9%	-29%
4	41,3	50,0	82,6%	-17%
5	69,0	82,2	83,9%	-16%
6	52,9	58,4	90,6%	-9%
7	53,6	69,8	76,7%	-23%
8	38,3	58,6	65,4%	-35%
Média	56,1	66,7	79,6%	-20%

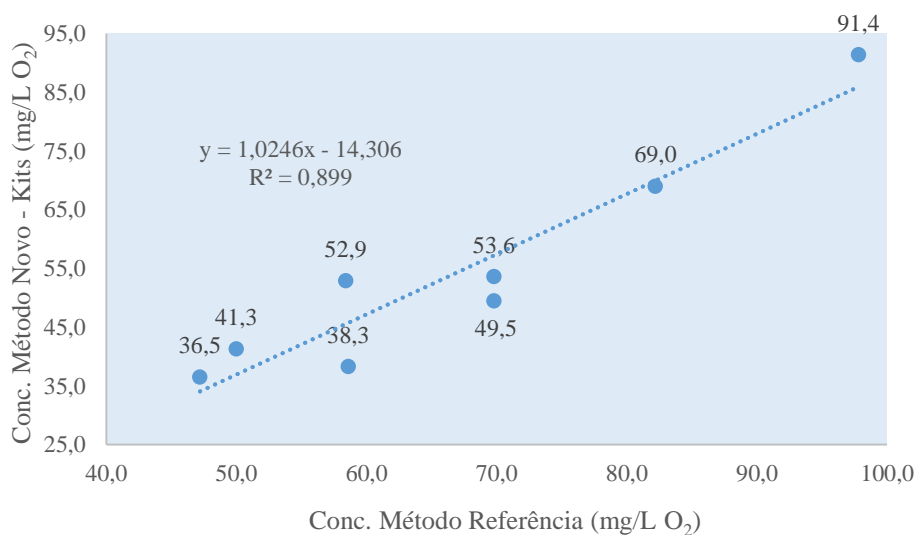


Figura 7.30- Comparação Método Kits (LCK 314) e Método ISO 6060:1989

Encontram-se na tabela 7.49 os resultados de forma a verificar se são cumpridas as duas condições: do declive e da ordenada na origem, para esta gama.

Tabela 7.49 – Resumo Resultados para determinação dos intervalos de confiança

a	-14,31	
b	1,02	
S _a	9,62	
S _b	0,14	
t _(N-2)	2,45	
	Limite Inferior	Limite Superior
a	-37,84	9,23
b	0,68	1,37

Tendo em consideração os resultados apresentados na tabela 7.50 e as condições impostas verifica-se que as mesmas são confirmadas, porque o intervalo de a inclui o valor zero e o intervalo de b inclui o valor 1.

É importante também fazer a comparação através de um teste estatístico t de *student*, apresentado na tabela 7.50.

Tabela 7.50- Comparação do método *kits* e método de referência

Código Amostra	Conc. Método Novo (<i>kits</i>) (y) (mg/L O ₂)	Conc. Método de Referência (x) (mg/L O ₂)	d _i = y _i - x _i (mg/L O ₂)
1	36,5	47,2	-10,7
2	91,4	97,8	-6,4
3	49,5	69,8	-20,3
4	41,3	50,0	-8,7
5	69,0	82,2	-13,2
6	52,9	58,4	-5,5
7	53,6	69,8	-16,2
8	38,3	58,6	-20,3
Média das Diferenças			-12,7
Desvio Padrão das Diferenças			5,9
t_{calculado} (95%;n-1)			-6,12
t_{tabelado} (95%;n-1)			2,36

Depois da aplicação do teste t de *student*, dado por, $t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{s_d}$ verifica-se que o t calculado é igual em valor absoluto a 6,12 sendo superior a 2,36 correspondente ao t tabelado, para 95% e n-1 graus de liberdade. Pelo que se conclui que estatisticamente os métodos CQO baseados na ISO 6060 e nesta gama alta dos *kits* não são semelhantes.

Não foi possível fazer uma comparação entre o método clássico (ISO 6060) e o método dos *kits* em toda a sua gama, [15-150] mg/L O₂, pois o método clássico tem um limite de quantificação de 30 mg/L O₂ o que não permitiu avaliar resultados abaixo deste, por isso não é possível avaliar a exatidão de forma eficiente em toda a gama através da comparação.

LCK 1014 – Gama alta CQO [100-2000] mg/L O₂

Na tabela 7.51 encontram-se os resultados de 10 amostras analisadas quer pelo método dos *kits*, quer pelo método de referência.

Tabela 7.51 – Dados obtidos para comparação de método de referência CQO com LCK 1014

	Método Novo (kits)	Método de Referência (ISO 6060:1989)		
Código Amostra	Concentração (mg/L O ₂)	Concentração (mg/L O ₂)	Recuperação (%)	% Erro Relativo
1	119,0	118,1	100,8%	1%
2	262,5	280,0	93,8%	-6%
3	365,5	360,0	101,5%	2%
4	158,0	166,6	94,8%	-5%
5	350,0	386,2	90,6%	-9%
6	451,0	455,3	99,1%	-1%
7	400,0	430,2	93,0%	-7%
8	1749,5	1893,1	92,4%	-8%
9	304,5	307,0	99,2%	-1%
10	1345,0	1450,4	92,7%	-7%
Média	550,5	584,7	95,8%	-4%

Através da análise dos resultados obtidos indicados na tabela 7.51 é possível observar que os resultados são muito semelhantes tendo em conta os baixos erros relativos, sendo estes sempre inferiores a 10% nos ensaios efetuados.

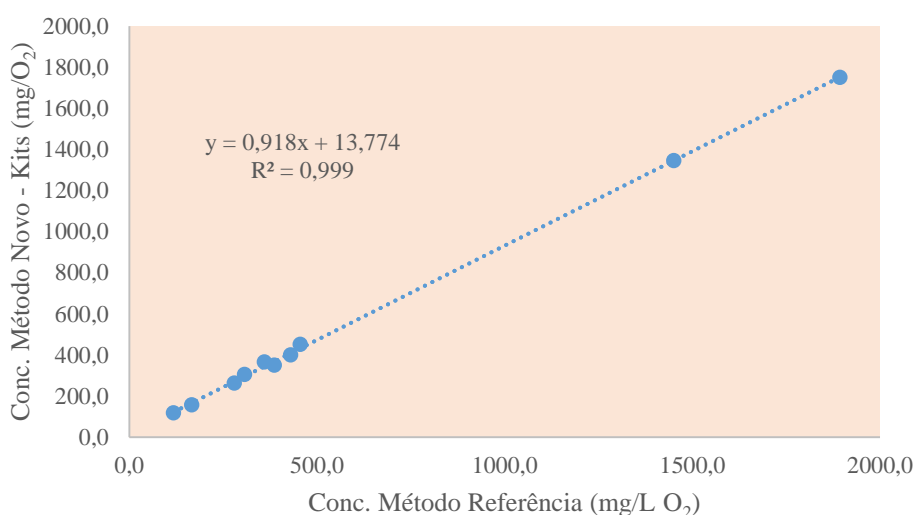


Figura 7.31 – Comparação Método Kits (LCK 1014) e Método ISO 6060:1989

É possível verificar pela figura 7.31 que se obteve uma boa linearidade e que os resultados obtidos pelos dois métodos sobre as mesmas amostras são muito semelhantes, pelo facto do seu declive estar próximo de 1 (declive=0,918).

Tabela 7.52 - Resumo Resultados para determinação dos intervalos de confiança

a	13,77	
b	0,92	
S _a	6,192	
S _b	0,0076	
t _(95%; N-2)	2,31	
	Limite Inferior	Limite Superior
a	-0,51	28,01
b	0,90	0,94

Tendo em consideração os resultados da tabela 7.52 e as condições impostas verifica-se que a condição 1) é confirmada e a 2) apesar de não ser verificada encontra-se próximo de 1.

No entanto, é importante também fazer a comparação dos métodos através de um teste estatístico t de *student*, apresentado na tabela 7.53.

Tabela 7.53 – Comparação do método *kits* e método de referência

Código Amostra	Conc. Método Novo (<i>kits</i>) (y) (mg/L O ₂)	Conc. Método de Referência (x) (mg/L O ₂)	d _i = y _i - x _i (mg/L O ₂)
1	119,0	118,1	0,9
2	262,5	280,0	-17,5
3	365,5	360,0	5,5
4	158,0	166,6	-8,6
5	350,0	386,2	-36,2
6	451,0	455,3	-4,3
7	400,0	430,2	-30,2
8	1749,5	1893,1	-143,6
9	304,5	307,0	-2,5
10	1345,0	1450,4	-105,4
Média das Diferenças			-34,2
Desvio Padrão das Diferenças			50,2
t _{calculado (95%;n-1)}			-2,15
t _{tabelado (95%;n-1)}			2,26

Após aplicação do teste t de *student*, dado por, $t = \frac{\bar{d}\sqrt{n}}{s_d}$ verifica-se que o t calculado é igual em valor absoluto a 2,15, sendo este inferior a 2,26 correspondente ao t tabelado, para 95% e n-1 graus de liberdade. Pelo que se conclui que estatisticamente os métodos CQO baseados na ISO 6060 e nesta gama alta dos *kits* são semelhantes.

7.1.7 Robustez

Apesar de se ter feito referência a este parâmetro de validação na introdução, no caso concreto dos métodos em validação não foi considerado nesta tese dado não haver alteração nenhuma que pudesse ser feita aos mesmos.

7.1.8 Controlo de Qualidade para o Laboratório de Beírolas

Na tabela 7.54 apresenta-se o planeamento do controlo de qualidade interno, este deve ser feito de igual modo para cada uma das gamas de CQO que são usadas pelo laboratório. Depois da fase inicial de validação, o laboratório poderá manter ou ter de redefinir alguns critérios, sempre de maneira a garantir que as condições de validade do método se mantêm.

Tabela 7.54 - Plano Controlo de Qualidade Interno

Controlo de Qualidade Interno (CQI)		
Tipo Controlo	Critério Aceitação	Periodicidade
Curva Calibração (Linearidade)	Coefficiente correlação da curva: $-1 \leq r \leq 1$ Teste estatístico Mandel: ($F_{obtido} \leq F_{tabelado}$)	Na mudança de lote; E sempre que houver uma atualização do <i>software</i> do fotómetro DR 3900, pela Hach Lange)
Padrões de Controlo	Erro Relativo $\leq 15\%$	2 por cada gama (padrão ao nível LQ e um intermédio)
Precisão (duplicados)	Amplitude Relativa $\leq 17\%$ (5-60 mg/LO ₂) Amplitude Relativa $\leq 20\%$ (15-150 mg/LO ₂) Amplitude Relativa $\leq 15\%$ (100-2000 mg/LO ₂)	Por cada dia de trabalho e por cada gama de trabalho
Exatidão	MRC	Erro Relativo $\leq 15\%$
	Recuperações	$80\% \leq \%Rec \leq 120\%$
Controlo de Brancos	Quando existirem em número suficiente ($n \geq 30$) analisar através de carta de controlo.	Pelo menos 1 por lote de <i>kits</i>

7.1.9 Diagrama de Ishikawa

No seguimento do trabalho foi feito um levantamento das potenciais fontes de incerteza para ambos os métodos espectrofotométricos:

- a incerteza associada à preparação da solução padrão, sendo que esta resulta da incerteza associada à pesagem;
- à pureza do soluto (padrão comercial);
- a incerteza associada à medição do volume para fazer a solução;
- a incerteza associada à toma de amostra para o ensaio face à possibilidade de existência de sólidos em suspensão, dado as amostras se tratarem de águas residuais.

Essas fontes foram consideradas na realização do diagrama de espinha de peixe, representado na figura 7.32.

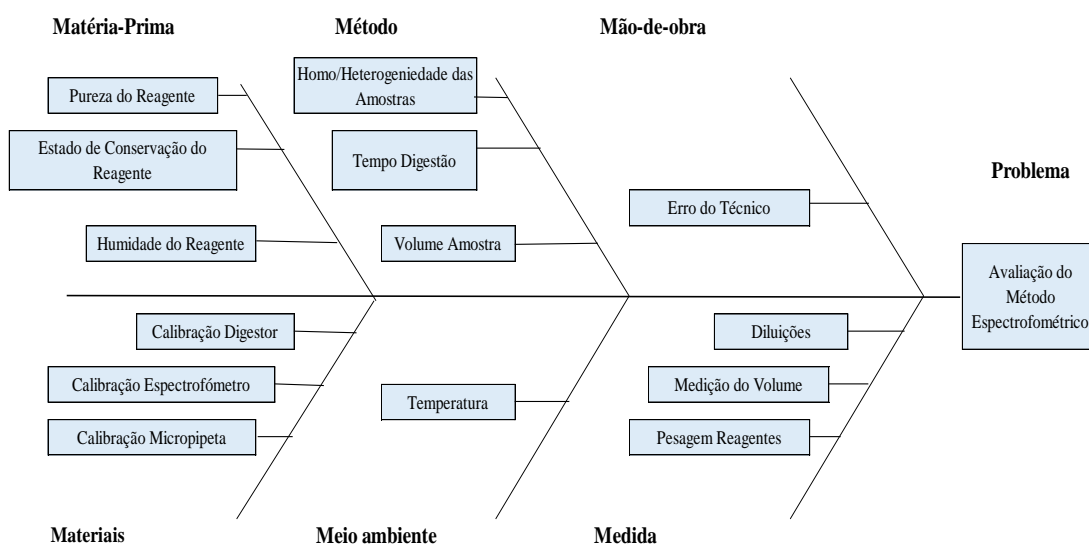


Figura 7.32 – Diagrama de Ishikawa (ou espinha de peixe) – para os métodos espectrométricos

7.1.10 Estudo da Estabilidade dos kits

Depois de se ter seguido o procedimento do CQO de acordo com o descrito no procedimento do fabricante verificou-se que os valores dos padrões lidos no fotómetro DR 3900 variavam o seu valor de modo significativo ao longo do tempo.

Face a este facto no decorrer do processo inicial de validação considerou-se relevante essa questão, visto nem a norma, nem o fabricante indicarem uma referência temporal, optou-se por realizar um estudo da estabilidade dos kits. O intuito foi perceber o comportamento dos kits ao longo do tempo e verificar quando estabilizavam de forma a ter-se uma referência temporal para iniciar as leituras.

Apresenta-se de seguida o padrão 100, 250, 300, 700 e 2000, pertencentes à gama alta do CQO [100-2000] mg/L, na figuras 7.33, 7.34, 7.35, 7.36 e 7.37 respetivamente.

- **PC 100 mg/L O₂**

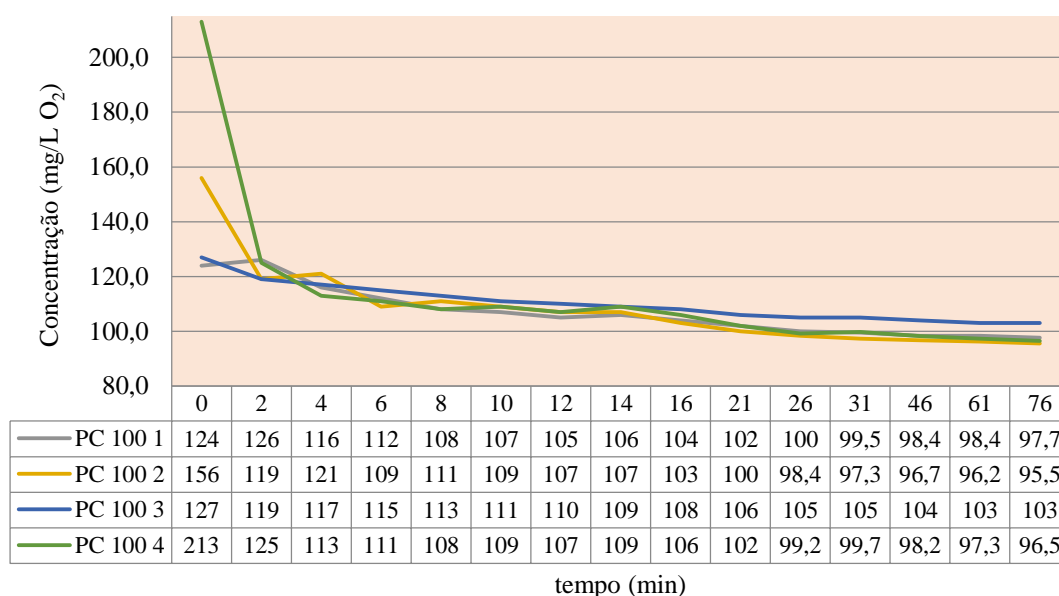


Figura 7.33 – Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 100 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014

• **PC 250 mg/L O₂**

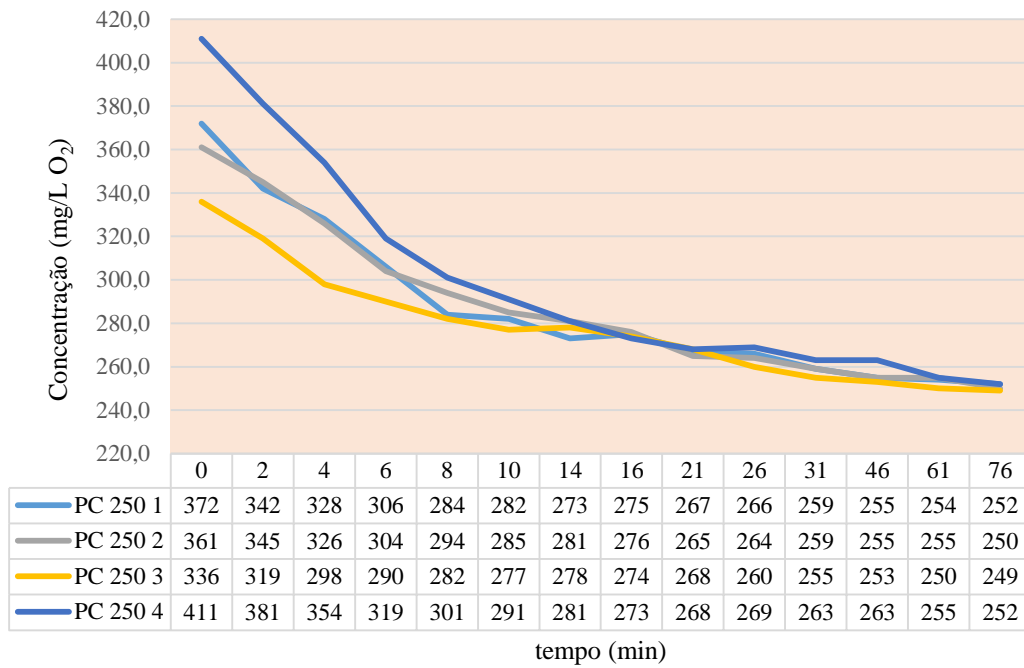


Figura 7.34 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 250 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014

PC 300 mg/L O₂

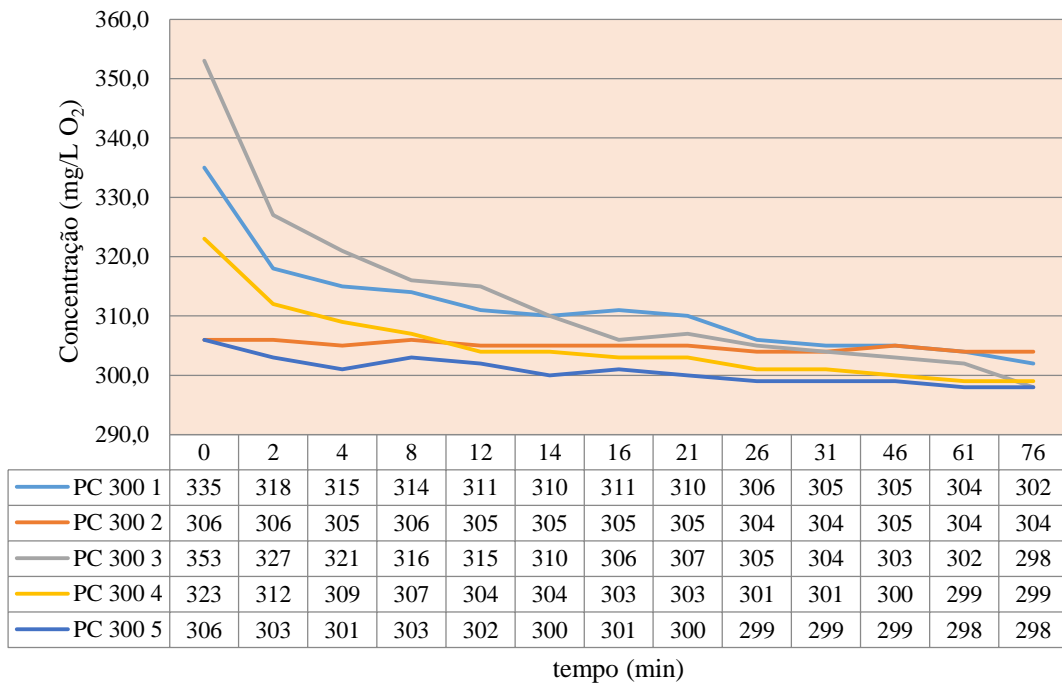


Figura 7.35 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 300 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014

- **PC 700 mg/L O₂**

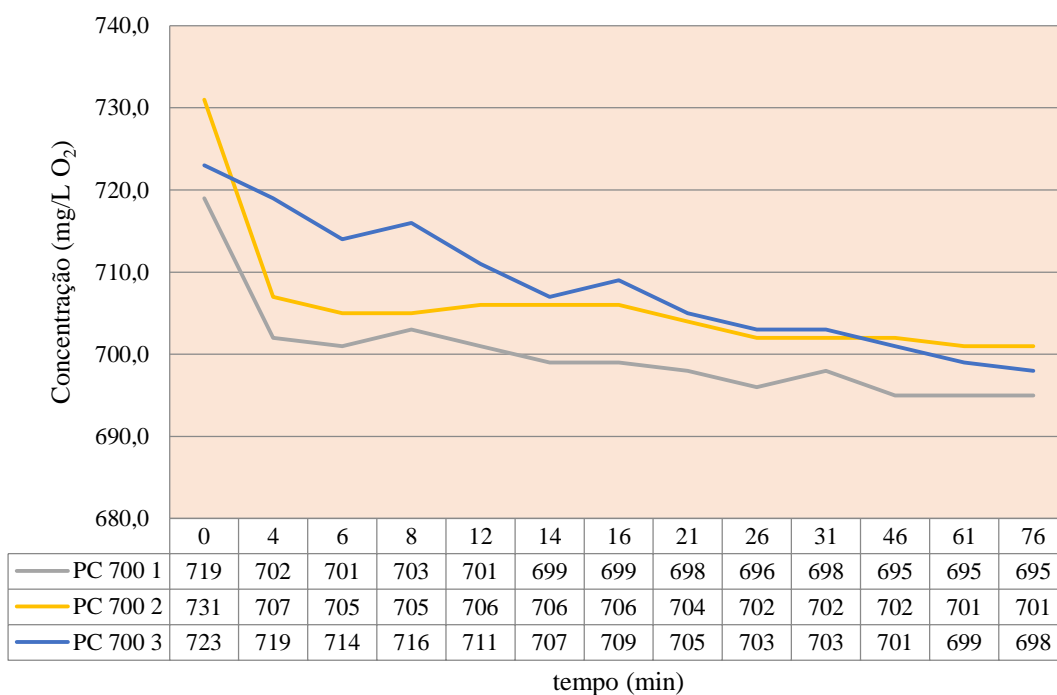


Figura 7.36 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 700 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014

- **PC 2000 mg/L O₂**

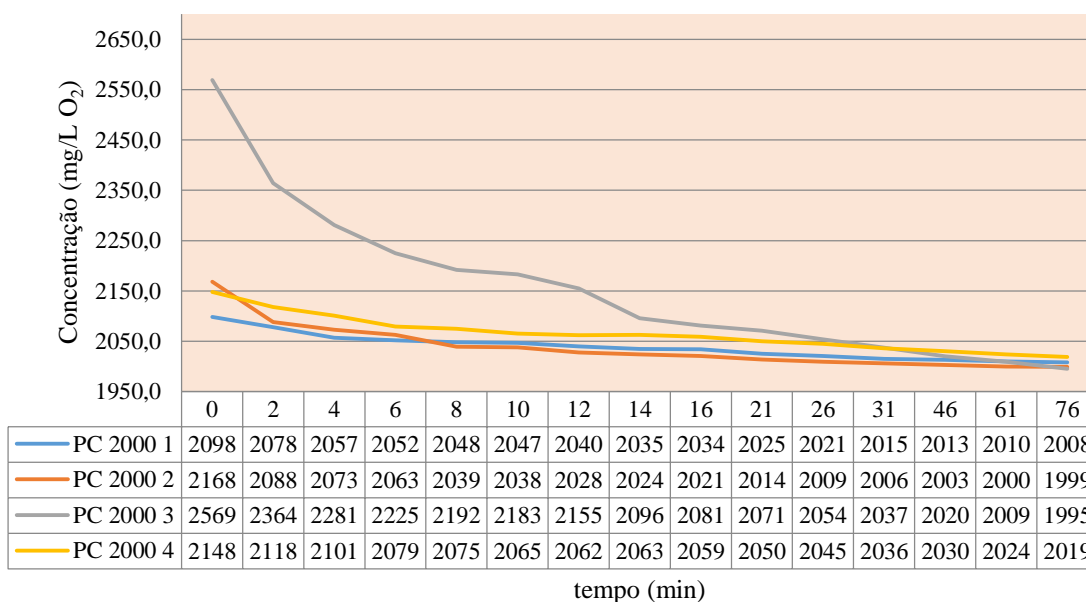


Figura 7.37 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 2000 mg/L – Gama [100-2000] mg/L - LCK 1014

Nas figuras 7.38, 7.39 e 7.40 apresentam-se os estudos efetuados para as gamas intermédia e baixa do CQO, respetivamente.

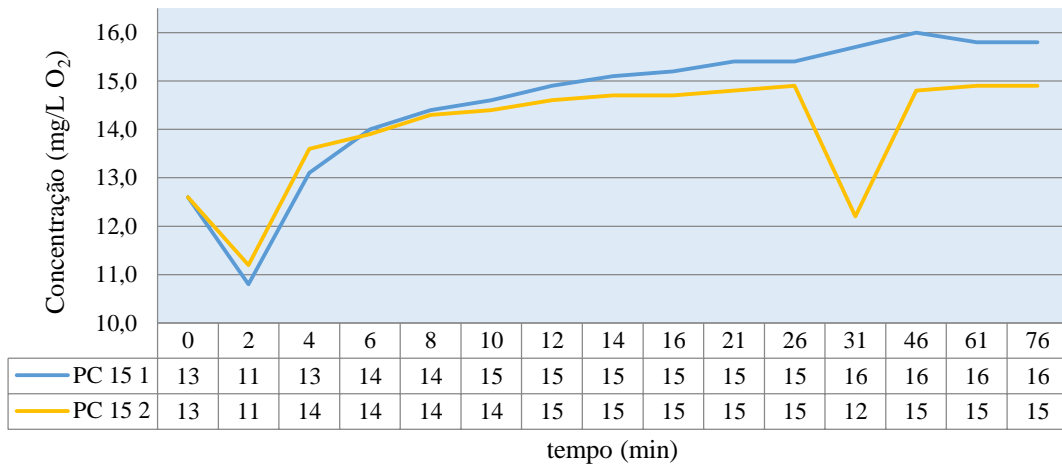


Figura 7.38- Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 15 mg/L – Gama [15-150] mg/L - LCK 314

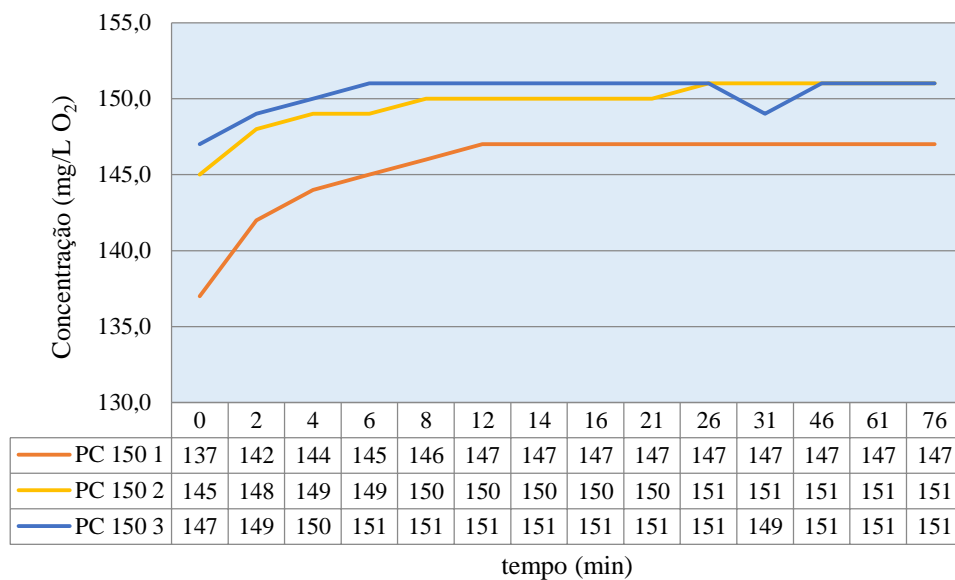


Figura 7.39- Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 150 mg/L – Gama [15-150] mg/L - LCK 314

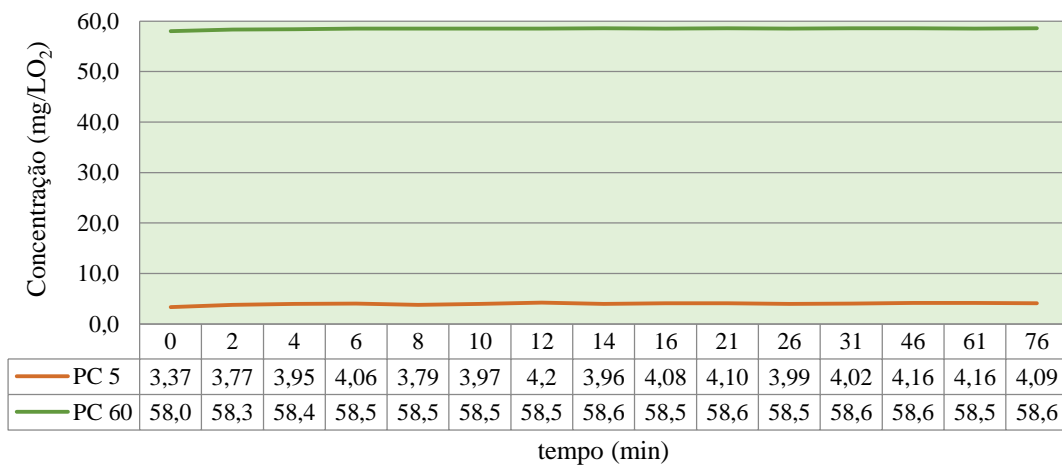


Figura 7.40 - Estudo Estabilidade kits CQO, padrão 5 e 60 mg/L – Gama [5-60] mg/L - LCK 1414

Conclusão:

De facto foram verificadas alterações nos *kits* ao longo do tempo em todas as concentrações analisadas. Posto isto, e uma vez que, é muito importante e prático ter uma referência temporal que permitisse ao técnico fazer uma gestão melhor do seu tempo/trabalho, sem nunca pôr em causa a qualidade dos resultados, tornou-se pertinente esta avaliação.

Deste modo, pelas figuras 7.33 a 7.40, pode concluir-se que só se justifica começar a ler os *kits* ao final de 30 minutos. Este é o tempo mínimo a partir do qual podemos garantir que os *kits* estão estáveis e que as diferenças nas leituras subsequentes não comprometem a credibilidade do resultado reportado ao cliente.

Por exemplo, no padrão de concentração 100 mg/L O₂, se a leitura fosse realizada após arrefecer 15 minutos (tempo 0 nas figuras) ler-se-ia 213 mg/L O₂, passados 30 minutos já se lia 100 mg/L O₂, o que corresponde a um erro de 113%. Mas, se a leitura for efectuada após este tempo as diferenças já não são significativas neste exemplo seriam de 3%.

Para além disso, foram feitos testes de estabilidade com tempos mais prolongados, de várias horas. Concluiu-se que depois dos 30 min, o *kit* se mantinha estável mesmo após várias horas incluindo no dia a seguir.

Isso permite uma maior flexibilidade na análise de CQO por *kit*, que é grandemente afetada pela limitação do número de locais do digestor, que ao serem 12, não permite grande escoamento do trabalho.

Sendo assim o técnico pode efetuar várias digestões seguidas, e depois proceder às leituras do conjunto de amostras do dia.

Para além disso, permite também repetir leituras mesmo no dia a seguir caso haja uma dúvida num resultado (troca de tubo, cruzamento de resultados com outros métodos, histórico do local de colheita, etc.).

7.1.11 Incertezas

Neste subcapítulo da dissertação estimaram-se as incertezas com base nos resultados apresentados na mesma, para que se possa ter uma noção da incerteza associada a cada gama de CQO.

Apresenta-se na tabela 7.55 o resumo da estimativas. Como se pode verificar pela tabela a gama intermédia é a que apresenta a incerteza maior com 22%, segue-se a baixa com 18% e por fim a alta com 16%. Não foram efetuadas as incertezas para cada subgama de trabalho, da gama baixa e alta, uma vez que as gamas de trabalho foram validadas pela ponderada e pelo intervalo de confiança. Convém referir que a incerteza deverá ser recalculada com mais dados a obter posteriormente.

Tabela 7.55 - Estimativa das Incertezas para cada gama CQO

Mensurandas da Estimativa das Incertezas	LCK 1414						LCK 314						LCK 1014					
	[5-60] mg/LO ₂						[15-150] mg/LO ₂						[100-2000] mg/LO ₂					
	n	%CV	Critério Aceitação Duplicados	Média Erro Relativo	Desvio Padrão (erro relativo)	μ`	n	%CV	Critério Aceitação Duplicados	Média Erro Relativo	Desvio Padrão (erro relativo)	μ`	n	%CV	Critério Aceitação Duplicados	Média Erro Relativo	Desvio Padrão (erro relativo)	μ`
Padrão LQ=8mg/LO ₂	10	5,65%				5,65%												
Padrão=15mg/LO ₂	10	4,92%				4,92%	13	8,35%				8,35%						
Padrão=60mg/LO ₂	10	2,83%				2,83%												
Padrão=100mg/LO ₂													13	4,40%				4,40%
Padrão=150mg/LO ₂							13	1,78%				1,78%						
Padrão=300mg/LO ₂													13	3,69%				3,69%
Padrão=2000mg/LO ₂													13	2,82%				2,82%
Duplicados	13		17%			4,77%	10		20%			6,38%	15		15%			3,20%
MRC [996±11]mg/LO ₂	6			4,50%	4,70%	4,92%	9			-1,70%	8,70%	3,41%	9			5,73%	3,38%	5,87%
μ` comb	8,88%						11,05%						8,00%					
μ` exp	18%						22%						16%					

Depois da determinação da incerteza expandida, reuniram-se um conjunto de amostras de cada gama, de forma a demonstrar na tabela 7.56, como é que os resultados devem ser representados e reportados ao cliente. É importante salientar que a incerteza reportada é uma incerteza expandida calculada usando um fator de expansão $k=2$, pelo que permite associar ao resultado um nível de confiança de 95%.

Tabela 7.56 – Expressão dos Resultados Finais para cada gama de trabalho de CQO

LCK 1414 [5-60] mg/L O ₂		LCK 314 [15-150] mg/L O ₂		LCK 1014 [100-2000] mg/L O ₂	
Concentração Amostra (mg/L O ₂)	Resultado Final ($\mu`exp = 18\%$)	Concentração Amostra (mg/L O ₂)	Resultado Final ($\mu`exp = 22\%$)	Concentração Amostra (mg/L O ₂)	Resultado Final ($\mu`exp = 16\%$)
23,4	23,4 ± 4,2 mg/L O ₂	20,4	20,4 ± 4,5 mg/L O ₂	551	551 ± 88 mg/L O ₂
21,0	21,0 ± 3,8 mg/L O ₂	49,5	49,5 ± 10,9 mg/L O ₂	1432	1,4E3 ± 2,3E3 mg/L O ₂
22,4	22,4 ± 4,0 mg/L O ₂	41,3	41,3 ± 9,1 mg/L O ₂	263	263 ± 42 mg/L O ₂
18,8	18,8 ± 3,4 mg/L O ₂	69,2	69 ± 15 mg/L O ₂	158	158 ± 25 mg/L O ₂

7.2 Análise dos Resultados Analíticos – Azoto Total

Começou por se avaliar os resultados obtidos das amostras, nos anos 2015 e 2016, por forma a decidir quais as gamas de azoto mais críticas para trabalhar em rotina.

- Foram avaliadas no período de 2015 a 2016 um total de 504 amostras.
- Deste estudo concluiu-se que os resultados variam entre um valor mínimo 0 mg/L NT e um valor máximo 160 mg/L NT.
- Depois de analisado o limite mínimo e máximo que o laboratório de Beirolas obteve nestes 2 anos, criaram-se gamas de trabalho, de forma a encaixar os resultados, para analisar a frequência de valores em cada uma delas.
- Verificou-se assim quais as gamas de trabalho mais convenientes para o laboratório trabalhar no seu quotidiano, comparando-as depois com as gamas comerciais que o fabricante - Hach Lange® tem disponíveis para este parâmetro.

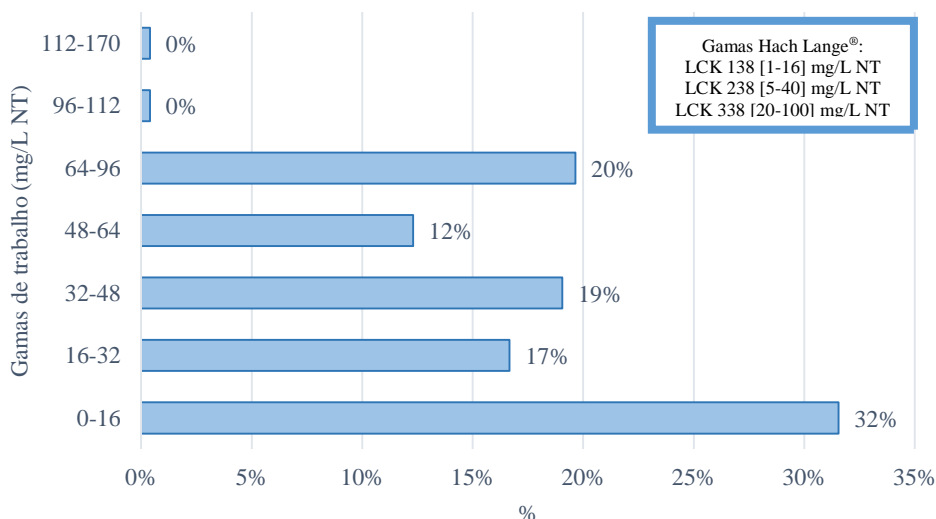


Figura 7.41 – Análise Amostras Laboratório de Beirolas Para definição das gamas de trabalho

Através da análise da figura 7.41 conclui-se que:

- A esmagadora maioria dos resultados (32%) situam-se na gama 0-16 mg/L NT o que corresponde a uma das gamas do fabricante da Hach Lange® – LCK 138.
- Também se pode verificar pela figura 7.41, que cerca de 19% dos resultados estão contidos na gama de 32-48 mg/L NT e 20% na gama de 64-96 mg/L NT. Razão pela qual se optou pelas gamas do fabricante correspondentes ao LCK 238 e 338.

7.2.1 Curvas de Calibração

Linearidade

O processo de validação do azoto iniciou-se com um estudo de linearidade, para tal procedeu-se à execução de curvas de calibração nas gamas de trabalho dos *kits*.

É imprescindível evidenciar que devido à ausência da norma ISO 11905-1:1997, no início dos estudos de validação se começaram por fazer curvas de calibração com padrões de nitrato de potássio tal como as curvas inseridas no espectrofotómetro DR 3900, da Hach Lange®.

LCK 138 [1-16] mg/L NT

1ª Curva Calibração

Tabela 7.57 - Dados Primários da 1ª Curva Calibração LCK 138 – Gama Baixa [1-16] mg/L NT

Concentração Teórica (mg/L NT)	Concentração Lida (mg/L NT) DR 3900	Abs Lida (345 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
1	1,09	0,192	9%
4	4,16	0,351	4%
7	6,39	0,466	-9%
10	10,1	0,659	1%
14	12,8	0,796	-9%
16	15,3	0,926	-4%

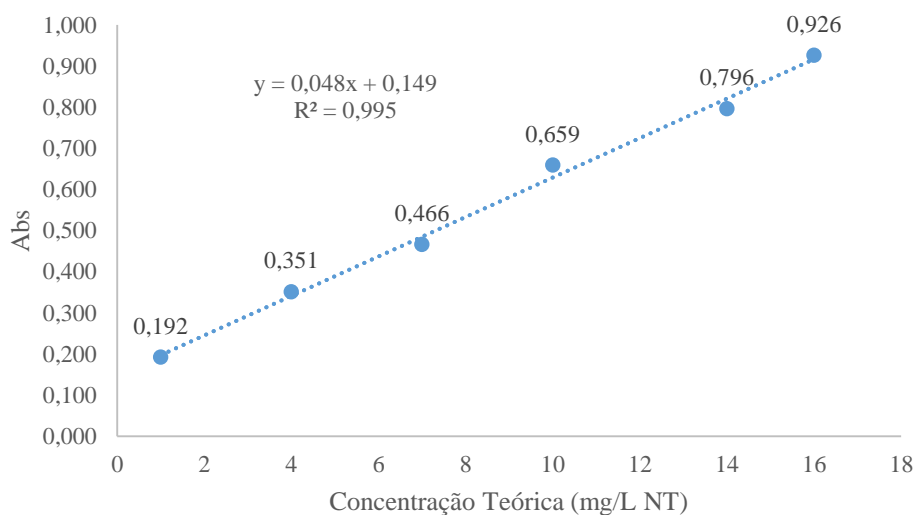


Figura 7.42- Absorvância vs Concentração Teórica – 1ª curva calibração – LCK 138

2ª Curva Calibração

Tabela 7.58 - Dados Primários da 2ª Curva Calibração LCK 138 – Gama Baixa [1-16] mg/L NT

Concentração Teórica (mg/L NT)	Concentração Lida (mg/L NT) DR 3900	Abs Lida (345 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
1	1,01	0,188	1%
2,5	2,34	0,256	-6%
4	4,0	0,343	0%
7	6,0	0,444	-15%
10	9,1	0,607	-9%
14	13,2	0,817	-6%
16	14,0	0,860	-13%

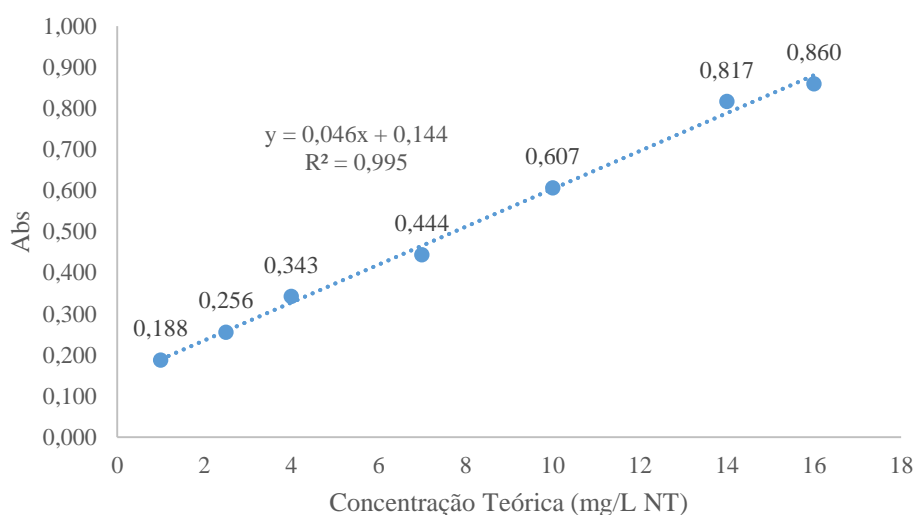


Figura 7.43 – Absorvância vs Concentração Teórica – 2ª curva calibração – LCK 138

3ª Curva Calibração

Tabela 7.59 – Dados Primários da 3ª Curva Calibração LCK 138 – Gama Baixa [1-16] mg/L NT

Concentração teórica (mg/L NT)	Concentração Lida (mg/L NT)	Abs Lida ($\lambda=345$ nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
1	0,98	0,186	-2%
5	5,27	0,408	5%
10	9,49	0,627	-5%
14	14,04	0,856	0%
16	15,9	0,958	-1%

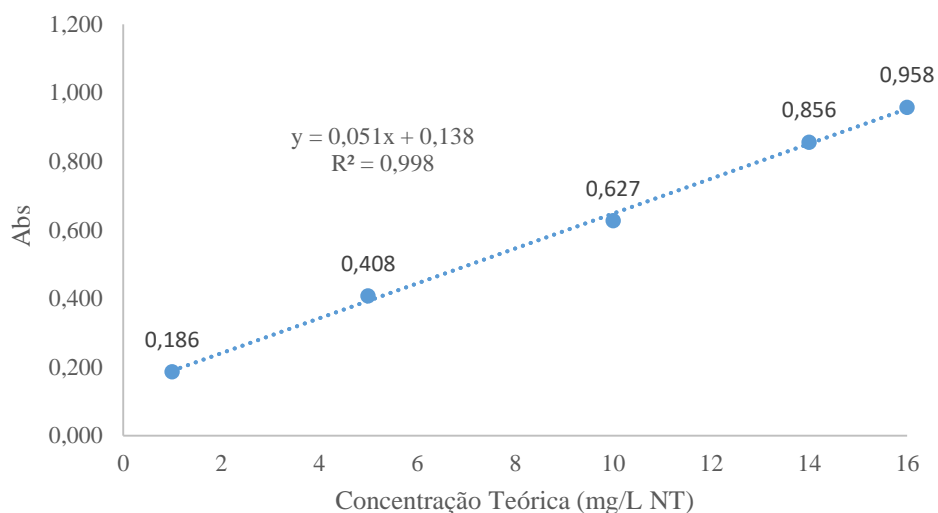


Figura 7.44 – Absorvância vs Concentração Teórica – 3ª curva calibração – LCK 138

LCK 238 [5-40] mg/L NT

Tabela 7.60 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 238 – Gama Intermédia [5-40] mg/L NT

Concentração Teórica (mg/L NT)	Concentração Lida (mg/L NT) DR 3900	Abs Lida (345 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
5	5,2	0,244	-4%
10	9,97	0,343	0%
20	20,5	0,560	-3%
30	29,8	0,751	1%
40	39,3	0,946	2%

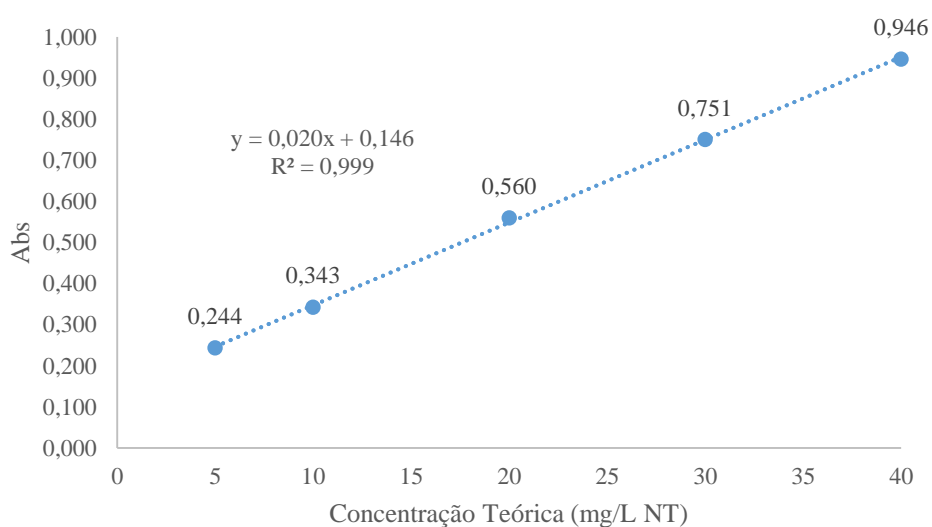


Figura 7.45 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 238

LCK 338 [20-100] mg/L NT

Tabela 7.61 - Dados Primários da Curva Calibração LCK 338 – Gama Alta [20-100] mg/L NT

Concentração Teórica (mg/L NT)	Concentração Lida (mg/L NT) DR 3900	Abs Lida (345 nm)	(%) Erro Relativo (conc. teórica e conc. lida)
20	15,6	0,284	-22%
28	27,9	0,364	0%
44	44,5	0,500	1%
60	56,9	0,601	-5%
68	63,5	0,655	-7%
76	77,1	0,767	1%
84	82,3	0,809	-2%
100	105	0,996	5%

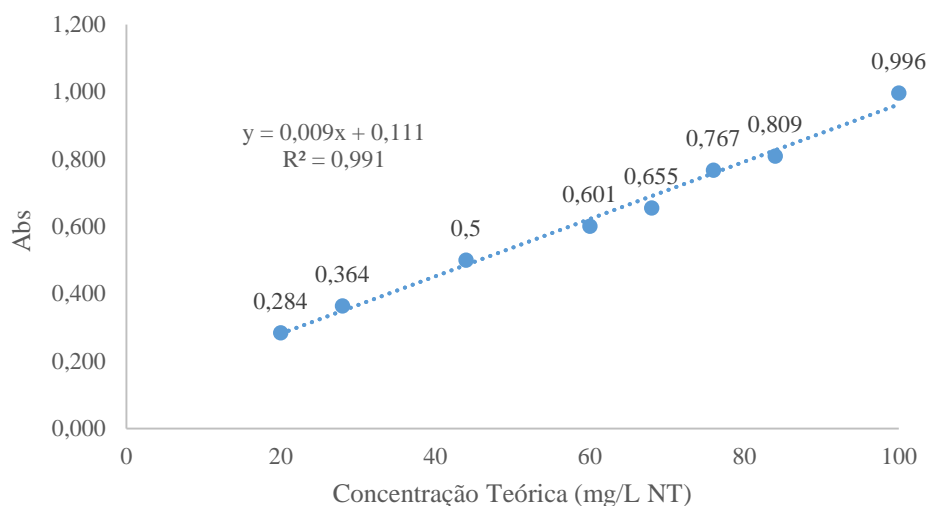


Figura 7.46 - Absorvância vs Concentração Teórica – LCK 338

Os resultados para cada curva para o teste de linearidade são apresentados na tabela 7.68. Através das representações anteriores pode concluir-se que:

- Pelas figuras 7.42, 7.43, 7.44, 7.45 e 7.46, existe uma boa linearidade verificada visualmente e também através da obtenção de coeficientes de determinação (r^2) superiores a 0,990, valor correspondente ao critério de aceitação do coeficiente de correlação ($r \geq 0,995$).

Tabela 7.62 – Resumo das Curvas de Calibração efetuadas para o micro método de NT

Gama Trabalho	Nº Curva Calibração	Nº Pontos Curva	r	r^2	Teste Mandel - Linearidade							
					a	b	S_{y1}	S_{y2}	DS^2	PG	F_{tabelado}	Conclusão
[1-16] mg/L NT	1	6	0,997	0,995	0,149	0,048	0,023	0,026	3,08E-05	0,04	34,12	Melhor Ajuste é Linear
	2	7	0,998	0,995	0,144	0,046	0,020	0,022	1,42E-05	0,03	21,20	Melhor Ajuste é Linear
	3	5	0,999	0,998	0,138	0,051	0,015	0,018	4,89E-05	0,15	98,50	Melhor Ajuste é Linear
[5-40] mg/L NT	1	5	1,000	0,999	0,146	0,020	0,008	0,006	1,17E-04	3,55	98,50	Melhor Ajuste é Linear
[20-100] mg/L NT	1	8	0,995	0,991	0,111	0,009	0,024	0,021	1,47E-03	3,48	16,26	Melhor Ajuste é Linear

7.2.2 Limiares Analíticos

Através da análise das três curvas de calibração, para a gama baixa do azoto total estimaram-se os limiares analíticos. Pode concluir-se pela tabela 7.63, que o limite de quantificação do método poderá ser majorado para 4 mg/L NT. Contudo, pelo facto de estes ensaios serem poucos e terem provavelmente de ser feitos com um padrão orgânico para que também a etapa da digestão possa ser avaliada, o limite de quantificação do método não foi definido, podendo vir a ser alterado.

Tabela 7.63- Determinação dos limiares analíticos do micro método NT

Curva Calibração n°	1	2	3
$S_{x/y}$	0,023	0,020	0,015
Declive	0,048	0,046	0,051
LQ (mg/L NT)	4,8	4,3	3,0
LD (mg/L NT)	1,6	1,4	0,9

Tabela 7.64 - Verificação dos Limiares Analíticos para as gamas intermédia e alta NT

	LCK 238 [5-40]mg/L NT	LCK 338 [20-100]mg/L NT
Curva Calibração n°	1	1
$S_{x/y}$	0,008	0,0245
Declive	0,020	0,009
Limite Inferior Quantificação (mg/L NT)	3,9	28,7
Limite Inferior Deteção (mg/L NT)	1,3	9,5

7.2.3 Experiência Azoto Total

O micro método do azoto total foi projetado para converter o azoto orgânico e inorgânico em nitratos para ser detetado por fotometria. A Hach Lange® utilizou padrões de nitrato de potássio para fazer as curvas de calibração, no entanto, se se quiser usar um padrão para fins de calibração deve-se incluir um padrão com propriedades físico-químicas semelhantes às amostras, tal como indica a ISO 11905:1997.

O inconveniente de utilizar uma solução padrão de nitrato de potássio é que não se tem controlo/indicação de quão bem sucedida é a técnica da digestão, obrigatória aquando da análise das amostras reais. Portanto, dever-se-ia utilizar um padrão orgânico como o ácido nicotínico, a glicina ou a ureia para garantir que se consegue uma digestão completa.

Neste contexto e porque ainda se realizaram curvas de calibração com o padrão de ureia nas gamas de NT e com o intuito de verificar qual a razão pela qual, apesar de se obter sempre linearidade estava muito próxima da exclusão pelo critério do coeficiente de correlação e pelo facto se terem obtido na maioria dos casos erros relativos à concentração teórica superiores a 20%, optou-se por delinear uma experiência que variasse as condições *standard* de temperatura e tempo de digestão do micro método e assim detetar possíveis anomalias nesta fase. O objetivo foi avaliar todas as etapas do micro método e encontrar o padrão que proporcionasse os resultados mais satisfatórios, de forma a controlar a digestão e a concentração dos padrões através das leituras no espectrofotómetro.

1º Começou por se definir as condições de cada digestão:

Tabela 7.65 – Condições de cada digestão

Condições das Digestões:	T (°C)	t (min)
Digestão A	170	15
Digestão B	170	30
Digestão C	170	45
Digestão D	100	60
Digestão E	150	60

De salientar que a digestão A e a D são as digestões referenciadas no procedimento da Hach Lange® [88].

2º Avaliou-se o Padrão 25, 50 e 100 mg/L NT para comprovar o que acontecia. Os resultados obtidos estão na tabela 7.66.

Tabela 7.66 – Padrões de ureia com concentrações de 25, 50 e 100 mg/L NT

	25 mg/L NT:			50 mg/L NT:			100 mg/L NT:		
	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)
Digestão A	19,1	0,292	-23,6%	45,4	0,508	-9,2%	85,9	0,838	-14,1%
Digestão B	22,2	0,318	-11,2%	49,3	0,539	-1,4%	90	0,873	-10,0%
Digestão C	17,5	0,279	-30,0%	43,5	0,492	-13,0%	82,3	0,809	-17,7%
Digestão D	-	-	-	41,5	0,475	-17,0%	-	-	-
Digestão E	-	-	-	40,2	0,465	-19,6%	-	-	-

3º De seguida com base nas mesmas condições testaram-se os extremos da gama baixa e da gama alta de NT, usando como solução padrão KNO₃ (nitrato de potássio), os resultados encontram-se na tabela 7.67.

Tabela 7.67- Padrões de nitrato de potássio com concentrações de 1, 16, 20 e 100 mg/L NT

	1 mg/L NT:			16 mg/L NT:			20 mg/L NT:			100 mg/L NT:		
	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)	Concentração (mg/L NT)	Abs	Erro Relativo (conc. lida e conc. teórica)
Digestão A	1,01	0,188	1,0%	14,0	0,860	-12,5%	18,5	0,287	-7,5%	84,6	0,828	-15,4%
Digestão B	1,19	0,197	19,0%	13,6	0,841	-15,0%	19,6	0,296	-2,0%	90,0	0,872	-10,0%
Digestão C	1,16	0,196	16,0%	11,8	0,747	-26,3%	17,7	0,281	-11,5%	96,3	0,924	-3,7%
Digestão D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Digestão E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Conclusões:

1. Confirma-se a existência de um problema na digestão do padrão ureia;
2. Com base nas digestões do padrão de ureia verifica-se os padrões necessitam de mais tempo no digestor, do que os padrões de nitrato. Não obstante a este facto não devem ser excedidos os 30 minutos, porque com base nestes resultados, tabela 7.66, é onde se obtém error relativos menores. Se se ultrapassar esse tempo, isto é fazendo uma digestão de 45 minutos por exemplo, para o caso do padrão 50 mg/L NT, ou tempo superior já se tem perda de analito.
3. Todavia, salienta-se a necessidade da repetição destes ensaios para confirmação dos resultados e a utilização de outros padrões para além da ureia, nomeadamente da glicina, referenciada na norma ISO 11905:1997 para o azoto total.

8 Conclusões

O presente trabalho teve como objetivos a validação do micro método de CQO demonstrando através da avaliação dos parâmetros, linearidade, limiares analíticos, gama de trabalho, precisão e exatidão, a sua eficiência e adequação ao uso na rotina do laboratório de Beírolas. Posteriormente ainda se fez uma abordagem inicial à validação do micro método do azoto total.

Devido à complexidade dos métodos analíticos clássicos houve interesse do laboratório de Beírolas em investir na validação destes micro métodos, através dos *kits* permitindo uma maior viabilidade técnica devido à sua automação.

As gamas estudadas no parâmetro CQO foram as gamas da Hach Lange®, LCK 1414 [5-60] mg/L O₂, a gama LCK 314 [15-150] mg/L O₂ e ainda a gama alta LCK 1014 [100-2000] mg/L O₂. O estudo começou pela realização de curvas de calibração de forma a verificar a linearidade das gamas mencionadas. Pôde concluir-se que existia uma relação linear entre a concentração das soluções padrão preparadas e a absorvância lida. Também se recorreu à análise dos coeficientes de correlação, tendo sido estes sempre superiores a 0,995, e do teste estatístico de Mandel que indicaram que o modelo linear representa os dados corretamente.

Um dos aspetos avaliado aquando da execução das curvas de calibração foi a estimativa dos limiares analíticos do micro método de CQO. Os resultados obtidos foram sempre superiores ao limite inferior da gama, ainda assim fez-se um estudo de repetibilidade no extremo inferior da gama [5-60] mg/L O₂ para comprovar o LQ do método. Neste estudo o coeficiente de variação obtido foi inferior a 10%, e o LQ poderia ser 5 mg/L O₂, tendo-se obtido um erro relativo de 12%.

Apesar disso, o LQ do método de CQO foi majorado para 8 mg/L O₂, uma vez que o laboratório não necessitava de um LQ tão baixo como o limite inferior da gama comercial. Contudo, é de salientar que, o objetivo do laboratório de conseguir estabelecer um LQ inferior, ao do método clássico que tem implementado (30 mg/L O₂), foi atingido.

Para as restantes gamas (intermédia e alta) os limites inferiores da gama do fornecedor foram também estimados, para verificação através das curvas de calibração, dando sempre regra geral superiores, sendo os valores médios 19 mg/L O₂ – LCK 314 e 256 mg/L O₂ – LCK 1014. Porém os limites inferiores destas gamas foram avaliados em repetibilidade, tendo-se obtido coeficientes de variação inferiores a 10% e erros relativos inferiores ao critério estipulado pelo laboratório de 15%. Posto isto, conclui-se que os limites destas gamas estão aceites nas condições iniciais de validação, contudo a verificação deverá ainda ser realizada em condições de precisão intermédia.

Foram também avaliadas as incertezas associadas à interpolação da curva de calibração para cada gama de trabalho, sabendo que os pontos extremos de cada gama devem sempre ser evitados por serem zonas de maior incerteza. Avaliados os resultados pode concluir-se através da estimativa do LQ, e da verificação dos limites inferiores de cada gama que os resultados são coerentes, pelo que as gamas estão validadas.

Relativamente à análise dos declives do método, como o coeficiente de variação de cada declive foi sempre inferior a 10%, indica que os declives são estáveis, representado mais um ponto forte do micro método.

Posteriormente foi realizada a análise de homogeneidade de variâncias de forma a verificar as gamas de trabalho do laboratório. Para tal, compararam-se as variâncias dos pontos extremos de cada gama. Conclui-se que apenas na gama intermédia se obteve homogeneidade de variâncias, dada a diferença entre as variâncias dos pontos 15 e 150 mg/L O₂ não ser significativa. Tendo as restantes gamas de ser divididas para que fosse possível obter homogeneidade,

nomeadamente a gama baixa de CQO foi dividida entre [8-15] e [15-60] mg/L O₂ e a gama alta entre [100-300], [300-1000] e [1000-2000] mg/L O₂, mas verificou-se ser uma possível desvantagem para uso em rotina do método no laboratório. Para ultrapassar a falta de homogeneidade fez-se uma análise da ponderada e dos intervalos de confiança, de onde se concluiu que as gamas do fornecedor estavam validadas.

O micro método desenvolvido mostrou resultados precisos, quer no estudo de repetibilidade de padrões e amostras, uma vez que se obtiveram coeficientes de variação inferiores a 10%.

No estudo de duplicados, obtiveram-se amplitudes médias relativas baixas (LCK 1414 - 5%; LCK 314 - 7% e LCK 1014 - 4%).

Em relação à avaliação da exatidão através do MRC obtiveram-se sempre, em todas as gamas, erros relativos inferiores ao critério imposto de 15%. Relativamente às recuperações a gama [5-60] mg/L O₂ apresentou uma recuperação média de 96%, o que é muito bom, já a gama [15-150] mg/L O₂ e a gama [100-2000] mg/L O₂ apresentaram alguns resultados fora do critério de aceitação [80-120]% o que significa que foram afetados pelo efeito matriz existente em amostras de águas residuais, não obstante na gama intermédia e alta obteve-se uma recuperação de 91%.

Por fim, fez-se uma comparação dos métodos e pode concluir-se que só na gama [100-2000] mg/L O₂ os métodos são estatisticamente semelhantes. Na gama [5-60] mg/L O₂ os resultados não possibilitaram a comparação estatística com o método clássico, uma vez que os resultados das amostras testadas estavam abaixo do LQ deste (30 mg/LO₂). E na gama [15-150] mg/L O₂ não foi possível avaliar a exatidão de forma eficiente em toda a gama através da comparação pela mesma razão, salienta-se ainda que o número de amostras que foi possível analisar não permitiu uma verificação estatística robusta.

Depois de se terem analisado os parâmetros de validação foi determinada a incerteza de cada gama, sendo a incerteza expandida de 18% na gama baixa [5-60] mg/L O₂, 22% na gama intermédia [15-150] mg/L O₂ e 16% na gama alta [100-2000] mg/L O₂. De facto, estes resultados demonstram ser consistentes com os vários critérios adotados ao longo do estudo.

O processo de validação do CQO ainda não está concluído faltando ainda um conjunto de ensaios pertinentes nomeadamente ensaios em condições de precisão intermédia e ensaios interlaboratoriais (EIL), que não foram possíveis de realizar, devido ao facto do período em que decorreu o trabalho, as distribuições de EIL calendarizadas não conterem o parâmetro CQO.

Neste trabalho iniciou-se ainda a validação do parâmetro NT (azoto total). Primeiramente escolheram-se as gamas necessárias para o trabalho em rotina do laboratório, sendo estas: [1-16] mg/L NT (LCK 138), [5-40] mg/L NT (LCK 238) e de [20-100] mg/L NT (LCK 338). Os estudos continuaram com a realização de curvas de calibração com o padrão de nitrato de potássio, padrão utilizado pelo fornecedor para a realização das curvas presentes no espectrofotómetro, onde se obtiveram boas linearidades, avaliadas pelo teste estatístico de Mandel e pelo coeficiente de correlação ($r \geq 0,995$). Não tendo sido realizados mais testes para a validação do NT.

Com o estudo desenvolvido concluiu-se que, o micro método de espectrofotometria molecular para determinação do CQO e NT num laboratório é rápido, ambientalmente menos agressivo, devido às quantidades de reagentes envolvidas serem 90% inferiores às usadas nos métodos clássicos e por isso há uma menor produção de resíduos.

Por outro lado, há mais segurança no trabalho porque, o micro método não requer qualquer preparação de soluções perigosas como sulfato de mercúrio ou dicromato de potássio. Apesar, de os *kits* não terem sido inicialmente concebidos para ser usados num laboratório como método acreditado. Uma vez que, foram idealizados para que os operadores tivessem uma noção

dos parâmetros mencionados, no decorrer do processo industrial. Assim, o uso destes para laboratórios necessitam de uma validação mais extensiva, de forma a demonstrar a sua adequação ao uso dentro dos critérios de exigência que um método acreditado deve cumprir.

Ainda assim, o micro método apresenta algumas limitações verificadas no decorrer da validação, nomeadamente os resultados de amostras com sólidos suspensos poderem distanciar-se bastante do método clássico, pelo facto de neste método o volume da toma de amostra, no caso do CQO, introduzida no *kit* ser apenas 2 mL, podendo este não ser representativo.

Verificou-se, na sequência da validação que os resultados do método estão dependentes do tempo de arrefecimento. Ao longo das experiências efetuadas até ao momento de conclusão deste estudo concluiu-se que o tempo de espera mínimo deve ser 30 minutos para que as leituras não tenham desvios significativos.

Não obstante, com os dados de validação para já obtidos pode afirmar-se que o procedimento a micro escala se apresenta como uma alternativa viável para o método clássico.

9 Recomendações - Trabalhos Futuros

Relativamente ao estudo elaborado no âmbito desta dissertação, foram identificadas algumas questões que seriam interessantes abordar em trabalhos futuros.

Nomeadamente o facto do micro método desenvolvido se ter focado praticamente na validação do CQO, podendo no futuro, os micro métodos serem também aplicados na determinação de azoto total, e fósforo total, por serem dois importantes indicadores do nível de poluição de uma água residual. Por outro lado, hoje em dia ainda se utilizam os métodos clássicos com elevadas taxas de ocupação dos técnicos, tornando-se mais morosos e suscetíveis a erros.

Um dos inconvenientes durante a realização das análises laboratoriais foi o facto do digestor, HT 200 S somente ter capacidade para digerir 12 *kits* de cada vez, tal como anteriormente mencionado é necessário proceder-se ao controlo de qualidade interno por sessão de trabalho. Este pressupõe a restrição de locais para a digestão de amostras, sendo o laboratório de Beírolas acreditado e tendo sempre imensas amostras para analisar por semana tornava-se importante verificar outras alternativas no mercado nomeadamente digestores com maior número de compartimentos. Por outro lado, também seria interessante associar o micro método a um sistema de automação/robotização. Uma vez que, o *robot* tornaria o teste mais preciso e permitiria uma maior flexibilidade na quantidade de amostras analisadas por dia, e um menor esforço e dispêndio de tempo em técnicas mais metódicas durante a análise laboratorial, como seja o facto de agitar o *kit* e introduzir o volume de toma da amostra (2 mL no caso do CQO).

Visto que os materiais em suspensão ou uma turvação da amostra influenciam muito a determinação por espectrofotometria, considera-se importante quando forem retomados os estudos de validação, a utilização de um equipamento que minimize a interferência da matéria em suspensão, tornando a amostra mais homogeneia tal pode ser conseguido através de um homogeneizador.

Aconselha-se a realização, para a gama baixa de CQO, de estudos em precisão intermédia do padrão mais baixo da gama, para se verificar se os limiares analíticos obtidos se mantêm. Podendo, depois destes estudos usar como limite de quantificação o valor mínimo da gama baixa estabelecida pelo fabricante sem quaisquer adaptações ou continuar com o LQ majorado. Sugere-se também que sejam realizados ensaios de verificação dos limites inferiores de cada gama em precisão intermédia.

Relativamente aos ensaios de recuperação de amostras com analito, visto terem-se obtido ao longo deste estudo alguns resultados fora do critério definido, sobretudo nas gamas intermédia e alta, por efeitos de matriz, considera-se importante que seja feito um reforço do estudo de forma a analisar o efeito de matriz por repetibilidade ou se necessário realizando curvas de adição padrão.

Recomenda-se ainda, que os resultados dos brancos e dos padrões de controlo de cada método sejam introduzidos em cartas de controlo para que seja feita a sua análise e rastreabilidade, de forma a verificar através desta ferramenta estatística se existem resultados tendenciosos, perceber as causas que levaram a esses efeitos menos conformes de forma a poder corrigir e eliminá-los.

Em relação ao parâmetro de NT dever-se-á dar continuidade aos estudos iniciados durante a dissertação. Dever-se-á retomar o estudo através da elaboração de experiências similares à apresentada com um padrão orgânico, optando por voltar a experimentar a ureia ou iniciar os estudos com o padrão de glicina (referido na norma 11905-1:1997) ou ácido nicotínico.

O intuito da realização de experiências com estes padrões é para testar a digestão através da utilização de um padrão orgânico, em vez da utilização de nitrato de potássio como definido

pela equipa da Hach Lange®. Depois deve-se retomar a elaboração de curvas de calibração, para estudos de linearidade e posteriormente de homogeneidade de variâncias. Assim que estes estejam concluídos, deve-se começar com os estudos de amostras e MRC em condições de repetibilidade e precisão intermédia, de forma a avaliar a precisão e exatidão do método.

Por fim, considera-se muito importante que o laboratório proceda à realização de ensaios interlaboratoriais em ambos os métodos no decorrer da validação, de forma a comparar resultados com outros laboratórios, fazendo assim um controlo da sua competência técnica, conforme prática habitual para os restantes ensaios acreditados. Pode recorrer a ensaios do tipo de normalização, por exemplo para analisar uma precisão compatível com a dos outros laboratórios, ou pode recorrer a um ensaio do tipo de aptidão, se quiser avaliar a exatidão dos seus resultados.

Bibliografia

- [1] Vuorinen H.S, Juuti, and Katko, 2007, *History of water and health from ancient civilizations to modern times*, Water Sci. Technol. Water Supply, vol. 7, pp. 49–57.
- [2] “Sanitation Innovation Accelerator 2016” 2016.
- [3] UN Water GLAAS, 2014, *Investing in Water and Sanitation: Increasing Access, Reducing Inequalities: GLAAS 2014 findings - Special report for Africa*.
- [4] Who/Unicef, 2015, *25 YEARS Progress on Sanitation and Drinking Water: 2015 Update and MDG Assessment*, New York, NY UNICEF World Health Organisation, p. 4.
- [5] Pierre-Louis, V., 2007, *Water Engineering in Ancient Civilizations 5,000 years of History*, Taylor and Francis Group, LLC.
- [6] Livelihoods and Natural Resources Management Institute - IRC, *Sustainable Water and Sanitation Services The Life-Cycle Cost Approach to Planning and Management*, vol. 8.
- [7] Oecd, 2014, *Managing water for future cities*, p.1-7.
- [8] “PENSAAR 2020: Volume 1”, 2015, vol. 53,p. 117.
- [9] “Improved sanitation facilities, rural (% of rural population with access)”.
<http://data.worldbank.org/indicator/SH.STA.ACSN.RU?contextual=max&end=2015&locations=PT&start=1995>. [Acedido a: 03-Oct-2016].
- [10] “Improved sanitation facilities, urban (% of urban population with access)”.
<http://data.worldbank.org/indicator/SH.STA.ACSN.UR?contextual=default&end=2015&locations=PT&start=1995>. [Acedido a: 03-Oct-2016].
- [11] United Nations Development Programme, 2015, *The Millenium Development Goals Report 2015*, pp. 1–75.
- [12] Gomes, K. and Ebrary, I., 2009, *Wastewater management: A UN-Water Analytical Brief*, UN Water, p. 55.
- [13] UNESCO, 2014, *The United Nations World Water Development Report 2014: Water and Energy*, vol. 1.
- [14] Corcoran, E., Nelleman, 2010, *Sick Water ? The Central Role of Wastewater Management in Sustainable Development*.
- [15] UNESCO, 2010, *Managing Water under Uncertainty and Risk*, Report 4, Chapter 2.
- [16] A. Foster and W. Environment, “EU-level instruments on water reuse Final report to support the Commission ’ s Impact,” 2016.
- [17] Metcalf and Eddy, 2003, *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*, McGraw-Hill Publishing Company Limited, 4th edition. New Delhi, India, p. p.3-10;93-95;164-169.
- [18] Butler, D. and Davies, J. W., 2011, *Urban Drainage*, 3rd edition, p.1-12;61-73.

- [19] Mara, D.,2003, *Domestic Wastewater Treatment*, p. 1-18;29-33;42.
- [20] I. Lucena, “Anexo Técnico de Acreditação N° C0024 Anexo Técnico de Acreditação N° C0024,” pp. 201–203, 2016.
- [21] IPAC, “Procedimento para Acreditação de Laboratórios - DRC005,” pp. 1–21, 2012.
- [22] A.P.A., “Licença de Utilização dos Recursos Hídricos - Rejeição de Águas Residuais”,2016, pp. 1–7.
- [23] C. Da Europa, “Carta Europeia Da Água,” 1968.
- [24] Ministério do Ambiente, “Decreto-Lei nº 152/97 de 19 de Junho de 1997,” *Diário da República - I*, pp. 2959–2967, 1997.
- [25] Parlamento Europeu, “Directiva 91/271/CEE,” pp. 40–52, 1991.
- [26] RMV & A.-S. de Advogados,2008, *Água*, Porto Editora , p.53-106;p.243-297; p. 358--367.
- [27] Henze, M. Comeau, Y., 2008, *Wastewater Characterization*,IWA Publishing, London, pp. 33–52.
- [28] “Decreto-Lei 236/98,” pp. 3676–3722, 1998.
- [29] Parlamento Europeu e do Conselho, “Directiva 2000/60/CE”, pp. 1–72, 2000.
- [30] “Lei da Água” - nº 58/2005, 2005.
- [31] “A Directiva « Nitratos » da União Europeia” 1991.
- [32] “Decreto-Lei nº 83/2011,” 2011, *Diário da Republica, 1ª série-Nº 117*, pp. 3584–3587.
- [33] “APA.” [Online]. Available: <http://ladigital.apambiente.pt/>. [Acedido a: 19-Dec-2016].
- [34] ISO/IEC 17025, 2005, "General requirements for the competence of testing and calibration laboratories".
- [35] Taylor, C.,2013, *Validity and validation* p. 206.
- [36] IPQ, 2012, *Vocabulário Internacional de Metrologia*, 1ª Edição, p. 93.
- [37] *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*,2014.
- [38] Konieczka, P. and Namiesnik,J., 2009, *Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach*, p. 232.
- [39] Relacre, 2000, *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*.

- [40] Gibson, W., and Powell-Evans, K., 1998, *Validation fundamentals: How to, What to, When to validate*.
- [41] Fajgelj, A., Ambrus, Á., 2000, *Principles and Practices of Method Validation*. The Royal Society of Chemistry, pp.21-26
- [42] Ludwig, H., 2007, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, 2nd edition.
- [43] Citac and Eurachem, 2012, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3th edition.
- [44] Relacre, *Guia RELACRE 3: Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. 1996.
- [45] IPAC, 2010, *Guia Para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*.
- [46] ICH, 2005, *ICH Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology*.
- [47] ISO 8466-1:1990, *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1 Statistical evaluation of the linear calibration function* .
- [48] ISO 8466-2:2001, *Water Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 2 Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions* .
- [49] Gore, Michael, S., 2000, *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry*, Chapter 1.
- [50] Mandel, J., “The Statistical Analysis of Experimental Data”, Interscience Publishers, 1964, p.78
- [51] ISO 13530-2012, *Water quality - Guidance an analytical quality control for chemical water analysis*, 2012.
- [52] IPAC, “Guia para a quantificação da incerteza da medição em Ensaio Químicos,” pp. 1–19, 2007.
- [53] Relacre, 1996, *Guia Relacre 7 - Ensaio interlaboratoriais em Química*, pp. 1–14, 1996.
- [54] IPAC, 2011, *OGC002 - Guia para a acreditação de laboratórios químicos*.
- [55] Miller, J.M., and Miller, J.C., ,2010, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th edition, Pearson Education, p.49-51;p.110-124;p.135-138.
- [56] ISO 11352:2012 *Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty based on Validation and Quality Control Data*, 2012.
- [57] S. Bell, 1999, *A Beginner’s Guide to Uncertainty of Measurement*, p. 41.
- [58] Hibbert, B., 2007, *Quality Assurance in the Analytical Chemistry Laboratory*, Oxford, p.161-177
- [59] Instituto Português de Acreditação (IPAC), 2015, *Avaliação da Incerteza de Medição em Calibração*, pp. 1–14.

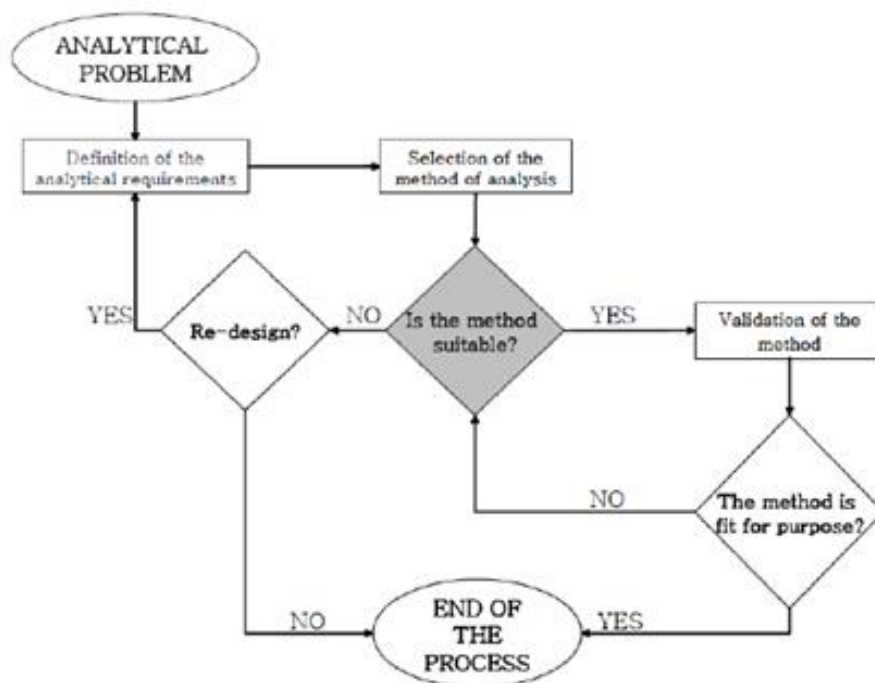
- [60] “PTA-12- Incerteza-Metodologia geral calculo,v.05-26-05-2014.” (Documento Interno) .
- [61] Barwick,V.,Ellison, S., 2000, VAM Project 3.2.1 Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles, *Part d: Protocol for uncertainty evaluation. from Validation data.*
- [62] Nordtest, *TR 537 ed. 3.1 Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*, 2012.
- [63] ISO 11352-2012, *Water quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data.*
- [64] International Standard ISO 9001, 2008, *Quality management systems.*
- [65] Pereira, Z. L., Requeijo, J. G. 2008, *Qualidade: Planeamento e Controlo Estatístico de Processos*, Prefácio, Lisboa, p.40-42
- [66] Relacre,2002, *Eurachem/Relacre 1 - Exemplos de Cálculos de Incertezas.*
- [67] Cell, H., Using the Spectrophotometer
<https://msu.edu/course/lbs/159h/Spectrophotometry04.pdf> [Acedido a: 09-Nov-2016].
- [68] Perkampus, H., 1993, *UV-VIS spectroscopy and Its Applications*, vol. 12.
- [69] Owen, T., 1996, *Fundamentals of UV-visible spectroscopy.*
- [70] Vetter,W., Englert, G. Rigassi, N., and Schwieter,U., 1971, *Spectroscopic methods, Analytical Chemistry*, Chapter 10, pp. 1–124.
- [71] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22th edition, 5220 A,B,C,D.
- [72] ISO-6060 -1989 *Qualité de l'eau - Determinacion de la demande chimique en oxygène.*
- [73] Boyles,Wayne,1997 *The Science of Chemical Oxygen Demand.*
- [74] Hach Lange® “ISO 15705 : O teste em cuvete de CQO está de acordo com as normas Sempre um passo a frente com os testes em cuvete.”
- [75] International Standard ISO 15705:2002, *Water quality - Determination of the chemical oxygen demand index (ST-COD) - Small-scale sealed-tube method.*
- [76] Hach Lange®, 2013, “LCK 1014 100-2000 mg/L”.
- [77] Hach Lange®, 2013, “LCK 314 15-150 mg/L”
- [78] Hach Lange®, “LCK 1414 5-60 mg/L” - DOC312.61.94106
- [79] Pütz,P.,2008, “Nitrogen parameters : Nitrification , Denitrification Wastewater treatment : elimination of nitrogen”.

- [80] ISO 11905-1-1997, *Water quality - Determination of nitrogen - Method using oxidative digestion peroxidissulfate* .
- [81] “Nitrogen , Total Total Nitrogen cuvette test 5-40 mg / L TNb” -DOC316.53.01088
- [82] Pütz,P., “10 × COD : a COD range for every application LANGE COD cuvette tests : see the advantages for yourself”
- [83] Pütz,P, “LANGE Cuvette Tests : used by the professionals”
- [84] “Saiba quem somos e o que fazemos - Hach.” [Online]. Available: <http://pt.hach.com/about-us-overview>. [Acedido a: 01-Ago-2016].
- [85] “Imp 5.” - (Documento Interno).
- [86] “Manual do Utilizador DR 3900”, 2011, pp. 9–12;22.
- [87] Hach Lange®, “Testes em cuvette LCK : a solução profissional para se manter em conformidade”
- [88] Hach Lange® “Laton Total Nitrogen cuvette test 1-16 mg / L TNb”.
- [89] Montgomery, D. 2009, *Introduction to Statistical Quality Control*, pp 17-23

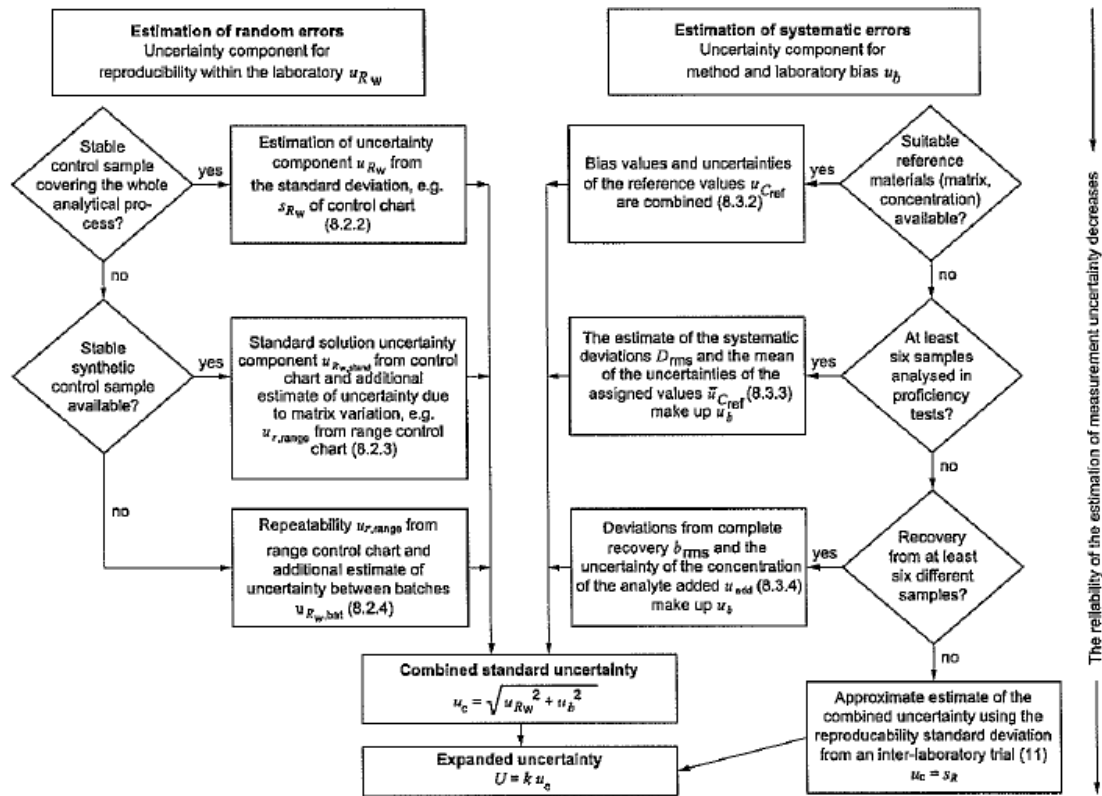
Anexos

A. Esquemas

Esquema da Validação de um Método - Guia EURACHEM 2014



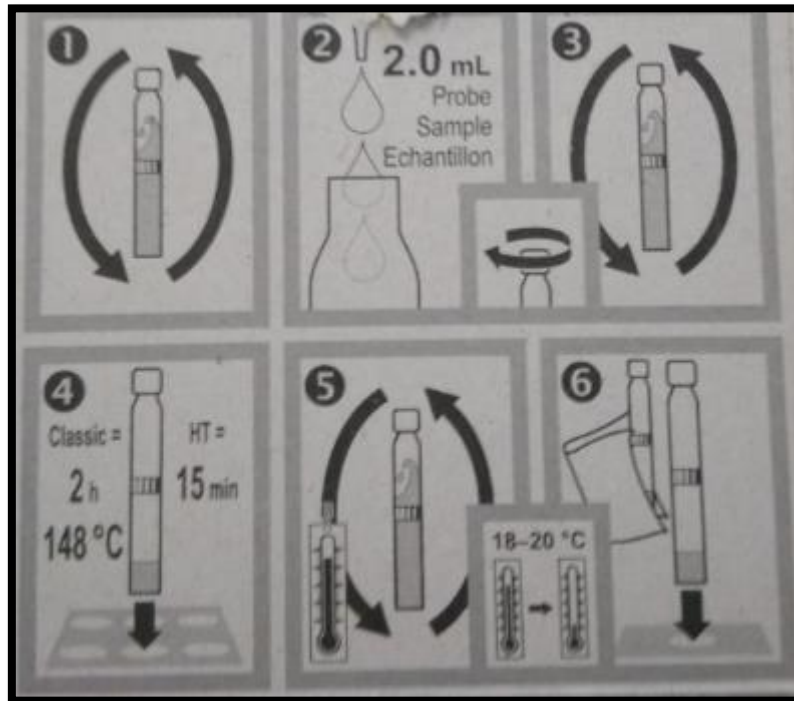
Esquema relativo à Incerteza - ISO 11352:2012



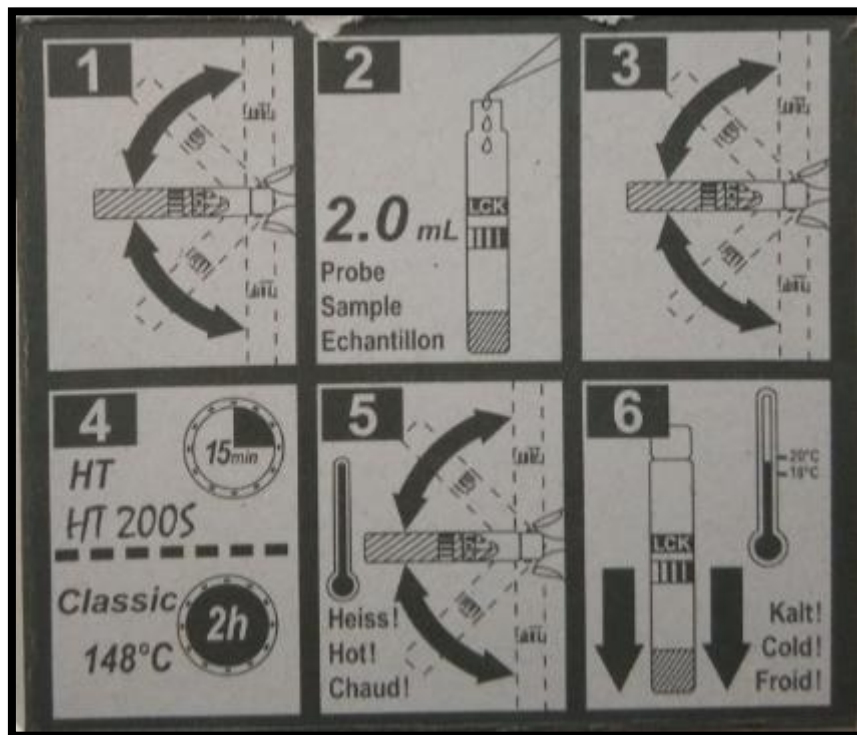
B. Procedimentos Hach Lange®

CQO

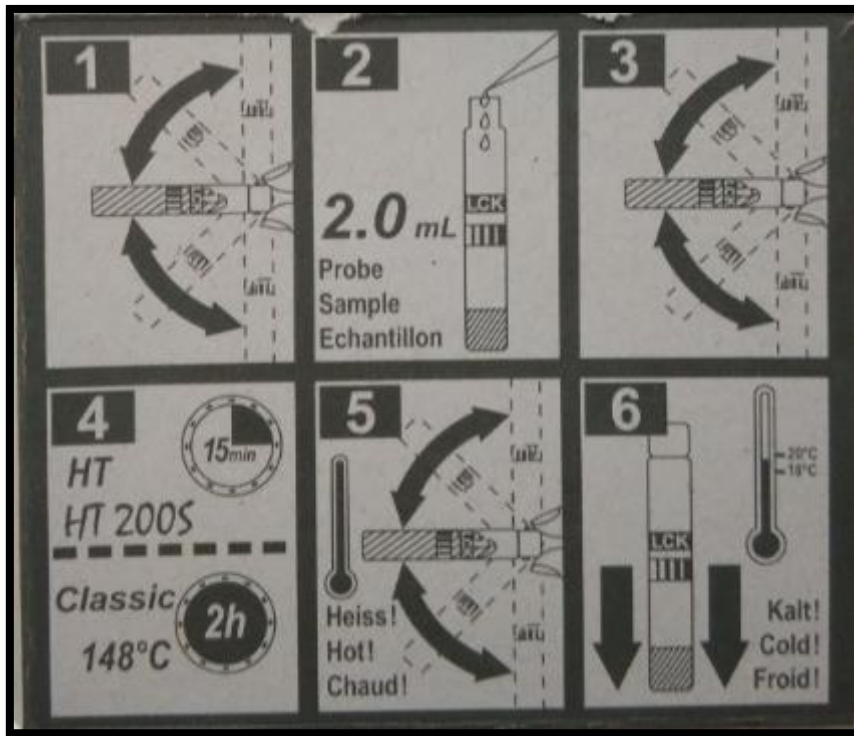
- **LCK 1414 [5-60] mg/L O₂**



- **LCK 314 [15-150] mg/L O₂**

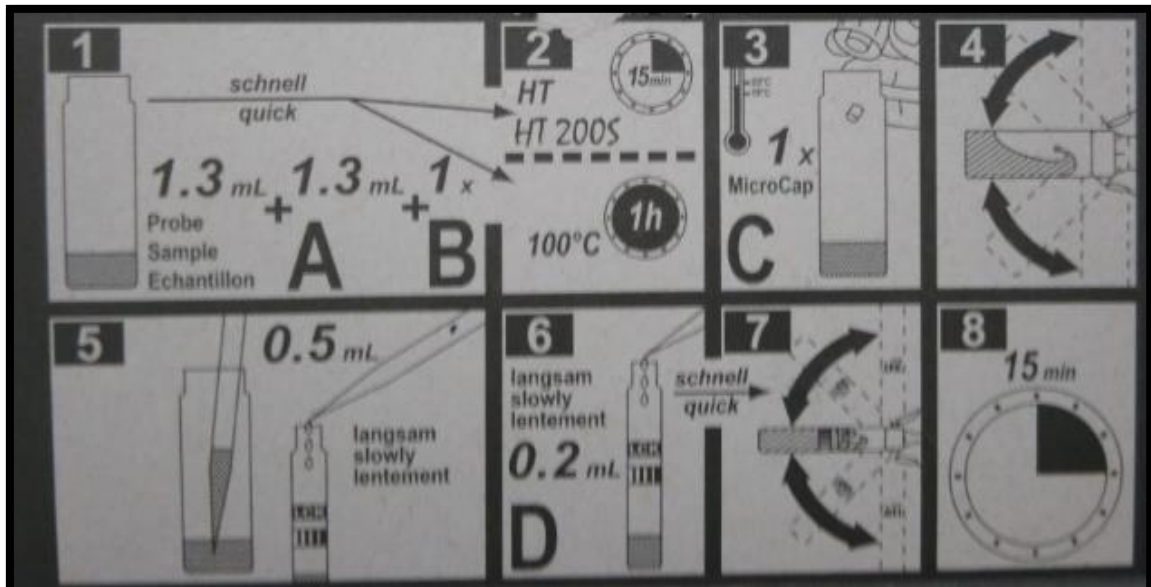


- LCK 1014 [100-2000] mg/L O₂

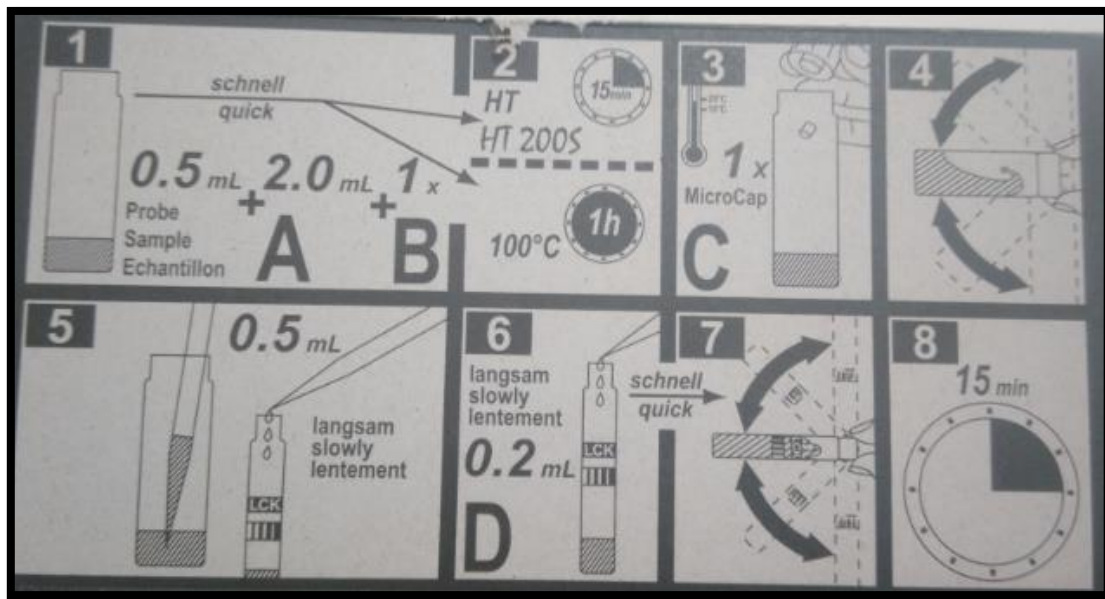


NT

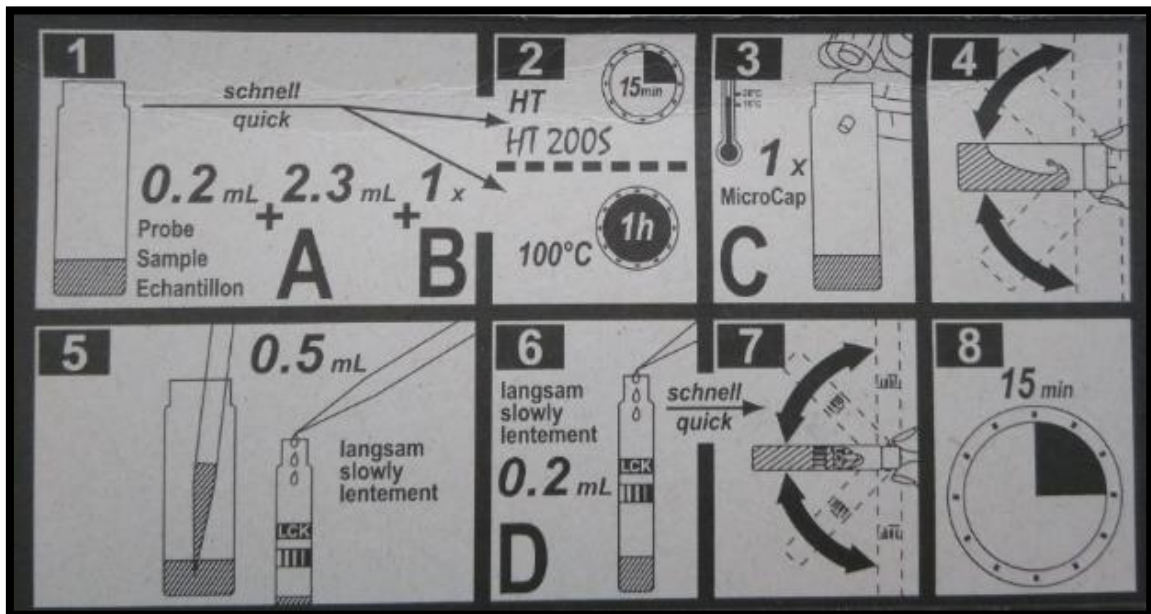
- LCK 138 [1-16] mg/L NT



- LCK 238 [5-40] mg/L NT



- LCK 338 [20-100] mg/L NT



C. Regressão Ponderada

Tabela C.1 – Ponderada e Regressão Linear Gama [5-60] mg/L O₂

PONDERADA		1ª Curva Calibração		2ª Curva Calibração		3ª Curva Calibração	
Concentração (mg/L O ₂)	Abs	Abs	% Erro Relativo	Abs	% Erro Relativo	Abs	% Erro Relativo
5	1,605	1,633	-2%	1,651	-3%	1,631	-2%
8	1,543	-	-	-	-	-	-
10	1,501	1,492	1%	1,530	-2%	1,527	-2%
15	1,397	1,408	-1%	1,385	1%	1,408	-1%
20	1,293	1,293	0%	1,291	0%	1,303	-1%
30	1,085	1,054	3%	1,089	0%	1,140	-5%
45	0,773	0,779	-1%	0,788	-2%	0,760	2%
50	0,669	0,680	-2%	0,686	-3%	0,655	2%
60	0,461	0,465	-1%	0,467	-1%	0,441	4%

Tabela C.2- Ponderada e Regressão Linear Gama [100-2000] mg/L O₂

PONDERADA		1ª Curva Calibração		2ª Curva Calibração		3ª Curva Calibração	
Concentração (mg/L O ₂)	Abs	Abs	% Erro Relativo	Abs	% Erro Relativo	Abs	% Erro Relativo
100	0,101	0,100	1%	0,104	-3%	0,102	-1%
300	0,192	0,193	-1%	0,189	1%	0,200	-4%
500	0,283	0,281	1%	0,298	-5%	0,291	-3%
1000	0,510	-	-	-	-	-	-
1100	0,556	0,546	2%	-	-	0,542	3%
1500	0,738	0,747	-1%	0,747	-1%	0,741	0%
2000	0,965	0,943	2%	0,984	-2%	0,970	0%