



Inês Nunes Trindade

Licenciada em Química - Perfil Química Científica

**Revalidação dos métodos de análise de
Azoto Amoniacal, Azoto Nítrico e Azoto
Kjeldahl, em lamas e solos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Mestre Diana Isabel de Almeida Simões,
Responsável Técnica LABQUI – ISQ

Co-orientador: Prof.^a Doutora Ana Maria Ferreira da Costa Lourenço,
Professora Auxiliar FCt - UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor António Gil de Oliveira Santos

Arguente: Prof. Doutor Marco Diogo Richter Gomes da Silva

Vogal(ais): Mestre Diana Isabel de Almeida Simões

Setembro 2016

Inês Nunes Trindade

Licenciada em Química - Perfil Química Científica

**Revalidação dos métodos de análise de Azoto
Amoniacal, Azoto Nítrico e Azoto Kjeldahl, em
lamas e solos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Química Bioorgânica

Orientador: Mestre Diana Isabel de Almeida Simões,
Responsável Técnica LABQUI – ISQ

Co-orientador: Prof.^a Doutora Ana Maria Fereira da Costa Lourenço,
Professor Auxiliar FCT - UNL

Revalidação dos métodos de análise de Azoto Amoniacal, Azoto Nítrico e Azoto Kjeldahl, em lamas e solos

Copyright

Inês Nunes Trindade

Eu, Inês Nunes Trindade, declaro que 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 de 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 objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Não é algo que costumo expressar por palavras. Quem me conhece sabe que prefiro sempre agradecer pessoalmente. Muitas vezes quem lê, não o faz da mesma forma que nós escrevemos e não interpreta do mesmo modo que tentámos transmitir. Mas vou tentar expressar o que sinto...

Vou começar por agradecer ao ISQ por me ter aceite, mas mais especificamente ao LABQUI e a todos que constituem a nossa equipa. Obrigada por me terem recebido e me fazerem sentir como se sempre tivesse pertencido à equipa.

Quero agradecer também à minha Responsável Técnica de Laboratório e orientadora nesta tese de mestrado: Mestre Diana de Almeida Simões. Obrigada por tudo: conselhos, ajuda, reprimendas, situações de teste, etc.. Sei que tudo o que tens feito por mim até aqui, tem sido para eu melhorar profissionalmente e adquirir novos conhecimentos. Obrigada por me teres feito crescer a este nível. Claramente não posso deixar de te agradecer também na orientação da tese, as tuas correcções ajudaram-me muito.

Gostaria de agradecer ao Eng^o Guiomar Massa Medeiros por ter estado sempre disponível para me ajudar a esclarecer tantas dúvidas que lhe coloquei e por ter tido sempre paciência para me explicar.

Agradeço à Professora Dr^a Ana Lourenço, não só a rapidez de resposta a todas as questões que lhe coloquei, como às correcções e sugestões que fez nesta tese. Ajudou-me muito tê-la como co-orientadora.

Não posso deixar de agradecer à Professora Dr^a Paula Branco. Desde o dia em que pensei inscrever-me na tese de mestrado e que decidi enviar um e-mail para a coordenadora do mestrado (Prof^a Paula), que me tem ajudado sempre. Não foi fácil conciliar trabalho e estudo, não foi fácil numa Faculdade nova, sem conhecer ninguém, ter acesso a todas as informações necessárias e a Prof^a Paula nunca se esqueceu de me comunicar ou de me responder a qualquer questão. A tudo o que fez por mim, muito obrigada!

Agora a nível pessoal, não posso deixar de agradecer aos meus amigos, mais especificamente a Nádia Almeida e Andreia Cabral: é com vocês que passo a maior parte do dia e só vos posso agradecer por todos os momentos que temos tido. A alegria reina no nosso trio e isso ajuda imenso para passar o dia. Continuem sempre assim: responsáveis e honestas convosco mesmas mas sempre com a alegria que contagia.

Pais, avó, mana e cunhado só vos posso agradecer por me aturarem sempre e por me terem apoiado nesta etapa que percorri, como sempre fizeram e como sei que sempre farão. Vocês são os que nunca falham, estão sempre lá para mim.

Por fim, quero agradecer à pessoa mais importante nesta etapa que termina, a pessoa que me encorajou para tirar o mestrado, que me aturou sempre que eu achava que não conseguia mais, sempre mas sempre esteve ao meu lado a apoiar em tudo: ao meu marido MUITO OBRIGADA. Obrigada por nunca deixares de acreditar em mim, obrigada por estares a meu lado a encorajar-me a ir em frente. Não tenho como agradecer toda a paciência e disponibilidade que tiveste nestes dois anos de mestrado. Obrigada também por todas as correcções e sugestões que fizeste no texto, mesmo sem ser a tua área. Ajudaram-me imenso e tu sabes que sim.

Tudo se resume a um MUITO OBRIGADA, a todos os que estiveram presentes na minha vida e contribuíram para a finalização desta etapa!

Resumo

O estudo de tese de mestrado foi realizado no Departamento LABQUI – Laboratório de Química e Ambiente, do ISQ – Instituto de Soldadura e Qualidade.

O azoto apresenta uma elevada importância, devido às suas aplicações a nível agrícola (fertilizante) e industrial (engenhos explosivos), entre outros.

Devido à sua importância ambiental e, tendo como referência as legislações ambientais que regem a deposição de lamas em solos agrícolas, o ISQ – LABQUI decidiu revalidar três métodos de quantificação das diferentes fontes de azoto (azoto total, azoto amoniacal e azoto nítrico) em matrizes sólidas, tais como, lamas e solos.

Durante o seu ciclo, o azoto, devido a acções microbiológicas, converte-se em azoto amoniacal (NH_4^+). Segue-se uma reacção de oxidação do azoto amoniacal em nitrito (NO_2), com posterior redução desta molécula, em nitrato (NO_3).

Para a revalidação do método, procedeu-se como se de uma validação primária se tratasse, determinando-se o seu limite de quantificação e respectivo limite de detecção. Verificou-se a linearidade do método bem como a gama de trabalho. Determinou-se ainda a exactidão e precisão do método. Culminou-se o estudo de cada método com o cálculo da respectiva incerteza. Para confirmar os resultados obtidos, aplicaram-se testes estatísticos, tais como, teste de Mandel para o estudo de linearidade, o teste F para a análise de homogeneidade de variâncias, teste t-student e teste de Outliers.

Tanto para o azoto amoniacal como para o azoto nítrico constatou-se que a gama de trabalho estava bem ajustada (de 0,839mg N/L a 3,728 mg N/L para azoto amoniacal e de 0,4mg NO_3 /L a 5,0 mg NO_3 /L para o azoto nítrico) bem como o seu limite de quantificação. Foi possível concluir que, na quantificação do analito, os três métodos são exactos e precisos com repetibilidades e reprodutibilidades inferiores a 10% de coeficiente de variação e com ensaios de recuperação inferiores a 20%. Os três métodos não apresentam desvios significativos em relação ao valor alvo. Os valores calculados para a incerteza dos métodos foram $\leq 20\%$.

Do estudo realizado, conclui-se que os três métodos continuam validados para serem aplicados em análise de rotina.

Termos – chave: azoto, validação, métodos, padrão, incerteza.

Abstract

The master's thesis was conducted at the LABQUI Department– Laboratório de Química e Ambiente, on ISQ – Instituto de Soldadura e Qualidade.

Nitrogen has a high importance due to its agricultural uses (fertilizer) and industrial uses (explosive devices).

Because of its environmental importance and, complying with the environmental laws that regulate the disposal of sludge on agricultural soils, the ISQ - LABQUI decided to revalidate three quantification methods of different nitrogen sources (total nitrogen, ammonium and nitrate) in solid matrix, such as sludge and soils.

During its cycle, the nitrogen is converted to ammonium (NH_4^+), due to microbiological action. Then, NH_4^+ oxidates into nitrite (NO_2), with subsequent reduction of this molecule into nitrate (NO_3).

To revalidate the method, we handled it as if it was a primary validation, determining its quantification limit and its detection limit. We verified the method linearity as well as the working range. The method's accuracy and precision was also determined. We finished each method study by calculating its uncertainty. To confirm the results, we applied statistical tests, such as Mandel test for linearity study, the F test for the homogeneity of variance analysis, Student's t test and Outliers test.

For both the ammonium and nitrate we concluded that the working range was well adjusted (from 0,839 mg N/L to 3,728 mg N/L for ammonium and from 0,4 mg NO_3 /L to 5,0 mg NO_3 /L), as well as its quantification limit.

In the analyte quantification, it was concluded that the three methods are accurate and precise to lower reproducibility and repeatability 10% coefficient of variation and recovery tests of less than 20%. The three methods do not have major deviations from the target value. The values calculated for the methods uncertainty were $\leq 20\%$.

From the performed study, it is concluded that the three validated methods continue to be applied in routine analysis.

Keywords: nitrogen, validation, methods, standard, uncertainty.

Índice de matérias

Agradecimentos.....	pág. v
Resumo	pág. vii
Abstract	pág. ix
Lista Figuras	pág. xv
Lista Tabelas	pág. xvii
1.Introdução	pág. 1
1.1 Azoto.....	pág. 2
1.1.1 O ciclo do azoto	pág. 2
1.1.2 Factores que afectam os diferentes processos do ciclo.....	pág. 5
1.1.2.1 Factores que afectam o processo de nitrificação.....	pág. 5
1.1.2.2 Factores que afectam o processo de desnitrificação	pág. 6
1.2 Tratamento de águas residuais	pág. 7
1.3 Análises Químicas	pág. 10
1.3.1 Pré-tratamento das amostras	pág. 10
1.3.2 Colheita e preservação da amostra.....	pág. 10
1.3.3 Determinação do teor de matéria seca.....	pág. 11
1.4 Processo de Lixiviação	pág. 12
1.5 Processo de separação da amostra – Destilação	pág. 14
1.6 Processo de Digestão.....	pág. 15
1.7 Espectrofotometria de Absorção Molecular de UV – Visível	pág. 15
1.8 Validação de métodos de ensaio.....	pág. 16
1.8.1 Gama de trabalho	pág. 17
1.8.2 Linearidade	pág. 18
1.8.3 Homogeneidade de variâncias	pág. 19

1.8.4 Limites de Detecção e de Quantificação	pág. 21
1.8.4.1 Limite de Quantificação.....	pág. 21
1.8.4.2 Limite de Detecção	pág. 22
1.8.5 Precisão.....	pág. 23
1.8.5.1 Repetibilidade.....	pág. 23
1.8.5.2 Reprodutibilidade	pág. 23
1.8.6 Exaxctidão.....	pág. 23
1.8.7 Incerteza	pág. 26
2. Parte Experimental	pág. 31
2.1 Material	pág. 32
2.2 Reagentes	pág. 32
2.2.1 Azoto Amoniacal.....	pág. 32
2.2.2 Azoto Nítrico.....	pág. 32
2.2.3 Azoto Kjeldahl.....	pág. 33
2.3 Métodos Analíticos.....	pág. 33
2.3.1 Azoto Amoniacal e Azoto Nítrico.....	pág. 33
2.3.1.1 Preparação da amostra	pág. 33
2.3.1.2 Quantificação do teor de azoto nítrico	pág. 34
2.3.1.3 Quantificação do teor de azoto amoniacal	pág. 36
2.3.2 Azoto Kjeldahl.....	pág. 40
3. Revalidação dos métodos de ensaio	pág. 43
3.1 Revalidação do método para Azoto Amoniacal	pág. 44
3.1.1 Gama de trabalho.....	pág. 44
3.1.2 Linearidade	pág. 46
3.1.3 Limite de Quantificação.....	pág. 48

3.1.4 Limite de Detecção	pág. 51
3.1.5 Precisão.....	pág. 52
3.1.5.1 Repetibilidade.....	pág. 52
3.1.5.2 Reprodutibilidade	pág.53
3.1.6 Exactidão	pág. 55
3.1.7 Cálculo da Incerteza.....	pág. 56
3.1.7.1 Incerteza da exactidão.....	pág. 56
3.1.7.2 Incerteza da precisão.....	pág.56
3.1.7.3 Incerteza combinada	pág. 59
3.1.7.4 Incerteza expandida	pág. 59
3.2 Revalidação do método para Azoto Nítrico	pág. 59
3.2.1 Gama de trabalho	pág. 59
3.2.2 Linearidade	pág. 61
3.2.3 Limite de Quantificação.....	pág. 63
3.2.4 Limite de Detecção	pág. 66
3.2.5 Precisão.....	pág. 67
3.2.5.1 Repetibilidade.....	pág. 67
3.2.5.2 Reprodutibilidade	pág. 68
3.2.6 Exactidão	pág. 69
3.2.7 Cálculo da Incerteza.....	pág. 71
3.2.7.1 Incerteza da exactidão.....	pág. 71
3.2.7.2 Incerteza da precisão.....	pág. 71
3.2.7.3 Incerteza combinada	pág. 73
3.2.7.4 Incerteza expandida	pág. 73
3.3 Revalidação do método para Azoto Kjeldahl	pág. 73

3.3.1 Precisão.....	pág. 74
3.3.1.1 Repetibilidade.....	pág.74
3.3.1.2 Reprodutibilidade	pág. 76
3.3.2 Exactidão	pág. 77
3.3.3 Incerteza	pág. 78
3.3.3.1 Incerteza da exactidão.....	pág. 78
3.3.3.2 Incerteza da precisão.....	pág. 79
3.3.3.3 Incerteza Combinada.....	pág. 80
3.3.3.4 Incerteza Expandida	pág. 80
4. Conclusões.....	pág.81
5. Bibliografia.....	pág. 85

Índice Figuras

1.1	Esquema representativo do ciclo de azotos.....	pág. 5
1.2	Esquema de tratamento de uma ETAR	pág. 9
1.3	Agitador mecânico vertical.....	pág. 13
1.4	Equipamento de destilação da Gerhardt®	pág. 14
1.5	Distribuição de F.....	pág. 20
1.6	Gráfico de distribuição normal.....	pág. 22
3.1	Gráfico de dispersão com regressão linear referente à curva de calibração de azoto amoniacal	pág. 46
3.2	Gráfico de dispersão com regressão polinomial referente à curva de calibração de azoto amoniacal.....	pág. 47
3.3	Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 31-08-2016	pág. 50
3.4	Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 29-08-2016	pág. 50
3.5	Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 22-12-2015	pág. 51
3.6	Gráfico de dispersão com regressão linear referente à curva de calibração de azoto nítrico.....	pág. 61
3.7	Gráfico de dispersão com regressão polinomial referente à curva de calibração de azoto nítrico.....	pág. 62
3.8	Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 27-06-2016	pág. 65
3.9	Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 10-03-2016	pág. 65
3.10	Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 13-09-2016	pág. 66

Índice Tabelas

2.1 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões da recta de calibração (azoto amoniacal)	pág. 35
2.2 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões de controlo (azoto amoniacal)	pág. 36
2.3 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões da recta de calibração (azoto nítrico)	pág. 37
2.4 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões de controlo (azoto nítrico)	pág. 38
3.1 Concentrações referentes à gama de trabalho	pág. 44
3.2 Resultados das absorvâncias dos dez ensaios dos dois padrões dos extremos da curva de calibração.....	pág. 44
3.3 Resumo de dados e resultados do teste aos Outliers (Teste de Grubbs)	pág. 45
3.4 Valores obtidos e cálculos para determinação da linearidade do método ...	pág. 48
3.5 Valores obtidos e cálculos para determinação da linearidade do método (continuação).....	pág. 48
3.6 Compilação de valores do padrão de 0,839 mg N/L (limite de quantificação) com respectiva média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (%CV).....	pág. 49
3.7 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho do dia 31-08-2016.....	pág. 49
3.8 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho do dia 29-03-2016.....	pág. 50
3.9 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho do dia 22-12-2015.....	pág. 51
3.10 Valores referentes ao LD calculado a partir das três curvas de calibração e média dos três valores.....	pág. 51
3.11 Estudo de repetibilidade do padrão de 0,839 mg N/L em três dias distintos	pág. 52
3.12 Estudo de repetibilidade do padrão de 3,729 mg N/L em três dias distint .	pág. 53

3.13 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 0,839 mg N/L em dez dias distintos	pág. 54
3.14 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 3,729 mg N/L em dez dias distintos	pág. 54
3.15 Cálculo do ensaio de recuperação para dez dias diferentes com padrões alternados (padrão 0,839 mg N/L e padrão 1,631 mg N/L)	pág. 55
3.16 Cálculo da incerteza de exactidão associada aos ensaios de recuperação do método	pág. 56
3.17 Determinação da precisão intermédia do método para o padrão referente ao limite de quantificação	pág. 57
3.18 Cálculo da média, desvio padrão, coeficiente de variação e desvio padrão residual da precisão.....	pág. 58
3.19 Determinação da precisão intermédia do método para os duplicados de ensaio	pág. 58
3.20 Média de amplitudes, desvio padrão, coeficiente de variação e precisão do método, associados aos valores obtidos na tabela 3.18.....	pág. 59
3.21 Concentrações referentes à gama de trabalho	pág. 60
3.22 Resultados das absorvâncias dos dez ensaios dos dois padrões dos extremos da curva de calibração.....	pág. 60
3.23 Resumo de dados e resultados do teste aos Outliers (Teste de Grubbs)	pág. 60
3.24 Valores obtidos e cálculos para determinação da linearidade do método .	pág. 63
3.25 Valores obtidos e cálculos para determinação da linearidade do método (continuação).....	pág. 63
3.26 Compilação de valores do padrão de 0,4 mg NO ₃ /L (limite de quantificação) com respectiva média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (%CV).....	pág. 64
3.27 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho do dia 27-06-2016.....	pág. 64
3.28 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho do dia 10-03-2016.....	pág. 65
3.29 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho do dia 13-09-2016.....	pág. 66

3.30 Valores referentes ao LD calculado a partir das três curvas de calibração e média dos três valores.....	pág. 66
3.31 Estudo de repetibilidade do padrão de 0,4 mg NO ₃ /L em três dias distintos	pág. 67
3.32 Estudo de repetibilidade do padrão de 5,0 mg NO ₃ /L em três dias distintos	pág. 68
3.33 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 0,4 mg NO ₃ /L em dez dias distintos	pág. 68
3.34 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 5,0 mg NO ₃ /L em dez dias distintos	pág. 69
3.35 Cálculo do ensaio de recuperação para dez dias diferentes com padrões alternados (padrão 0,4 mg NO ₃ /L, padrão 1,0 mg NO ₃ /L e 3,0 mg NO ₃ /L).....	pág. 70
3.36 Cálculo da incerteza de exactidão associada aos ensaios de recuperação do método	pág. 71
3.37 Determinação da precisão intermédia do método para o padrão referente ao limite de quantificação	pág. 72
3.38 Repetibilidade do padrão de 187 g/kg (pesagem de 0,01g)	pág. 74
3.39 Repetibilidade do padrão 187 g/Kg (pesagem de 0,1g)	pág. 75
3.40 Repetibilidade da padronização do titulante (HCl 0,1N).....	pág. 75
3.41 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 187 g/Kg (pesagem de 0,01 g) em dez dias distintos.....	pág. 76
3.42 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 187 g/Kg (pesagem de 0,1 g) em dez dias distintos.....	pág. 76
3.43 Cálculo do ensaio de recuperação para dez dias diferentes com o padrão 187 g /Kg (pesagem de 0,01 g).....	pág. 77
3.44 Cálculo da incerteza de exactidão associada aos ensaios de recuperação do método	pág. 78
3.45 Determinação da precisão intermédia do método para o padrão referente ao limite de quantificação	pág. 79

Abreviaturas

ISQ – LABQUI: Instituto Soldadura e Qualidade – Laboratório de Química e Ambiente;

MOA: Monooxigenase do amoníaco;

OHA: Oxidoreductase da hidroxilamina;

Oni: Oxidade do nitrito;

OD: Oxigénio Dissolvido;

pH: potencial de hidrogénio;

ETAR: Estação de tratamento de águas residuais;

D.L.: Decreto – Lei;

UV – Vis: Ultravioleta – Visível;

Tal e qual: amostra nas exactas condições em que foi colhida;

NP: Norma Portuguesa;

EN: Norma Europeia;

ISO: Norma internacional;

LQ: Limite de quantificação;

LD: Limite de detecção;

CV: Coeficiente de variação;

s: desvio padrão;

MRC: Materiais de referência certificados;

EIL: Ensaio interlaboratoriais;

NIST: National Institute of Standards and Technology;

US EPA: US Environmental Protection Agency;

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry;

Rm: Recuperação média;

IPAC: Instituto Português da Acreditação;

1 Introdução

O estudo desta tese de mestrado foi realizado no Laboratório de Química e Ambiente (LABQUI) do ISQ – Instituto de Soldadura e Qualidade. O ISQ é uma associação científica e tecnológica, privada, sem fins lucrativos e com 50 anos de actividade. Os seus serviços estendem-se ao nível de inspecção, ensaio, formação e consultoria técnica. No LABQUI realizam-se ensaios de análises químicas, controlo ambiental e alimentar.

Devido à importância que o azoto reflecte no nosso ecossistema e, conseqüentemente nas nossas vidas, o ISQ – LABQUI decidiu revalidar três métodos de quantificação das diferentes fontes de azoto que as matrizes lamas e solos possam ter: azoto amoniacal, azoto nítrico e azoto total.

1.1 Azoto

O azoto é um dos elementos essenciais para os seres vivos e para a vida na Terra. Está presente em diversos materiais orgânicos, comida, fertilizantes, explosivos, entre outros [1]. Este elemento em excesso e sobre determinadas formas químicas é prejudicial para o ambiente.

A sua capacidade de se combinar ou fixar a outros compostos confere-lhe um dos principais papéis no ambiente, sendo utilizado em diferentes aplicações: é utilizado como composto de fertilizantes (nitrato de amónia) e como explosivos (produção de ácido nítrico e nitratos a partir de amónia), entre outras aplicações [2].

O azoto é também um dos principais constituintes das estruturas dos medicamentos provenientes de alcalóides, tais como a morfina e diversos antibióticos, bem como nitroglicerina e nitroprussiato, os quais actuam ao nível da regulação da pressão arterial, e a nível cardíaco mimetizando a acção do óxido nítrico (vasodilatador) [2].

1.1.1 O ciclo do azoto

O azoto [3] é um dos principais nutrientes para a sobrevivência dos organismos, mas não é no estado gasoso que é acessível à maioria dos organismos.

Apenas quando o azoto é convertido de azoto molecular gasoso (N_2) para amoníaco (NH_3) é que se torna acessível a alguns organismos, tais como as plantas (processo de fixação do azoto)

O azoto, também existe no ecossistema, na forma orgânica (aminoácido e ácido nucleico) para além da inorgânica (nitrato e nitrito) [4].

Ao longo do seu ciclo as principais transformações do azoto são (Esquema 1):

- A. Fixação do azoto (N_2 para NH_3)
- B. Nitrificação (NH_3 para NO_2^-)
- C. Desnitrificação (NO_3^- para N_2)

D. Amonificação (Azoto Orgânico para NH₃)

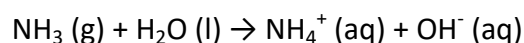
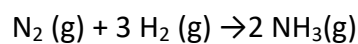
As diversas alterações de estado de oxidação do azoto são a componente chave na sua produtividade na biosfera, estando esta produção dependente das diversas actividades dos diferentes microorganismos (bactérias e fungos).

A. Fixação do Azoto

O primeiro passo do ciclo do azoto ocorre por acção microbiológica, ou seja, através de organismos procariontes¹ (cianobactérias). Estas irão converter o azoto em amoníaco e amónio, sendo este último utilizado pelas plantas na sua nutrição [1].

Como o azoto gasoso é uma molécula muito estável, será necessário uma elevada quantidade de energia para quebrar a ligação (N≡N). Assim, só um reduzido número de procariontes (por exemplo cianobactérias, rizóbios, pseudomonas, entre outros) será capaz de tal conversão [1].

Reacção 1



B. Nitrificação

A nitrificação é uma etapa do ciclo corresponde à oxidação biológica do amónio em nitrito e posteriormente em nitrato. Estas reacções ocorrem sob condições aeróbias² e com ajuda de duas espécies de bactérias autotróficas³: as *Nitrosomonas* (reacção 2) e as *Nitrobacter* (reacção 3).

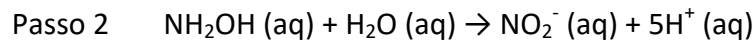
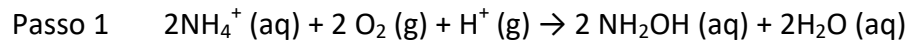
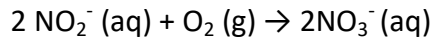
No primeiro passo da reacção, o amónio é oxidado a nitrito (estado de oxidação **-3** para **+3**). Esta oxidação ocorre pela formação do intermediário hidroxilamina, originando posteriormente o nitrito.

Este processo requer a intervenção de duas enzimas diferentes: monooxigenase do amoníaco (MOA) e a oxidoreductase da hidroxilamina (OHA). Ambas tem como função a catalisação: a primeira (MOA), catalisa a oxidação do amónio a hidroxilamina. Esta é depois convertida em nitrito, tendo a OHA como catalisador. Na segunda etapa da reacção, a enzima oxidase do nitrito (Oni) catalisa a reacção de oxidação do nitrito a nitrato, passando do estado de oxidação **+3** para **+5**. [1].

¹ Organismo procarionte: organismo unicelular simples, sem compartimentos no interior da célula e sem núcleo verdadeiro. O seu ADN está disperso pelo citoplasma.

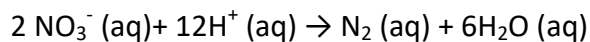
² Aeróbio: Na presença de oxigénio.

³ Bactérias autotróficas são bactérias capazes de produzir o seu próprio alimento via fotossíntese ou quimiossíntese.

Reacção 2**Reacção 3****C. Desnitrificação**

Na fase de desnitrificação ocorre a redução biológica do nitrato a azoto molecular (passa do estado de oxidação +5 para zero), em ambiente anóxico⁴. Os nitratos irão funcionar como aceitadores finais dos electrões provenientes da fonte de carbono disponível [1].

O azoto gasoso (N₂) irá ser o produto final desta reacção biológica, no entanto, existem compostos intermediários no estado gasoso, tais como o óxido nitroso que contribuem para o aumento da poluição do ar (gás com capacidade para provocar rápido aumento do efeito de estufa interagindo com o ozono) [3].

Reacção 4

Contrariamente ao processo de nitrificação, esta etapa do ciclo ocorre através de um processo anaeróbio⁵ (ocorre em solos, sedimentos e zonas anóxicas de lagos e oceanos).

Semelhante ao processo de fixação do azoto, a desnitrificação é realizada maioritariamente por organismos procariontes.

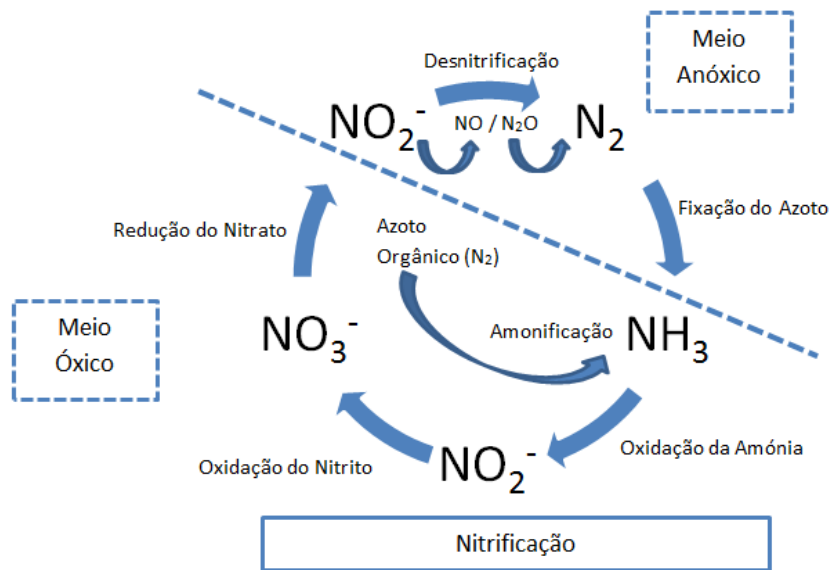
Este processo é importante no ciclo do azoto pois remove o azoto fixo no ecossistema (nitrato) para a atmosfera numa forma biologicamente inerte (N₂) [3].

D. Amonificação

Quando um organismo excreta ou morre, o azoto existente nos seus tecidos encontra-se sob a forma de azoto orgânico. Este azoto é decomposto por diversos fungos e bactérias, libertando azoto inorgânico novamente para o ecossistema sob a forma de amónia. Esta irá ser aproveitada pelas plantas e outros microorganismos no seu crescimento.

⁴ Ambiente biológico na ausência de oxigénio mas na presença de nitrato ou sulfato.

⁵ Anaeróbio: Ausência de oxigénio.



1.1 Esquema representativo do ciclo de azotos

1.1.2 Factores que afectam os diferentes processos do ciclo

O ciclo dos azotos decorre em torno do processo de nitrificação e desnitrificação. Tal como descrito pormenorizadamente no ponto anterior, o processo de nitrificação baseia-se na passagem de azoto molecular (N₂) a amoníaco (NH₃)/amónio (NH₄⁺) e este a nitrito (NO₂⁻), obtendo-se por fim o nitrato (NO₃⁻). Neste último ocorre a desnitrificação, obtendo-se novamente azoto molecular (N₂).

Durante estes dois processos, o ciclo pode sofrer alterações devido à interferência de outros factores [3].

1.1.2.1 Factores que afectam o processo de nitrificação

O processo de nitrificação ocorre para que as bactérias autotróficas possam obter energia a partir da oxidação do amónio a nitritos e a oxidação destes a nitratos.

Assim, para o desencadear destas oxidações, é necessário garantir a existência de condições para que ocorra o crescimento bacteriano. Os factores que afectam o seu crescimento são a temperatura, a alcalinidade do meio e a concentração de oxigénio dissolvido (OD) [1].

➤ Temperatura

A temperatura óptima para que a velocidade de crescimento das *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* (reacção 1 do ponto 1.2) esteja garantida e, conseqüentemente, para que

ocorra o processo de nitrificação, varia entre 35 °C e 42 °C. No entanto, a partir de uma temperatura de 25 °C já poderá ocorrer a oxidação.

A temperaturas muito elevadas (acima de 45 °C), a actividade bacteriana diminui substancialmente.

➤ Alcalinidade do meio

A libertação de iões de hidrogénio, aquando da conversão do amónio a nitrato diminui o teor de alcalinidade do meio. Por cada grama de amónio removido no processo de nitrificação, consomem-se cerca de 7,14 g de alcalinidade, expressa em Carbonato de Cálcio.

Num efluente, o mínimo recomendado de teor de alcalinidade é de cerca de 50 mg CaCO₃/L, no entanto, é preferível manter os seus valores superiores a 100 mg CaCO₃/L. Caso o teor de alcalinidade do meio seja muito baixo, poder-se-á recorrer à adição de químicos, tais como hidróxido de sódio ou bicarbonato. Quanto ao pH do meio deverá situar-se entre 6,5 e 8,0 na escala de Sorensen.

➤ Oxigénio Dissolvido (OD)

Como as bactérias intervenientes no processo de nitrificação são inteiramente aeróbias (crescem na presença de oxigénio dissolvido), a velocidade do processo dependerá do teor de oxigénio dissolvido existente no meio.

Baixos níveis de oxigénio dissolvido afectam negativamente a velocidade da reacção de oxidação, sendo por isso recomendado um teor de oxigénio dissolvido superior ou igual a 2,0 mg O₂/L de modo a garantir a velocidade máxima.

1.1.2.2 Factores a afectar processo de desnitrificação

Este passo do ciclo do azoto é realizado através de bactérias heterotróficas⁶, sendo por isso um processo menos sensível às condições ambientais. No entanto, para que a reacção seja completa, é necessário ter em conta diversas condições, nomeadamente no pH, temperatura e oxigénio dissolvido [1]:

➤ pH

O processo de desnitrificação desencadeia-se num extenso intervalo de pH. Contudo, a velocidade máxima da reacção é obtida com o pH do meio entre 7.0 e 7.5.

➤ Temperatura

A velocidade do processo de desnitrificação aumenta com o aumento da temperatura até aos 35 °C. A sua velocidade é muito reduzida a uma temperatura inferior a 5°C.

⁶ Bactérias Heterotróficas: Bactérias que utilizam carbono orgânico como alimento, contrariamente às bactérias autotróficas que realizam fotossíntese

➤ Oxigénio Dissolvido

O oxigénio molecular inibe a formação da enzima que participa no processo de desnitrificação (nitrato reductase).

Concentrações de oxigénio dissolvido superiores ou iguais a 0,2 mg O₂/L irão reduzir a taxa de desnitrificação, visto a energia dispendida para obter oxigénio por quebra da molécula de nitrato ser maior do que a energia dispendida na utilização de oxigénio, pelo que os microorganismos irão utilizar preferencialmente o oxigénio molecular, caso este esteja presente na concentração mínima.

1.2 Tratamento de águas residuais

O tema desta tese centra-se no teor das diferentes formas de azoto numa lama ou solo, no entanto, estas análises provêm de um tratamento necessário das águas residuais.

Neste ponto será descrito resumidamente, o processo de funcionamento de uma ETAR para permitir uma melhor compreensão da origem das lamas em análise.

O tratamento das águas residuais é um processo necessário para garantir a qualidade ambiental e impedir riscos para a saúde pública. Para que tal ocorra, foi necessário implementar parâmetros de controlo e criar legislação que mantenha as exigências de qualidade da água do rio e as exigências referentes às descargas nos colectores. É necessário legislar não só os limites de emissões tanto à saída de uma ETAR como os limites de emissão das correntes líquida e sólida [5].

Numa água residual é habitual encontrar-se materiais sólidos de grandes dimensões, matéria orgânica, óleos e gorduras que provocam a formação de espuma nas superfícies do meio hídrico, nutrientes como fontes de azoto e fósforo provenientes de fertilizantes, bactérias patogénicas e outras substâncias tóxicas provenientes de efluentes industriais [6].

Mediante a sua origem pode ter-se dois tipos de águas residuais: domésticas, resultante da actividade habitacional e industriais, proveniente de descargas de indústria ou estabelecimentos.

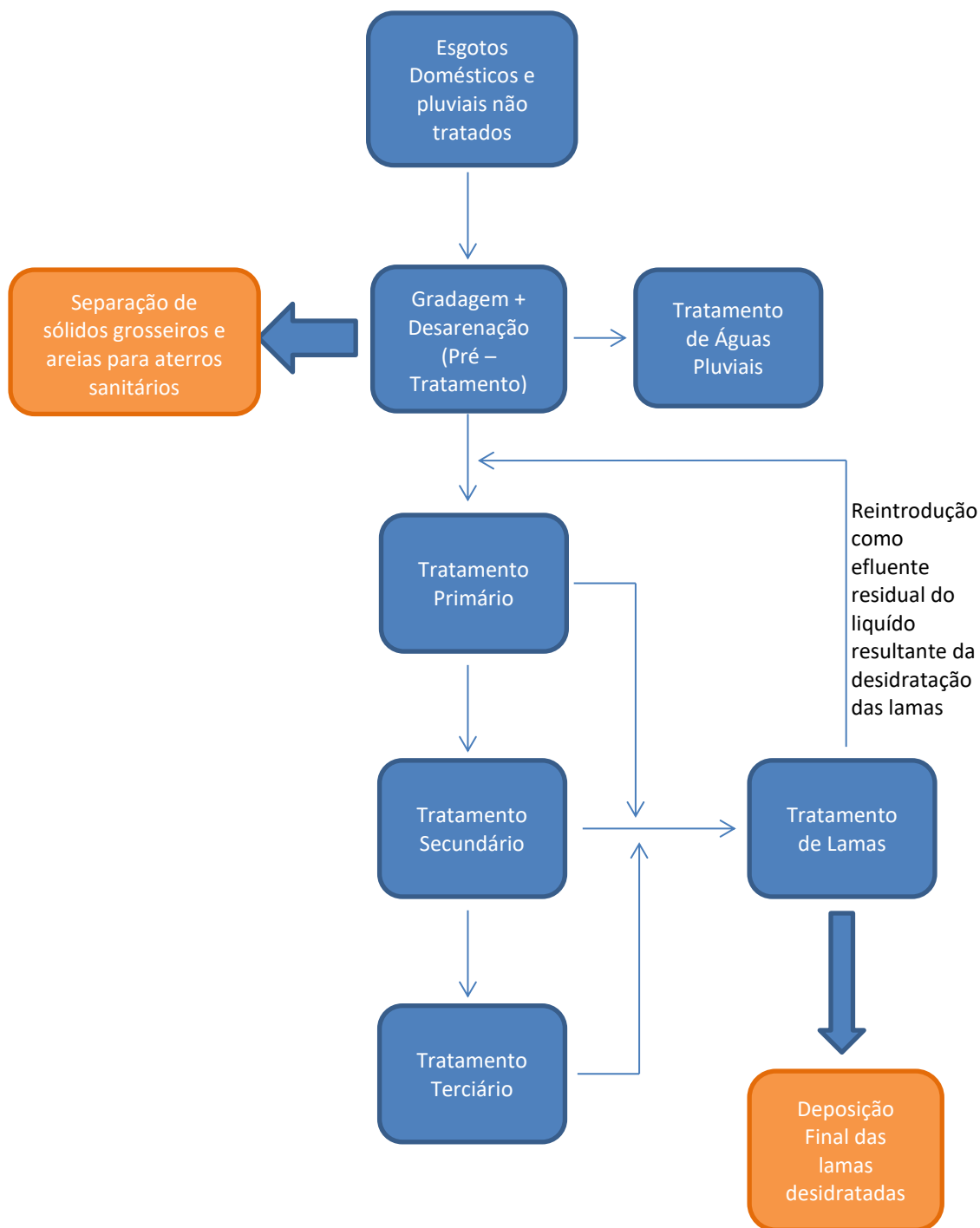
A ETAR é constituída por três fases de tratamento: fase líquida, fase de lamas e fase de gás [6].

Na fase líquida ocorrem três tipos de tratamento [6]:

- Pré – tratamento: através de processos físicos, removem-se os sólidos grosseiros, as areias e as gorduras do afluente bruto;

- Tratamento Primário: através de processos físicos (sedimentação e flotação) removem-se sólidos orgânicos e inorgânicos de menores dimensões. Neste tratamento, formam-se as lamas primárias;
- Tratamento secundário: este tratamento é realizado num reator biológico. Nesta fase efectua-se a oxidação de compostos de carbono e a remoção dos nutrientes (azoto e fósforo). As lamas que se desenvolvem neste reator – lamas biológicas – irão ser separadas do efluente tratado através de um segundo processo de sedimentação. O efluente tratado será encaminhado para última fase de tratamento;
- Tratamento terciário: A última etapa de tratamento da fase líquida é constituída pela desinfecção do efluente através de radiação ultravioleta, inactivando os microorganismos ainda presentes no efluente tratado;
- Espessamento de lamas: este espessamento é efectuado graviticamente nos espessadores de lamas primárias. O espessamento das lamas biológicas é efectuado por flotação, injectando-se ar. A mistura destas duas lamas origina lamas mistas;
- Digestão anaeróbia: as lamas mistas provenientes da etapa anterior, serão enviadas para os digestores primários, onde irão sofrer um processo de digestão na ausência de oxigénio. Irá ocorrer a degradação da matéria volátil com a duração de 22 dias e originará a produção de biogás;
- Digestão secundária e gasómetro: neste digestor ocorre a sedimentação das lamas e a separação entre o biogás e as lamas;
- Desidratação de lamas: as lamas digeridas irão sofrer um processo de centrifugação para desidratação com a adição de um reagente que irá minimizar o teor de água existente nas lamas. A parte líquida irá ser reintegrada novamente no processo inicial da ETAR e será tratada como os restantes efluentes, enquanto as lamas desidratadas serão armazenadas em silos de lamas onde serão posteriormente enviadas para valorização agrícola.

De modo a facilitar a compreensão do processo de tratamento de águas residuais, encontra-se o esquema da figura 2.



1.2 Esquema de tratamento de uma ETAR

1.3 Análises Químicas

Após tratamento das águas residuais e, posterior deposição de lamas por parte das estações de tratamento, é necessário aplicar determinadas análises químicas para que as deposições sejam realizadas com cumprimento do exigido legalmente. É necessário garantir que as lamas não irão prejudicar a qualidade do ambiente, em especial das águas e dos solos e, não irão constituir um risco para a saúde pública (D.L 276/2009 – [5]).

A legislação aplicada, permite ainda, a utilização destas lamas em solos agrícolas, sob o pressuposto de cumprirem a legislação.

No que respeita ao ciclo do azoto, a legislação obriga que sejam analisados os teores de azoto total, azoto nítrico e azoto amoniacal. Não existem valores limite para estes parâmetros, no entanto, é referido que se deverá ter como referência as tabelas previstas no documento técnico relativo a fertilização de culturas a divulgar pelo Instituto Nacional de Recursos Biológico [6].

Para ser possível quantificar o teor das diferentes fontes de azoto, é necessário proceder a um pré-tratamento da amostra, quando da colheita, bem como a processos de preparação das amostras para possível quantificação.

1.3.1 Pré-tratamento das amostras

Para ser possível quantificar o teor de azoto amoniacal, azoto nítrico e azoto Kjeldahl em lamas é necessário realizar um pré – tratamento da amostra, nomeadamente um processo de lixiviação ou um processo de digestão, seguido de destilação. Este pré-tratamento é necessário para que a amostra esteja nas condições necessárias para realizar-se a sua quantificação em equipamentos próprios (pelo método de espectrofotometria de UV-Vis ou pelo método de titulimetria).

Antes de qualquer um destes processos é necessário determinar o teor de matéria seca da amostra para que a pesagem referente a cada análise a contabilize [7]. Este passo é necessário pois os três métodos iniciam-se com um processo de pesagem das amostras sólidas. Estas pesagens serão contabilizadas no cálculo final. Caso, os valores não sejam registados com base no teor de matéria seca, será contabilizada a sua massa por excesso e não o seu verdadeiro teor de amostra.

1.3.2 Colheita e preservação da amostra

A colheita e preservação de uma amostra, cuja finalidade seja a realização da sua análise química, é de extrema importância. Uma colheita e preservação mal executada, comprometerá a fiabilidade dos resultados obtidos.

Para realizar a análise dos três métodos e após a colheita da amostra, esta deverá ser transportada de imediato, de modo a que as análises sejam iniciadas com a maior brevidade possível. Durante o seu transporte, deverá evitar-se um aumento de temperatura da própria amostra, pois tal poderá provocar alterações de factores biológicos ou actividade química [8].

Caso não seja possível a análise imediata, dever-se-á armazenar as amostras a 4 °C, se for analisada em três dias. Em alternativa, poderá ser congelada a uma temperatura de - 20 °C, permitindo assim o seu armazenamento durante várias semanas sem que ocorra alteração do teor de azoto existente [9].

No caso do congelamento deve ter-se sob controlo a temperatura e duração do processo de descongelamento:

- Caso se descongele à temperatura ambiente, deve extrair-se as amostras em 4 horas após o início do descongelamento;
- Caso se coloque a descongelar a uma temperatura de 4 °C, o período de descongelamento não poderá ultrapassar as 48 horas.

A amostra deverá ser analisada exactamente nas mesmas condições em que foi colhida, sem sofrer qualquer tipo de secagem pois este processo provoca a dissipação da amónia livre, conduzindo a resultados errados por defeito. O teor de matéria seca (explicado no ponto 1.3.3) será aplicado somente no cálculo final.

1.3.3 Determinação do teor de matéria seca

Para determinar o teor de matéria seca [7], coloca-se na estufa um cadinho de porcelana (previamente seco a $105 \text{ °C} \pm 5 \text{ °C}$) com uma quantidade de amostra suficiente (de modo a obter-se uma massa superior a 0,5g de amostra seca) a $105 \pm 5 \text{ °C}$, até a amostra estar totalmente isenta de água (normalmente permanece durante a noite) [7]. Repetir o processo no dia seguinte em intervalos de 30 minutos até obter-se peso constante (massa pesada não pode diferir mais de 0,002 g ou 0,5% entre pesagens). Antes da pesagem, a amostra deverá arrefecer num excicador à temperatura ambiente.

O teor de matéria seca é obtido pelo cálculo da razão entre o cadinho com a amostra seca e o cadinho com a amostra tal e qual⁷:

⁷ Amostra nas exactas condições em que foi colhida, sem secagem nem qualquer tipo de tratamento.

$$\% \text{ Matéria Seca} = \left[\frac{(m_{\text{cadinho com amostra seca}} - m_{\text{cadinho vazio}})}{(m_{\text{cadinho com amostra tal e qual}} - m_{\text{cadinho vazio}})} \right] \times 100 \quad (1.1)$$

1.4 Processo de lixiviação

A lixiviação é um processo que consiste numa extracção sólido-líquido [10], onde se removem um ou mais constituintes solúveis provenientes de um sólido, através de um solvente líquido (específico para o analito em estudo). O analito irá ser solúvel no solvente escolhido e, conseqüentemente, ser extraído ao sólido. Este irá difundir-se no solvente e permitir assim a sua extracção, através de um processo de agitação rotacional e por um determinado período de tempo.

Como exemplos deste processo temos a remoção do açúcar à beterraba, tendo a água quente como solvente e a remoção de sais de níquel ou ouro ao seu sólido original através de soluções de ácido sulfúrico [10].

No caso do analito em estudo para esta tese ir-se-á utilizar uma solução de cloreto de potássio.

O processo de lixiviação engloba, tal como resumido anteriormente, três etapas:

1. Mudança de fase do soluto à medida que se dissolve no solvente;
2. A difusão do soluto pelo solvente a partir dos poros do sólido para o exterior das partículas;
3. Transferência das partículas do soluto existentes na solução para o solvente.

As duas últimas etapas são as determinantes da solução. Para se aumentar a solubilidade e minimizar as limitações de transferência de massa, o tipo de sistema para o processo de lixiviação tem que ter em conta os efeitos do solvente, da temperatura, da agitação e do tamanho da partícula [11].

- Tamanho da partícula

Quanto menor o seu tamanho, maior a área superficial de contacto entre o sólido e o líquido e, conseqüentemente, maior a velocidade de transferência de massa.

Para atingir uma dissolução uniforme e facilitar a separação de fases, dever-se-á limitar a escolha do tamanho das partículas [11].

- Temperatura

A solubilidade dos solutos sólidos aumenta com a temperatura. O coeficiente de difusão irá aumentar com o seu aumento, esperando-se que influencie positivamente a velocidade de dissolução.

No entanto, algumas considerações secundárias tais como as reacções do soluto podem limitar a operacionalidade da temperatura [11].

- Agitação

A agitação normalmente melhora a difusão, reduzindo a limitação de transferência de massa e, conseqüentemente, aumentando a velocidade de dissolução. Deve ser aplicada uma agitação vigorosa do sólido unicamente para partículas finas [11].

- Solvente

Dever-se-á escolher um bom solvente. Este tem que ser selectivo e apresentar uma baixa viscosidade para permitir a sua livre circulação.

Normalmente, inicia-se a extracção com o solvente puro, no entanto, à medida que a extracção prossegue, a concentração do soluto aumentará e a taxa de extracção irá diminuir progressivamente pois o gradiente de concentração diminuirá e a solução ficará mais viscosa [12].

Existem três tipos de sistemas de lixiviação: a infiltração estacionária (realizado num depósito ou em vários depósitos colocados em contracorrente, com as bases perfuradas, capazes de suportar partículas sólidas, mas permitindo a drenagem da solução). A base móvel (como por exemplo o extractor de Bollman [13] e o extractor de Hildebrandt) [14]. A utilização de agitadores mecânicos verticais [15]. O terceiro sistema de lixiviação referido, será o aplicado no nosso estudo [16].

Os agitadores são bastante utilizados para dispersar e lixiviar partículas finas. A dispersão das partículas pode ser obtida quer por agitadores mecânicos, quer por mistura de fluxo. O resíduo obtido do processo de lixiviação é separado da solução por decantação ou por filtração .

No presente trabalho foi utilizado um agitador mecânico (figura 3), seguindo-se um processo de decantação.



1.3 Agitador Mecânico Vertical [15]

1.5 Processo de separação da amostra - Destilação

A maioria dos parâmetros analisados no decorrer deste estudo (Azoto Amoniacal e Azoto Total) necessitam, após o processo de lixiviação ou digestão, de um processo de destilação [17], [18] e [19]. Mais especificamente uma destilação por arrastamento de vapor.



1.4 Equipamento de destilação da Gerhardt® [20]

A destilação é um processo no qual um líquido ou uma mistura de vapores de duas ou mais substâncias são separados nos respectivos componentes, através da aplicação e remoção de calor. Este processo baseia-se na elevada volatilidade dos componentes da mistura inicial [12].

Existem diversos processos de destilação, no entanto, os mais utilizados são os processos de destilação simples, fraccionada, através de vácuo ou por arrastamento vapor. O processo de destilação por arrastamento de vapor foi a técnica aplicada ao nosso estudo.

Esta técnica [21] é, usualmente, aplicada na destilação de compostos orgânicos devido à sua capacidade separativa de compostos a baixas temperaturas (baixo ponto de ebulição), evitando a sua decomposição.

Algumas moléculas apresentam um ponto de ebulição elevado, no entanto, a mistura irá entrar em ebulição (tornando-se volátil) quando a pressão de vapor da mistura igualar a pressão atmosférica (Lei de Dalton). O vapor de água produzido no sistema, é conduzido para a mistura em agitação, obrigando as moléculas a evaporarem, sendo posteriormente condensadas e separadas da mistura inicial [22].

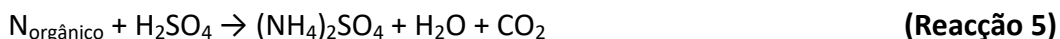
No estudo aplicado, o ião amónio (NH_4^+) irá reagir com a solução tampão borato, convertendo-o em amónia (NH_3), durante o processo de destilação (após sofrer o processo de lixiviação e decantação). Serão as moléculas de NH_3 que irão sofrer um aumento da pressão de vapor e evaporar, recondensando no processo final da destilação de modo a recuperar o teor de amónio em solução. O amónio destilado é recolhido num balão com ácido bórico para formar um complexo amónio-borato e permitir assim a quantificação de ião NH_4^+ .

1.6 Processo de Digestão

No caso da determinação do teor de azoto total, a fase inicial de tratamento da amostra é o processo de digestão à placa.

Este processo consiste em adicionar ácido sulfúrico concentrado à amostra, reguladores de ebulição e solução catalisadora. A mistura é digerida em placa de aquecimento. Os detalhes do seu procedimento estão descritos no ponto 2.3.2 desta tese.

A equação geral desta reacção é dada por:



O processo de digestão tem como principal objectivo a conversão do azoto orgânico existente na amostra em sulfato de amónio. A esta reacção é adicionado um catalisador para que a temperatura de ebulição do ácido sulfúrico aumente, acelerando o processo de conversão do azoto orgânico em sulfato de amónio (catalisador de selénio: sulfato de sódio anidro e selénio em pó) [23].

1.7 Espectrofotometria de Absorção Molecular de UV-Visível

Após conclusão do processo de preparação da amostra, estamos em condições de caracterizar as amostras com os reagentes necessários, de modo a ser possível a sua quantificação.

No caso da determinação de azoto amoniacal e azoto nítrico, a sua quantificação é efectuada por espectrofotometria de absorção molecular UV-Visível.

A espectrofotometria UV – Visível está enquadrada na área da espectrofotometria de absorção, na zona espectral do ultravioleta ao visível. Nesta região electromagnética, os átomos e as moléculas sofrem transições electrónicas (devido à absorção de energia) do estado fundamental para o estado excitado [12].

Este método é muito aplicado em análise quantitativa, pois permite a determinação de concentrações de espécies em solução que sejam absorvidas, aplicando-se a lei de Lambert – Beer.

Esta lei refere que a absorvância de uma solução é directamente proporcional à concentração das espécies absorvidas existentes na solução, sendo também proporcional ao seu percurso óptico [12]:

$$A = \varepsilon b c = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (1.2)$$

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (1.3)$$

Sendo que,

A = Absorvância medida (A);

ε = Absortividade Molar do Analito ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$);

b = percurso óptico (cm);

c = concentração do analito (mol/L = M);

I_0 = intensidade da luz monocromática incidente na solução a um comprimento de onda específico;

I = intensidade da luz monocromática transmitida;

T = Transmitância (%).

1.8 Validação de Métodos de ensaio

A validação de um método analítico é de extrema importância em química analítica. Esta validação facultá-nos provas documentadas e estudadas de que, um determinado método de ensaio aplicado em laboratório, é fiável e que, analisa exactamente o pretendido, com a precisão e exactidão exigidas [24].

*A validação é a confirmação, através de exame e apresentação de evidência objectiva, de que os requisitos específicos relativos a uma dada utilização pretendida são satisfeitos.*⁸

A validação de um método analítico engloba o estudo de vários componentes, tais como:

1. Gama de trabalho;
2. Linearidade;
3. Homogeneidade de variâncias;
4. Limites de Detecção e de Quantificação;
5. Precisão;

⁸ Definição de validação de métodos pela ISO 17025 (ponto 5.4.5.1)

6. Exactidão;
7. Cálculo da incerteza.

Sempre que um laboratório pretende validar um método de ensaio, deverá desenvolver estudos que poderão contemplar os pontos acima mencionados. Existem outros estudos possíveis de realizar, tais como, estudo de interferentes, robustez, entre outros. Os estudos aplicados dependem do método em causa e das referências bibliográficas que o laboratório dispõe. Existem métodos que, à semelhança do método em estudo de determinação de azoto total, não contemplam a gama de trabalho, a linearidade e a homogeneidade de variâncias (Sólidos Suspensos Totais, Oxidabilidade, entre outros).

No caso de um método já implementado e validado, sempre que ocorra uma alteração relevante ao processo de validação, a mesma deverá ser re-analisada e implementada no processo de validação já existente.

De acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, um laboratório deverá validar [25]:

- ✓ Métodos não normalizados: métodos não incluídos na definição de método normalizados (métodos integralmente desenvolvidos pelo laboratório);
- ✓ Métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização previsto;
- ✓ Extensões ou modificações de métodos normalizados.

Neste tópico, ir-se-á abordar pormenorizadamente cada um dos factores necessários à validação de um método de ensaio.

Os passos analíticos necessários para realizar eficazmente um estudo de um método são os referidos pela ISO 8466 Parte 1 [26], no que diz respeito ao estudo da gama de trabalho e limites analíticos, para processos onde se recorre ao ajuste linear.

1.6.1 Gama de Trabalho

Ao ter-se um analito em estudo e ao pretender-se quantificá-lo, é necessário atribuir uma gama de trabalho onde é possível quantificar várias concentrações, desde a menor concentração possível (limite de quantificação). Esta gama é construída através da preparação de padrões de concentração (soluções diluídas com diferentes volumes do analito em estudo).

O teor de analito nas amostras irá enquadrar-se e comportar-se do mesmo modo que uma determinada concentração da nossa gama, sendo possível a sua identificação. Idealmente, deverá ser criada uma gama de trabalho onde a concentração de analito se enquadre no meio da gama escolhida.

A gama de trabalho deverá incluir pelo menos cinco padrões, cujo primeiro padrão deverá ser designado por, ensaio do branco (sem padrão adicionado, incluindo apenas o solvente e os reagentes necessários a cada método),

seguindo-se o padrão referente ao limite de quantificação e assim sucessivamente, terminando no extremo superior da gama com o padrão cuja concentração seja a mais elevada [27].

Os valores de sinal obtidos deverão estar correlacionados linearmente com as concentrações escolhidas para a gama de trabalho. Tal implica que o padrão referente ao limite de quantificação seja distinguível do ensaio do branco.

1.6.2 Linearidade

O estudo da linearidade aplica-se a analitos analisados em situações cuja concentração dependa da resposta de um determinado equipamento (espectrofotómetros, cromatógrafos, entre outros).

Os padrões preparados com diferentes concentrações irão ser lidos nestes equipamentos obtendo-se uma resposta em sinal (absorvância, área, carga do ião, entre outros).

Construindo um gráfico xy, onde a abcissa será a concentração do analito em estudo e a ordena será a resposta instrumental, ter-se-á condições de traçar uma linha de regressão linear, permitindo obter uma equação de primeiro grau:

$$y = mx + b \quad (1.4)$$

A partir desta equação retiramos o valor do declive da reta, e a partir do gráfico obtemos o coeficiente de correlação (r), que nos indica a interdependência entre o sinal medido e as concentrações dos respectivos padrões. A partir do gráfico obtemos diretamente o coeficiente de determinação (r^2) e a partir deste obtemos o coeficiente de correlação pretendido ($r = \sqrt{r^2}$). Este coeficiente de determinação traduz a adequabilidade de um modelo linear aos valores experimentais, assumindo-se que a obtenção de $r^2 = 1,000$ é a situação ideal, onde a resposta do sinal é totalmente linear e directamente proporcional à concentração de padrão [24].

Contudo, torna-se arriscado afirmar-se que uma recta é linear apenas com inspecção visual e valor de coeficiente de correlação. É necessário efectuar-se um teste estatístico – teste de Mandel [26].

Neste teste, os dados da calibração serão aplicados no cálculo de uma função de calibração linear e numa função de calibração quadrática não linear. Em ambas as funções temos os desvios padrão residual identificados por s_{y1} e s_{y2} , respectivamente. Aplica-se o cálculo da diferença de variâncias (DS^2):

$$S_{y1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y - y_i)^2}{N-2}} \quad (1.5)$$

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y - y_i)^2}{N-3}} \quad (1.6)$$

$$DS^2 = (N - 2)s_{y1}^2 - (N - 3)s_{y2}^2 \quad (1.7)$$

Os graus de liberdade referentes à função de calibração linear são subtraídos por “2”, tratando-se de uma equação de 1º grau, com duas constantes (a e b). No caso da função de calibração não linear estamos perante uma equação de 2º grau (função quadrática), com três constantes (a , b e c).

Em seguida calcula-se o valor PG (valor experimental), o qual por comparação com o teste F (valor teórico), permite obter conclusões acerca da linearidade da recta em estudo [26]. No caso do presente trabalho, considerou-se uma probabilidade de 99%, à semelhança do definido na norma ISO 8466-1 [26]. Os graus de liberdade são: 1 para o numerador (por se tratar de uma equação matemática $N - 2 - N + 3 = 1$) e $N - 3$ para o denominador, visto estarmos perante uma equação do 2º grau com 3 constantes.

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (1.8)$$

A comparação do valor obtido com o valor teórico de F ($F_{\text{teórico}}$) conduz a duas possíveis decisões:

- Se $PG \leq F_{\text{teórico}}$: a função de calibração não necessita de ajustamento, logo, a função de calibração é linear;
- Se $PG > F_{\text{teórico}}$: a gama de trabalho deverá ser ajustada de modo a permitir a aplicação de uma função de calibração linear.

1.6.3 Homogeneidade de variâncias

A homogeneidade referida avalia a variância entre o padrão mais alto (X_{10}) e o padrão mais baixo da curva (X_1).

Para esta análise replica-se dez vezes o padrão mais elevado e dez vezes o padrão mais baixo da gama de trabalho, obtendo-se 10 sinais (y_i) como resposta do equipamento para cada padrão [26].

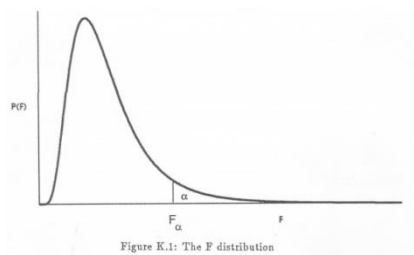
Os resultados são obtidos através das equações seguintes:

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n-1} \quad (1.9)$$

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \text{ para } i = 1 \text{ ou } i = 10 \quad (1.10)$$

Os resultados das variâncias são depois testados pelo Teste F (teste de F-Snedecor).

O teste F é uma distribuição assimétrica que possui um valor mínimo de zero mas nenhum valor máximo. A curva do gráfico (figura 5) atinge o seu pico máximo não muito longe da direita do zero e, gradualmente, aproxima-se do eixo horizontal (abscissa) com o aumento do valor de F. Esta distribuição aproxima-se mas nunca iguala a o eixo dos xx (abscissa). Consideram-se os graus de liberdade do numerador (d_1) e do denominador (d_2). Em cada combinação destes graus de liberdade ocorre uma distribuição de F diferente.



1.5 Distribuição de F: No eixo horizontal temos o valor de F com uma probabilidade correspondente no eixo vertical. A área α representa o nível de confiança para esta distribuição.

No estudo da homogeneidade de variâncias, iremos ter dez leituras de cada padrão dos extremos da gama, teremos os mesmos graus de liberdade para (d_1) e (d_2), ou sejam $d_1 = d_2 = n-1$. Assim obtemos o $F_{\text{teórico}}$, no entanto, este terá que ser comparado com o F_{obtido} ou PG :

$$PG = \frac{s_{10}^2}{s_1^2} \quad \text{para } s_{10}^2 > s_1^2 \quad (1.11)$$

O valor obtido deste cálculo poderá conduzir a duas conclusões possíveis:

- Se $PG \leq F(d_1; d_2; 0,99)$ então a diferença entre s_{10}^2 e s_1^2 não é significativa;
- Se $PG > F(d_1; d_2; 0,99)$ então a diferença entre s_{10}^2 e s_1^2 é significativa.~

No caso de estarmos perante a conclusão b) ter-se-á que encurtar a gama de trabalho até a diferença entre as variâncias não ser significativa. Ou seja, não temos homogeneidade de variâncias e a gama terá que ser ajustada.

1.6.4 Limites de Detecção e de Quantificação

1.6.4.1 Limite de Quantificação

Na escolha de uma gama de trabalho adaptada ao método de análise, inicia-se sempre a gama com o padrão zero referente ao ensaio em branco, como referido no ponto 1.6.1. Em seguida, prossegue-se com um padrão cuja concentração deverá corresponder à menor concentração a partir da qual é possível a quantificação do analito em estudo, com respectiva exactidão e precisão. A este padrão designamos de limite de quantificação (LQ).

Para testar a exactidão e precisão deste padrão é necessário analisar a repetibilidade do mesmo bem como a precisão intermédia, preparando e analisando várias vezes a mesma concentração de padrão, de modo a garantir que se consegue quantificar a mesma. Neste estudo, o coeficiente de variação (CV – razão entre o desvio padrão e a média dos valores obtidos) não deverá exceder os 10%. Este passo poderá ser suficiente, caso se trate de uma revalidação e o limite de quantificação já esteja implementado em rotina. Este cálculo do coeficiente de variação servirá apenas para confirmar o LQ.

Existem três formas de sabermos qual o limite de quantificação que podemos obter, na implementação de um método analítico:

1. Realizando várias análises do branco (normalmente 10 a 20 vezes), preparados independentemente e lidos em diferentes dias de trabalho para aproximar o melhor possível da rotina do método, calcular a média destes ensaios (\bar{X}_0) bem como o desvio padrão associado (σ_0). Em seguida efectuar o cálculo seguinte:

$$LQ = \bar{X}_0 + 10\sigma_0 \quad (1.12)$$

2. Através da análise de um conjunto de brancos fortificados onde são testados em condições de precisão intermédia e onde irão sofrer estudos de exactidão (erro relativo) e precisão (coeficiente de variação).

Assim adoptar-se-á como valor do LQ a concentração utilizada na fortificação do branco ou na preparação dos padrões vestígio. Para tal, o erro relativo e o coeficiente de variação não poderão exceder os 10%.

É um método muito aplicado nas técnicas cromatográficas. Onde, através da razão sinal/ruído, considera-se o valor do LQ como a solução cujo sinal seja dez vezes o valor do ruído.

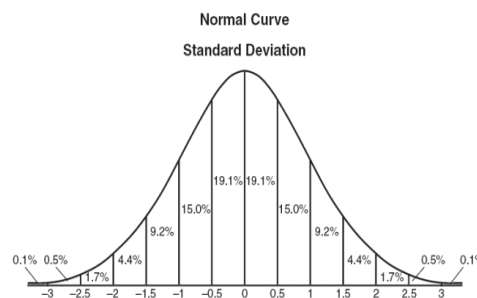
3. Quando temos uma calibração linear podemos calcular o LQ a partir do desvio padrão residual da curva de calibração (S_{y1}) e dividir pelo declive (b) da mesma:

$$LQ = \frac{S_{y1}}{b} \times 10 \quad (1.13)$$

Esta terceira opção será a aplicada no nosso estudo de revalidação.

1.6.4.2 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) é o valor de concentração mínimo que permite detectar a presença do analito em estudo com uma certeza somente estatística. No entanto, este valor não é possível de quantificar com a exactidão e precisão necessárias para garantir o valor de concentração obtido.



1.6 Gráfico de distribuição normal

Qualitativamente o LD irá corresponder à concentração mínima, que permitirá distinguir do branco (contém somente a matriz mas não o analito).

De um modo geral, calcula-se o valor do LD através do mesmo raciocínio aplicado ao cálculo do LQ, no entanto, em vez de multiplicarmos o desvio padrão por 10, multiplicamos por 3,3.

Este 3,3 provém da lei da probabilidade e assumindo que, estamos perante uma distribuição normal⁹ (curva gausseana).

⁹Distribuição normal: Distribuição em forma de sino, simétrica em relação à sua média, onde, a probabilidade de uma observação assumir um valor entre dois pontos quaisquer é igual à área compreendida entre esses dois pontos.

1.6.5 Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes com repetição sobre a mesma amostra ou padrão, cujas condições estão igualmente e previamente definidas.

Existem duas metodologias, já referidas anteriormente, para analisar a precisão de um método:

1.6.5.1 Repetibilidade

Este método traduz a análise de ensaios realizados sobre a mesma amostra, laboratório, analista, equipamento, tipo de reagentes e em pequenos intervalos de tempo.

Para analisar a repetibilidade temos que determinar o coeficiente de variação (CV_r) para cada concentração analisada e expresso em percentagem. Este cálculo é dado pelo desvio padrão (S_r) a dividir pela média de valores considerados, multiplicando por 100.

Este valor não pode, na maioria dos métodos, exceder os 10%:

$$CV_r = \frac{S_r}{Média} \times 100 \quad (1.14)$$

1.6.5.2 Reprodutibilidade

Este método traduz a análise de ensaios realizados sobre uma mesma amostra mas variando o analista e realizando a análise em dias diferentes.

Aplicam-se os mesmos cálculos utilizados na repetibilidade: coeficiente de variação (CV_R) com base nos dados de desvio padrão e média dos valores considerados. O critério de aceitação é, na maioria dos métodos, o mesmo: 10%.

1.6.6 Exactidão

A exactidão indica a proximidade do valor obtido em relação ao valor de referência (valor cujo resultado conhecemos) e é expressa em termos de erros: erros aleatórios e erros sistemáticos. Estes erros terão que ser inferiores aos intervalos de confiança estimados [24].

A exactidão pode ser avaliada por diversos processos tais como: análise de materiais de referência (MRC), participação em ensaios interlaboratoriais e análise de ensaios de recuperação. Pode também ser avaliada através de testes comparativos, ou seja, comparação dos resultados obtidos por um determinado método com outro método de referência.

Os MRC são fornecidos ao laboratório por organismos reconhecidos e fiáveis tais como a NIST [28], a IRMM [29], a US EPA [30], entre outros. No caso dos ensaios interlaboratoriais existem diversas entidades tais como, Relacre [31], LGC – Standards [32], Bipea [33], entre outros.

Os resultados obtidos pelo laboratório deverão ser comparados com os valores certificados do MRC ou com as informações fornecidas, pelas entidades que fornecem os ensaios interlaboratoriais. Para tal utilizam-se os cálculos estatísticos do erro absoluto, erro relativo, z-score, erro normalizado e testes de hipóteses (teste t-student):

➤ Erro Absoluto (E)

Diferença entre o valor obtido (X_o) e o valor aceite como verdadeiro (X_v):

$$E = |X_o - X_v| \quad (1.15)$$

➤ Erro Relativo (Er)

Quociente entre o erro absoluto (E) e o valor aceite como verdadeiro (X_v), expresso em percentagem (%):

$$\% Er = \frac{|X_o - X_v|}{X_v} \times 100 = \frac{E}{X_v} \times 100 \quad (1.16)$$

➤ z – score

O z-score é um cálculo estatístico, utilizado na avaliação dos ensaios interlaboratoriais. Este é expresso pela diferença entre o valor obtido (X_o) e o valor aceite como verdadeiro (X_v), dividindo pela incerteza associada ao EIL e fornecida pela entidade (S):

$$z = \frac{(X_o - X_v)}{S} \quad (1.17)$$

A avaliação deste cálculo é, de acordo com as entidades ISO [34] e IUPAC [35], avaliada do seguinte modo:

- $|z| \leq 2$, obtem desempenho satisfatório;
- $2 < |z| \leq 3$ obtem desempenho Questionável;
- $|z| > 3$ obtem mau desempenho.

➤ Teste de hipóteses – teste t-student

O teste t é um teste estatístico de hipóteses, onde o mesmo segue uma distribuição *t-student*, sob uma hipótese nula. Por outras palavras, aplicando o exemplo de um ensaio interlaboratorial ou um ensaio de recuperação, quando se tem a hipótese de comparar o valor obtido com o valor correcto ou concluir o quanto diferem entre si, aplica-se o teste t. Assume-se que se tratam de distribuições normais e compara-se o valor experimental com um valor teórico [24].

Seja qual for a situação temos sempre que colocar duas hipóteses de resposta H_0 (hipótese nula) e H_A (hipótese alternativa):

- A hipótese nula (H_0): assume-se que não existe diferença significativa entre a média e o valor previamente conhecido;
- A hipótese alternativa (H_A): assume-se que existe uma diferença significativa entre os valores.

No que diz respeito ao valor teórico, o mesmo é obtido com um intervalo de confiança dado por $(1 - \alpha)$, com α referente ao intervalo de confiança aplicado (usualmente aplica-se 95%, no entanto, no presente trabalho aplicou-se 99%). O valor teórico pode ser consultado em tabelas referentes a este teste, onde se cruza o intervalo de confiança (usualmente aplica-se 95%, no entanto, no presente trabalho aplicou-se 99%) com o número de graus de liberdade (número de ensaios menos dois: $n-1$).

Nos pontos 3.1.6, 3.2.6 e 3.3.6 ir-se-á aplicar este teste permitindo demonstrar as diferentes hipóteses existentes e conduzir a uma maior compreensão sobre o tema.

Iremos aplicar o teste *t* à análise dos ensaios de recuperação, sendo por isso aplicado o teste t para diferenças (amostras emparelhadas) [24].

Neste teste, ir-se-á utilizar o resultado das diferenças entre o valor de fortificação obtido e o valor de fortificação teórico.

Calcula-se o t_{exp} pela equação seguinte:

$$t_{exp} = \frac{D_m}{S_m} \times \sqrt{N} \quad (1.18)$$

Onde S_m será o desvio padrão associado à média das diferenças; D_m a média das diferenças e N o número de ensaios realizados.

Compara-se o valor de t_{exp} (em valor absoluto) como t_{tab} para um determinado grau de confiança e para $(N - 1)$ graus de liberdade.

CONCLUSÃO: Caso t_{exp} seja inferior ou igual ao t_{tab} , os resultados obtidos pelos dois métodos não apresentam, estatisticamente, desvios significativos.

1.6.7 Incerteza

Um resultado de análise de um determinado laboratório é um valor estimado da mensuranda. A qualidade desta estimativa depende na incerteza inevitável que é inerente ao resultado de análise. Em teoria, a incerteza medida é uma propriedade de resultados de análise individuais.¹⁰

Todas as análises estão afectadas por um determinado erro. O cálculo da incerteza diz-nos a dimensão deste mesmo erro. Para ser efectuado o cálculo compilam-se os dados referentes à exactidão e à precisão do método, explicitados em itens anteriores [36].

A incerteza associada à precisão ($u_{precisão}$) está relacionada com os erros aleatórios que, tal como referido anteriormente, variam de ensaio para ensaio. No que diz respeito à incerteza associada à exactidão ($u_{exactidão}$) sabemos que a mesma está relacionada com os erros sistemáticos, que ocorrem em todos os ensaios [36].

Como a incerteza é referente ao resultado aproximado do seu valor verdadeiro, expressa-se como $X \pm U$, onde X é o valor obtido e U a incerteza associada [37].

Podemos realizar o cálculo da incerteza tendo como base os valores para:

- Precisão: através de reprodutibilidade intra-laboratorial, amostras de controlo de qualidade interno, padrões de controlo, duplicados de amostras;
- Veracidade: materiais de referência certificados (MRC), de ensaios interlaboratoriais, de ensaios de recuperação.

Existem diversos tipos de abordagem ao cálculo da incerteza, sendo enunciadas abaixo três métodos diferentes [37] :

- 1) Abordagem passo a passo;
- 2) Abordagem baseada em informação de ensaios interlaboratoriais;
- 3) Abordagem baseada em dados de validação e/ou controlo da qualidade do método analítico a nível intralaboratorial.

¹⁰ Definição do principio de incerteza medida pela ISO 11352:2012

Os laboratórios poderão aplicar outras abordagens, desde que as mesmas sejam válidas e aplicáveis ao método. Neste caso, iremos aplicar a abordagem 3).

Esta abordagem contempla a combinação das incertezas associadas à exactidão e à precisão do método:

- i) Determinação da incerteza associada à precisão [37]:

Para que a componente de incerteza associada à precisão seja o mais real possível, deve ser determinada em termos de precisão intermédia (desvio padrão de duplicados ou padrões de controlo, amplitude média relativa ou absoluta de duplicados de amostra, desvio padrão estimado a partir dos limites de uma carta de controlo de duplicados).

Caso o método contemple uma vasta gama de concentrações, deve-se estimar a incerteza padrão relativa da precisão ($u'_{\text{precisão}}$):

$$u'_{\text{precisão}} = \frac{S_{\text{precisão}}}{y} \quad (1.19)$$

Onde $S_{\text{precisão}}$ corresponde ao desvio padrão residual da precisão e y corresponde à amostra.

Caso o método seja aplicado a uma estreita gama de concentrações temos:

$$u_{\text{precisão}} = S_{\text{precisão}} \quad (1.20)$$

Os seus valores poderão ser estimados tendo como base os valores de duplicados ou valores obtidos pelos limites das cartas de controlo de padrões.

Para calcular o desvio padrão dos resultados ($s_{\text{precisão}}$) analisados em duplicado deve-se seleccionar uma amostra ou um padrão e efectuar, pelo menos, 15 medições, em dias diferentes (variando as condições ambientais e instrumentais bem como o operador).

Os valores aberrantes deverão ser detectados e eliminados, fundamentando as respectivas escolhas.

O cálculo de $s_{\text{precisão}}$ é dado por:

$$S_{\text{precisão}} = \sqrt{\frac{\sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}{n-1}} \quad (1.21)$$

Onde,

n = Número de duplicados;

y_k = Resultado do duplicado referente ao índice k ($k = 1$ a n);

\bar{y} = Média de todos os resultados y_k .

De acordo com a norma ISO 11352 [36], se os padrões de controlo sofrerem todo o processo analítico como as amostras reais, então apenas será necessário calcular a incerteza da precisão com os dados obtidos a partir dos padrões de controlo. Caso contrário, será necessário alargar o seu estudo aos duplicados de ensaio.

O cálculo da precisão aplicada aos ensaios em duplicado é dada pela seguinte equação:

$$S_{\text{precisão}} = \frac{\sqrt{\text{Amplitude média}}}{1,128} \quad (1.22)$$

ii) Determinação da incerteza associada à exactidão [37]:

Uma análise apresenta um determinado erro correspondente à diferença entre o resultado obtido e o resultado teórico. Este erro provém de erros sistemáticos (ocorrem em todas as medições) e de erros aleatórios (variam de ensaio para ensaio).

Os erros sistemáticos pode ser estimados através da análise de materiais de referência certificados (MRC) ou amostras fortificadas (Erecuperação).

No caso da análise através de MRC, o cálculo da incerteza é dado por:

$$u(\overline{R}_m) = \overline{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{\text{obtido}}^2}{n \times \overline{c}_{\text{obtido}}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{\text{MRC}})}{c_{\text{MRC}}}\right)^2} \quad (1.23)$$

Onde,

S_{obtido} = Desvio padrão referente à série de análises realizadas ao MRC;

n = Número de análises realizadas ao MRC;

$u(c_{\text{MRC}})$ = Incerteza padrão associada ao teor do MRC (referenciado no certificado do MRC).

No caso da exactidão ser avaliada tendo como base os ensaios de recuperação (ensaios fortificados com padrão de concentração conhecida), a incerteza associada é dada por:

$$u(\overline{R}_m) = \overline{R}_m \times \sqrt{\left(\frac{S_{\text{obtido}}^2}{n \times \overline{c}_{\text{obtido}}^2}\right) + \left(\frac{u(c_{\text{fortificada}})}{c_{\text{fortificada}}}\right)^2} \quad (1.24)$$

Onde,

S_{obtido} = Desvio padrão referente à série de análises de amostras fortificadas;

n = Número de análises realizadas de amostras fortificadas;

$u(C_{fortificada})$ = Incerteza padrão associada ao teor de amostras fortificadas.

Para confirmarmos que a incerteza calculada está bem determinada, aplica-se o cálculo do erro normalizado (En). Este é dado pela razão entre o erro sistemático e a incerteza do resultado do laboratório (U_{lab}) mais a incerteza associada ao valor verdadeiro (U_{ref}), ou seja,

$$En = \frac{(X_o - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (1.25)$$

Se $|En| < 1$ então a incerteza calculada pelo laboratório (U_{lab}) está bem estimada.

iii) Determinação da incerteza combinada e da incerteza expandida [37]:

A incerteza combinada engloba o cálculo da incerteza da componente de precisão e da componente de exactidão:

$$u_c = \sqrt{u_{precisão}^2 + u_{exactidão}^2} \quad (1.26)$$

Por fim, a incerteza expandida é dada por:

$$U = K \times u_c \quad (1.27)$$

Onde $K = 2$, correspondendo ao intervalo de confiança de 95%.

Os resultados deverão ser expressos como:

$$Resultado = y \pm U [unidades do ensaio] \quad (1.28)$$

Sendo que a incerteza reportada será a incerteza expandida e deverá ser apresentada, no máximo, com dois algarismos significativos.

2 Parte Experimental

2.1 Material

Para além do material e equipamentos correntes de laboratório foi utilizado um agitador mecânico (marca *Heidolph* e modelo *Reax 20*), uma centrifugadora (marca *MLW* e modelo *T54*), um destilador por arrastamento de vapor (marca *Gerhardt* e modelo *Vapodest*) e um espectrofotómetro de Ultravioleta – Visível (marca *Hitachi* e modelo *U2000*).

Todas as soluções foram preparadas utilizando sempre água ultrapura tipo II. O material de vidro utilizado foi de classe A da Normalab.

2.2 Reagentes

2.2.1 Azoto Amoniacal

Preparação de soluções:

Solução de cloreto de potássio 1,0 mol/L (74,55 g/L); solução de tetraborato de sódio 9,5 g/L ($\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$); solução tampão de borato constituída por 500 mL de solução de tetraborato de sódio 9,5 g/L e 88mL de NaOH 0,1N, para 1000 mL; solução de ácido bórico (H_3BO_3) 20 g/L; o reagente de Nessler que actua como reagente caracterizador, é preparado diariamente, pela adição de duas soluções comerciais: reagente de Nessler A (solução comercial de tetraiodomercurato (II) de potássio 0,09 mol/L) e Reagente de Nessler B (solução de hidróxido sódio). Para a preparação dos padrões da curva de calibração e dos padrões de controlo foram utilizadas duas soluções comerciais de Amónica 1000 mg NH_4^+ /L da marca Panreac de lotes diferentes.

2.2.2 Azoto Nítrico

Solução de cloreto de potássio 1,0 mol/L (74,55 g/L); solução de sulfato de brucina foi preparada em hotte, devido à sua elevada toxicidade: 1,0 g de Sulfato de Brucina (PA) com 0,1 g de Ácido Sulfanílico (PA) e 3 mL de Ácido Clorídrico 37% (PA), para 100 mL; a solução de ácido sulfúrico também foi preparada em hotte e com muito cuidado, devido à reacção violenta que resultada da sua preparação: 75 mL de água ultrapura e 500 mL de ácido sulfúrico concentrado. Os padrões da curva de calibração e padrões de controlo foram preparados a partir de duas soluções comerciais de nitratos de lotes diferentes, da marca Merck, com concentração de 1000 mg NO_3 /L.

2.2.3 Azoto Kjeldahl

Carbonato de sódio 0,05N (2,65 g/L); catalisador de Selénio: mistura de 1000 g de sulfato de sódio anidro e 50 g de selénio em pó; solução de hidróxido de sódio 500 g/L armazenado em frasco de polietileno; indicador misto preparado pela mistura de duas soluções: 200 mg de vermelho de metilo em 100 mL de álcool isopropílico ou álcool etílico a 95% e 100 mg de azul de metileno em 50 mL de álcool isopropílico ou álcool etílico a 95%; solução de ácido bórico 40g/L e 6 mL de indicador misto; ácido clorídrico (0,1 mol/L).

Foi ainda utilizado ácido sulfúrico concentrado e o reagente de glicina ($C_2H_5NO_2$), utilizado como padrão de azoto total no teste de eficácia do método.

2.3 Métodos Analíticos

2.3.1 *Azoto Amoniacal e Azoto Nítrico*

A determinação do teor de azoto amoniacal e do azoto nítrico em solos destinados a fins agrícolas é feita tendo como base na norma ISO 14256-1:2003 [9] para a preparação da amostra. No entanto, a quantificação dos analitos é realizada através de um método interno aplicado pelo laboratório, acreditado pelo IPAC. Visto o objectivo deste estudo ser a revalidação dos métodos, decidiu-se seguir a mesma prática já aplicada pelo laboratório.

2.3.1.1 Preparação da amostra

A amostra foi extraída com uma solução de cloreto de potássio 1 mol/L, numa proporção 1:5 em concentração de massa (0,2 g/mL), ou seja, por cada 40 g (pesado para frascos de polietileno) de amostra pesada adicionaram-se 200 mL:

$$[Amostra] = \frac{\text{massa pesada}}{\text{volume KCl adicionado}} = \frac{40 \text{ g}}{200 \text{ mL}} = 0,2 \text{ g/mL} \quad (2.1)$$

A extracção decorreu a uma temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, devido à elevada volatilidade dos compostos amoniacais, prevenindo assim potenciais perdas. Esta extracção contemplou um período de agitação mecanizada, seguida de centrifugação para posterior decantação. A agitação foi efectuada num lisímetro, em agitação rotatória (modo “cambalhota”) durante 1 hora.

Colocaram-se 60 mL da amostra extraída, num tubo de centrífuga e centrifugou-se durante 10 minutos a cerca de 3000 rotações por minuto (rpm). Em seguida decantou-se o sobrenadante obtido para erlenmeyers de vidro de 100 mL.

Para quantificar o teor de azoto nítrico e azoto amoniacal pelos respectivos métodos, procedeu-se do seguinte modo:

Em simultâneo com as amostras, preparou-se um ensaio em branco, onde se adicionou apenas a solução de cloreto de potássio 1 mol/L, ao frasco de polietileno e procedeu-se do mesmo modo que para uma amostra.

Após a extracção, analisou-se a solução assim que possível (nunca excedendo um dia após a extracção. Caso tal fosse necessário, dever-se-ia armazenar a solução extraída a uma temperatura inferior a 4°C, num período máximo de uma semana).

2.3.1.2 Quantificação do teor de azoto nítrico

Este método de determinação de azoto nítrico, é um método colorimétrico onde o ião nitrato (NO_3^-) reage com o sulfato de brucina, na presença de ácido sulfúrico, originando uma solução com uma cor amarelo pardo.

Tem como principais interferentes os reagentes fortemente oxidantes ou redutores que possam conduzir a reacção no sentido de formação de outras formas do ciclo de azoto.

Para iniciar a determinação do teor de azoto nítrico foi necessário começar por construir a curva de calibração, preparar os padrões de controlo da rotina de trabalho e só depois proceder à quantificação do teor de ião nitrato na amostra a analisar:

Prepararam-se quatro padrões de diferentes concentrações, para permitir a construção de uma curva de calibração que terá cinco pontos (o primeiro ponto será o ensaio em branco).

➤ **Solução intermédia (200 mg NO_3/L)**

Pipetou-se 20 mL de uma solução comercial 1000 mg NO_3/L para um balão volumétrico classe A, de 100 mL. Aferiu-se o balão com a solução de cloreto de potássio 1 mol/L.

➤ **Soluções para curva de calibração**

Todas as concentrações foram preparadas para balões de 100 mL e o volume de padrão foi retirado da solução intermédia (200 mg NO_3/L). Devido a aplicar-se posteriormente uma diluição de

factor 10 (retirou-se 5 mL da solução padrão para um balão volumétrico de 50 mL).

2.1 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões da recta de calibração

Volume a retirar de solução 200 mg NO₃/L perfazendo até 100mL com KCl (mL)	Concentração Final (mg NO₃/L)
0 mL	Ensaio em Branco
2mL	0,40
5mL	1,00
15 mL	3,00
25 mL	5,00

Colocaram-se os cinco balões em agitação durante 1 hora, deixando depois repousar durante 10 minutos.

Pipetaram-se 5 mL de cada uma destas concentrações, tal como referido anteriormente, para balões volumétricos de 50 mL, adicionando-se em seguida 1 mL de Solução de Brucina/Sulfanílico.

Pipetaram-se, para outros 5 balões volumétricos de classe A de 50 mL, 10 mL de solução de ácido sulfúrico.

Adicionou-se, lentamente, a solução de cada balão de um para o outro 6 vezes, para garantir total homogeneidade da mistura. Deixou-se repousar 10 minutos.

Por fim, aferiram-se os balões volumétricos de 50 mL com a solução de cloreto de potássio 1 mol/L. Deixando estabilizar durante 20 a 30 minutos.

Após decorrido os 30 minutos efectuaram-se as leituras das concentrações obtidas no espectrofotómetro de UV-Visível em célula de vidro de 1 cm e a um comprimento de onda de 410 nm.

➤ **Soluções para padrões de controlo**

Do mesmo modo, mas a partir de uma solução comercial com lote diferente da solução comercial, utilizada na preparação dos padrões de calibração, preparou-se a solução intermédia de 200 mg NO₃/L. Em seguida, efectuaram-se as diluições necessárias

para obter três concentrações, designadas de padrões de controlo:

2.2 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões de controlo

Volume a retirar de solução 200 mg NO₃/L perfazendo até 100mL com KCl (mL)	Concentração Final (mg NO₃/L)
0 mL	Ensaio em Branco
2 mL	0,40
15 mL	3,00
25 mL	5,00

Após esta preparação, procedeu-se do mesmo modo que para os padrões da recta.

➤ **Amostras**

Retiraram-se 5 mL do sobrenadante obtido na centrifugação para um balão volumétrico de 50 mL e, procedeu-se do mesmo modo que para os padrões de controlo e padrões da curva de calibração.

Para efeitos de controlo de qualidade, procedeu-se à análise da amostra em duplicado bem como a análise de um ensaio de recuperação.

O ensaio em duplicado foi preparado desde a fase inicial de preparação da amostra (pesagem e lixiviação).

No caso do ensaio de recuperação, pipetou-se, para um balão volumétrico de 100 mL, 2 mL da solução de controlo intermédia de 200 mg NO₃/L, de modo a obter-se o padrão de controlo de 0,4 mg NO₃/L. No entanto, em vez de se aferir com a solução de cloreto de potássio 1 mol/L, aferiu-se com a amostra a analisar o recuperado. Desta solução preparada, retirou-se 5 mL para um balão volumétrico de 50 mL e procedeu-se do mesmo modo que para as restantes amostras e padrões.

2.3.1.3 Determinação do Azoto Amoniacal

Este método de determinação de azoto amoniacal baseia-se na reacção do ião amónio (NH₄⁺), com o iodomercurato de potássio (conhecido comercialmente como reagente de Nessler) em meio básico, através da

formação de um complexo corado, o qual permite a sua determinação espectrofotométrica.

O método em estudo é susceptível de interferentes como a cor, turvação e substâncias que possam provocar turvação da amostra na presença do iodomercurato de potássio (cálcio, magnésio, ferro e sulfuretos). O processo de destilação é o indicado para eliminar estes interferentes.

Tal como na determinação do teor de azoto nítrico, iniciou-se a análise com a construção da curva de calibração, seguindo-se a preparação dos padrões de controlo, bem como a preparação das amostras a analisar.

A curva de calibração tem seis pontos, sendo que o primeiro ponto corresponde ao padrão do limite de quantificação. O ensaio em branco não será, neste método, ponto da curva de calibração.

➤ **Solução intermédia (150 mg NH₄⁺/L)**

Pipetou-se 15 mL de uma solução comercial 1000 mg NH₄⁺/L para um balão volumétrico classe A, de 100 mL. Aferiu-se o balão com a solução de cloreto de potássio 1 mol/L.

➤ **Soluções para curva de calibração**

Todas as concentrações foram preparadas para balões de 200 mL e o volume de padrão retirado da solução intermédia (150 mg NH₄⁺/L) é dado pela tabela 2.3:

2.3 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões da recta de calibração

Volume a retirar de solução 150 mg NH₄/L perfazendo até 200mL com KCl (mL)	Concentração Final (mg NH₄/L)
1,44	0,839
1,92	1,118
2,40	1,398
3,20	1,864
4,80	2,796
6,40	3,728

Agitaram-se os balões dos padrões da curva durante 1 hora e a uma temperatura de 20 °C, numa placa de agitação (a aproximadamente 300 rpm).

➤ **Soluções para padrões de controlo**

Do mesmo modo, mas a partir de uma solução comercial com lote diferente ao utilizado na preparação dos padrões de calibração, preparou-se a solução intermédia de 150 mg NH₄/L e, em seguida, efectuaram-se as diluições necessárias para obter três concentrações, designadas de padrões de controlo:

2.4 Diluições efectuadas para a preparação dos padrões de controlo

<i>Volume a retirar de solução 200 mg NH₄/L perfazendo até 100mL com KCl (mL)</i>	<i>Concentração Final (mg NH₄/L)</i>
0	Ensaio em Branco
1,44	0,839
2,80	1,631
6,40	3,728

Agitaram-se os balões dos padrões de controlo durante 1 hora e a uma temperatura de 20 °C, numa placa de agitação (a aproximadamente 300 rpm).

➤ **Amostras**

Para sabermos se a amostra seria analisada com ou sem factor de diluição, realizou-se um teste qualitativo prévio. Preparou-se um pouco de reagente de Nessler, tal como explicado anteriormente, e pipetaram-se algumas gotas deste reagente para copos de análise contendo um volume mínimo de sobrenadante das amostras resultantes da centrifugação. Consoante a coloração adquirida decidiu-se sobre as respetivas diluições.

Em seguida, para balões volumétricos de classe A de 200 mL, pipetou-se o volume de amostra necessário à análise. No caso de uma amostra sem qualquer diluição, o volume de amostra foi a totalidade do balão, ou seja, 200 mL. No caso de se aplicar diluição, o volume de amostra foi o necessário à diluição, sendo o balão aferido com a solução de cloreto de potássio 1 mol/L.

Para efeitos de controlo de qualidade e à semelhança da determinação de azoto nítrico, procedeu-se à preparação de

uma amostra em duplicado bem como de um ensaio de recuperação.

A amostra em duplicado provêm desde a pesagem da amostra, sendo controlado todo o processo de preparação de amostra até à determinação do teor de azoto amoniacal.

O ensaio de recuperação foi preparado após centrifugação da amostra, onde, para um balão volumétrico classe A de 200 mL, pipetou-se 2,80 mL de solução intermédia (obtendo-se um padrão de controlo de 1,631 mg NH_4/L) e aferiu-se o balão de 200 mL com o sobrenadante da amostra a analisar.

Os padrões da curva de calibração, os padrões de controlo e as amostras com respectivo controlo de qualidade sofreram o processo de destilação por arrastamento de vapor.

➤ **Processo de destilação**

Assegurou-se que o destilador se encontrava descontaminado através de uma lavagem com ácido clorídrico diluído (1 HCl:10 H_2O), seguindo-se outra lavagem somente com água ultrapura tipo II.

Em seguida realizou-se uma destilação com a solução de cloreto de potássio 1 mol/L (designado nos registos como branco destilado) e só depois se procedeu à destilação da curva de calibração, seguindo-se os padrões de controlo e por fim as amostras. Entre cada destilação realizada foi sempre efectuada uma destilação de lavagem com água ultrapura tipo II para evitar contaminações entre destilações.

No final de todas as destilações, procedeu-se à lavagem do destilador novamente com ácido diluído e finalizando com uma lavagem de água ultrapura tipo II.

No processo de destilação da amostra, adicionou-se 10 mL de solução tampão borato (diminui a hipótese de hidrólise de cianatos e de compostos de azotos orgânicos) aos 200 mL de amostra. Pipetou-se 20 mL de solução de ácido bórico (serve de absorvente do azoto amoniacal que está a ser destilado) para o balão volumétrico de classe A de 200 mL que irá recolher o destilado.

Este processo foi aplicado em todos os padrões (curva e controlo) bem como às amostras, duplicado e ensaio de recuperação.

➤ **Caracterização e leitura dos ensaios**

Após todos os ensaios estarem destilados, per fez-se, para balões volumétricos de classe A de 50 mL, todas as soluções destiladas, procedendo-se depois à caracterização de todos os balões com adição de 1 mL de reagente de Nessler. Por fim, agitaram-se os balões e deixou-se estabilizar durante 10 minutos para permitir o desenvolvimento da cor.

A leitura das soluções foi efectuada no espectrofotómetro de UV-Vis, em células de vidro de 1 cm a um comprimento de onda de 425 nm.

2.3.2 *Azoto Kjeldahl*

O método estudado para determinação do teor de azoto Kjeldahl é aplicável somente a lamas e tem como referência a norma EN 13342:2000 [38].

A amostra sofre uma rigorosa digestão ácida, na presença do catalisador de selénio. Esta digestão converte a maioria dos compostos azotados presentes na amostra em sulfato de amónio. Ao catalisador é adicionado sulfato de sódio anidro que ajuda a regular a temperatura de digestão.

Por fim a amostra digerida sofre um processo de destilação na presença de um excesso de ácido bórico, em condições alcalinas, onde a amónia libertada irá originar uma solução de borato de amónia.

➤ **Preparação da amostra**

Para a determinação deste analito, pesou-se uma quantidade conhecida de amostra para um balão de digestão. Como temos que ter em conta a percentagem de matéria seca e temos que pesar entre 0,25 g a 0,5 g de matéria seca, realizámos os cálculos necessários para saber quanto pesar de amostra tal e qual para obtermos o equivalente a 0,3g de matéria seca (valor aproximadamente a meio do intervalo exigido):

$$\text{Massa de amostra a pesar (g)} = \frac{100\% \text{ matéria seca} \times 0,3\text{g de amostra seca}}{\% \text{ de matéria seca}} \quad (2.2)$$

➤ **Processo de Digestão**

Adicionou-se ao balão de digestão cerca de 5 g de catalisador e duas ou três esferas reguladoras de ebulição.

Adicionou-se cuidadosamente, cerca de 10 mL de ácido sulfúrico, com ligeira agitação do balão de digestão.

Colocou-se o balão na placa de aquecimento, no interior de uma hotte, com um funil no topo para que os vapores formados sejam conduzidos até ao topo do balão sem ocorrer dispersão de fumos. Aqueceu-se ligeiramente para que a água que possa existir no balão, evapore e para que a espuma formada pela adição do ácido possa diminuir de volume.

Em seguida, aumentou-se a temperatura para que a ebulição se mantenha e para que o ácido sulfúrico refluxe, libertando fumos até meio do tubo do balão de digestão. Os fumos brancos que se libertam correspondem à libertação do trióxido de sulfúrico que se formou.

Quando a amostra ficou translúcida, contabilizou-se mais 60 minutos com a amostra em ebulição.

➤ **Processo de destilação**

Decorridos os 60 minutos, deixou-se o ensaio arrefecer e depois, cuidadosamente, adicionou-se água ultrapura tipo II até perfazer 2/3 do volume do balão de Kjeldahl, sempre com ligeira agitação para evitar a cristalização do ensaio digerido.

No processo de destilação, adicionou-se cerca de 50 mL de ácido bórico a um balão volumétrico classe A de 200 mL (balão de recolha de destilado).

Cuidadosamente, adicionou-se 30 mL de uma solução de hidróxido de sódio, originando a formação de duas fases e agitou-se ligeiramente para misturar as duas fases.

Iniciou-se o processo de destilação que colheu o destilado para um balão de 200 mL.

➤ **Processo de titulimetria**

O destilado foi depois titulado com ácido clorídrico 0,1 mol/L.

Durante a destilação, o ensaio ganha uma tonalidade verde, sendo depois titulado e passando a um tom purpura. Aquando desta mudança de cor, ocorre o ponto final da titulação, registando-se o volume gasto e procedendo-se ao cálculo da concentração de acordo com a equação seguinte:

$$N \left(\frac{g}{Kg} \text{ amostra seca} \right) = \frac{(V_1 - V_2) \times c \times 14,01}{(m \times W_{DR})} \times 100 \quad (2.3)$$

Onde,

V_1 – Volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

V_2 – Volume de HCl gasto na titulação do branco (mL);
C – Concentração de HCl (mol/L);
m – massa da amostra pesada tal e qual (g);
 W_{DR} – Matéria seca expressa em %.

➤ **Controlo de Qualidade Aplicado**

De modo a garantirmos a qualidade do ensaio realizado, procedeu-se à preparação de amostra em duplicado, bem como de um ensaio de recuperação, dois padrões e um ensaio em branco.

Todos estes testes sofrem o mesmo processo que as amostras, sendo que o ensaio em branco é substituído por cinco mL de água ultrapura tipo II.

Em relação aos padrões de controlo, pesou-se para dois balões de digestão, 0,1 g e 0,01 g de glicina. Obtendo assim dois padrões de 187 g/Kg. O primeiro padrão serviu para controlar o processo e eficácia de digestão, destilação e titulação. O padrão com uma pesagem superior serviu para controlar o volume de ácido gasto na titulação das amostras.

No caso do ensaio de recuperação, pesou-se a mesma massa que para a amostra, mas adicionou-se 0,01 g de glicina (0,00187 g de N) de modo a obter um ensaio de recuperação com o padrão de controlo do limite de quantificação.

O cálculo do ensaio de recuperação é dado por:

$$\text{concentração de padrão a recuperar} = \frac{0,00187 \times 1000}{\text{massa da amostra do ER pesada}} \quad (2.4)$$

➤ **Padronização do Ácido Clorídrico**

Para a quantificação de azoto Kjeldahl, a amostra é titulada com ácido clorídrico. Sempre que a análise é realizada, efectua-se a padronização do titulante HCl.

Este passo foi feito por titulação de 20 mL de carbonato de sódio 0,05 N com o ácido clorídrico como titulante.

A titulação foi realizada por determinação potenciométrica até pH = 4,5.

O valor da padronização é dado por:

$$\text{Padronização} = \frac{\text{Massa } Na_2CO_3 \text{ (g)} \times \text{Volume de } Na_2CO_3 \text{ (mL)}}{53 \times \text{Volume de HCl gasto (mL)}} \quad (2.5)$$

Foi analisado também, em simultâneo com a padronização, um teste do branco do título, ou seja, titulou-se 100 mL de água ultrapura tipo II, com ácido clorídrico. O branco não poderá ser aceite caso gaste acima de 0,25 mL de titulante HCl.

3 Revalidação dos métodos de ensaio

Os três métodos em estudo são acreditados pelo IPAC e já foram validados aquando da sua implementação em laboratório (em 2011 para o Azoto Amoniacal e Azoto Nítrico e, em 2012 para o Azoto Total). No entanto, foi necessário revalidá-los para nos certificarmos que os métodos ainda são aplicáveis nas matrizes de interesse: lamas e solos.

3.1 Revalidação do método para Azoto Amoniacal

3.1.1 Gama de trabalho

A escolha da gama de trabalho é uma etapa importante deste processo pois permite ao analista saber qual a gama de concentrações em que pode determinar o analito. Assim, será analisado com a precisão e exactidão exigida.

Este método apresenta uma gama de trabalho de 0,839 mg N/L a 3,728 mg N/L.

A sua curva de calibração é constituída pelos seguintes padrões:

3.1 Concentrações referentes à gama de trabalho

Referência Padrões	Concentração
P1	0,839
P2	1,118
P3	1,398
P4	1,864
P5	2,796
P6	3,728

Estes padrões deverão abranger toda a gama de trabalho de forma equidistante. Para que a mesma seja validada é necessário recorrer-se à análise do teste da homogeneidade de variâncias.

Este teste pode ser aplicado com base na ISO 8466-1 [26] Realizaram-se dez ensaios para cada um dos padrões dos extremos da gama (0,839 mg N/L e 3,728 mg N/L), obtendo-se a tabela seguinte:

3.2 Resultados das absorvâncias dos dez ensaios dos dois padrões dos extremos da curva de calibração

Padrão (mg N/L)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀
0,839	0.870	0.835	0.889	0.919	0.875	0.792	0.835	0.889	0.912	0.853
3,728	3.575	3.682	3.693	3.688	3.613	3.61	3.708	3.659	3.786	3.686

Após a leitura dos padrões, procedeu-se à verificação da existência dos *outliers*, aplicando o teste de Grubbs.

Um *outlier* é a existência de um valor discrepante obtido no decorrer de qualquer trabalho laboratorial. É considerado discrepante por ser diferente dos restantes resultados ou diferente do valor alvo.

O teste de Grubbs admite que estamos perante uma distribuição normal e que um determinado valor pode ser considerado discrepante se a sua distância à estimativa central for superior à distância do desvio padrão.

Calcula-se o seu valor (G) através da equação seguinte, onde \bar{x} é a média, s_x é o desvio padrão e $x_?$ é a hipótese nula de que o valor obtido não difere da estimativa central:

$$G = \frac{|x_? - \bar{x}|}{s_x} \quad (3.1)$$

O valor obtido é comparado com o valor crítico, para um intervalo de confiança de 99% e $n = 10$ valores.

Aplicando a teoria ao nosso estudo constata-se:

3.3 Resumo de dados e resultados do teste aos outliers (teste de Grubbs)

	P 0.839 mg N/L	P 3.728 mg N/L
Valor mínimo de absorvância	0.108	0.552
Valor máximo de absorvância	0.128	0.585
G_{obtido mínimo}	1.950	1.574
G_{obtido máximo}	1.355	1.936
G_{tabelado}	2.410	2.410

Com base na tabela 3.3 verifica-se que, **G_{tabelado}** é superior ao **G_{obtido mínimo}** e superior ao **G_{obtido máximo}** para os padrões referidos na tabela 3.3 e, como tal, conclui-se que os valores não são *outliers* e poderão ser todos utilizados no teste de homogeneidade de variâncias.

Neste estudo, calcularam-se as variâncias para os dois padrões, aplicando a equação (1.9) e obtendo-se $s_1^2 = 0.00152$ e $s_{10}^2 = 0.00357$ para o padrão de 0,839 mg N/L e 3,728 mg N/L respectivamente.

Com base nos valores obtidos, calculou-se o valor de F_{obtido} através da equação (1.11), comparando o seu valor obtido com o valor crítico tabelado para o teste de Fisher (para um intervalo de confiança de 99% e $n=10$).

Visto $F_{obtido} = 2,357082$ e o $F_{crítico} = 5,351129$, então, constata-se que existe homogeneidade de variâncias. Assim, confirma-se que a gama de trabalho está bem ajustada.

3.1.2 Linearidade

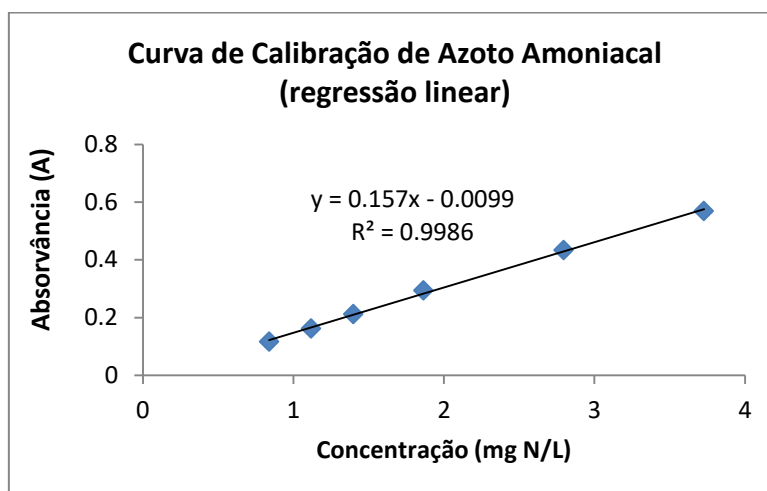
A curva de calibração ajuda-nos a relacionar as absorvâncias obtidas com as concentrações de analito que se pretende quantificar. Devido à importância das curvas de calibração, é necessário cumprir determinados critérios de aceitação existentes.

A linearidade do método analítico traduz a capacidade do método em obter resultados que são directamente proporcionais à concentração de analito, para a gama de trabalho aplicada.

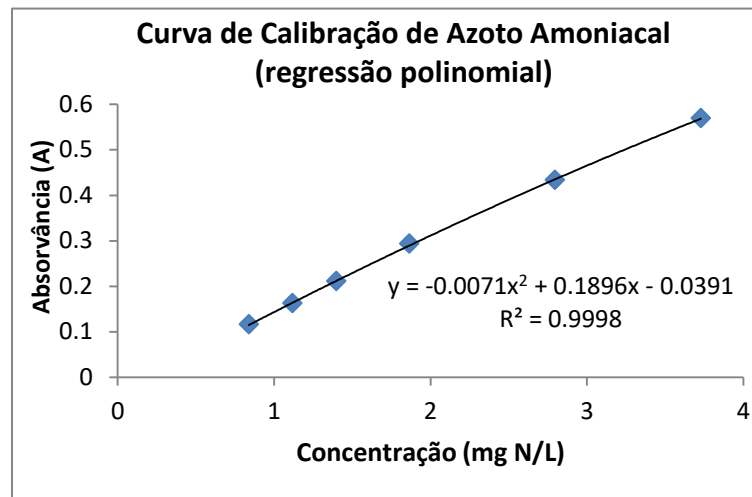
Tendo por base a ISO 8466-1 para análise de regressões lineares pelo método dos mínimos quadrados e construindo obrigatoriamente uma curva de calibração com, pelo menos, cinco pontos, determinou-se o coeficiente de correlação (r) e avaliou-se a linearidade através do modelo estatístico – teste de Mandel.

Apesar de se iniciar sempre a sessão de trabalho com a preparação e construção da curva de calibração ao longo deste estudo, apresentou-se apenas o cálculo para uma sessão de trabalho, a título de exemplo.

Após leitura dos padrões referentes à curva de calibração, transcreveu-se os resultados obtidos para uma folha de cálculo do excel e traçaram-se dois gráficos: um gráfico de dispersão com regressão linear e outro com regressão polinomial de 2º grau.



3.1 Gráfico de dispersão com regressão linear referente à curva de calibração de Azoto Amoniacal.



3.2 Gráfico de dispersão com regressão polinomial referente à curva de calibração de Azoto Amoniacal.

Analisando os dois gráficos constata-se que, visualmente, ambos são lineares. De ambos retiramos os valores das equações de 1º e 2º grau, bem como os valores dos coeficientes de determinação (r^2).

Um dos critérios de aceitação exigidos pelo método é a obtenção de um coeficiente de correlação (r) mínimo de 0,995. Este coeficiente corresponde a um coeficiente de determinação de $r^2 \geq 0,990$.

Analisando ambos os gráficos verifica-se um r^2 superior ao critério exigido.

Para confirmar a linearidade visual, aplicou-se um modelo estatístico – teste de Mandel. Foi necessário aplicar as equações (1.5) e (1.6) para determinar o valor de desvio padrão residual para a regressão linear e polinomial (Sy_1 e Sy_2 respectivamente). Os valores obtidos para ambos foram aplicados na equação (1.7) para determinar a diferença de variâncias (DS^2). A razão entre esta diferença e o quadrado do valor do desvio padrão residual da função polinomial (Sy_2^2) origina o valor teste (PG) dado pela equação (1.8).

O valor de PG foi comparado com o valor de $F_{\text{crítico}}$. Como $F_{\text{crítico}}$ é superior ao valor de PG obtido, constatou-se que a nossa curva de calibração apresenta linearidade, logo, o método em estudo apresenta uma função de calibração linear.

Os valores obtidos foram todos compilados na tabela seguinte, onde:

x = concentração mg N/L;

y = Absorvância medida;

y_1 = Absorvância calculada por regressão linear;

y_2 = Absorvância calculada por regressão polinomial

3.4 Valores obtidos e cálculos para a determinação da linearidade do método

\underline{x}	\underline{y}	y_1	y_2	$(y-y_1)^2$	$(y-y_2)^2$	$\Sigma (y-y_1)^2$
0.839	0.116	0.121823	0.114976561	3.39073E-05	1.04743E-06	0.000210496
1.118	0.162	0.165626	0.16399834	1.31479E-05	3.99336E-06	
1.398	0.211	0.209586	0.212084532	1.9994E-06	1.17621E-06	
1.864	0.293	0.282748	0.289645478	0.000105104	1.12528E-05	
2.796	0.433	0.429072	0.435516526	1.54292E-05	6.33291E-06	
3.728	0.569	0.575396	0.569053114	4.09088E-05	2.82105E-09	

3.5 Valores obtidos e respectivos cálculos para a determinação da linearidade do método (continuação)

\underline{x}	$\Sigma(y-y_2)^2$	S_{y1}	S_{y2}	DS^2	PG	$F_{\text{crítico}}$
0.839	2.38055E-05	0.007254242	0.002816945	0.000187	23.52695	34.11622
1.118						
1.398						
1.864						
2.796						
3.728						

3.1.3 Limite de Quantificação

Visto estarmos perante um método já validado e implementado, procedeu-se somente ao estudo do coeficiente de variação do limite de quantificação (LQ = 0,839 mg N/L), em termos de repetibilidade e precisão intermédia. Este coeficiente deverá ser inferior a 10%. Caso este critério seja cumprido, mantém-se o mesmo limite de quantificação. Caso não cumpra, será necessário recalcular o limite de quantificação, ajustando-o.

3.6 Compilação de valores do padrão de 0,839 mg N/L (limite de quantificação) com respectiva média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (%CV)

Data	Concentração (mg N/L)
31-08-2016	0.834
31-08-2016	0.828
25-08-2016	0.764
25-08-2016	0.803
21-06-2016	0.823
21-06-2016	0.842
13-05-2016	0.777
13-05-2016	0.810
28-04-2016	0.849
28-04-2016	0.832
Média	0.816
s	0.028
CV(%)	3.409

Analisando a tabela 3.6, como CV é inferior a 10%, o LQ mantém-se ajustado e deverá ser mantido.

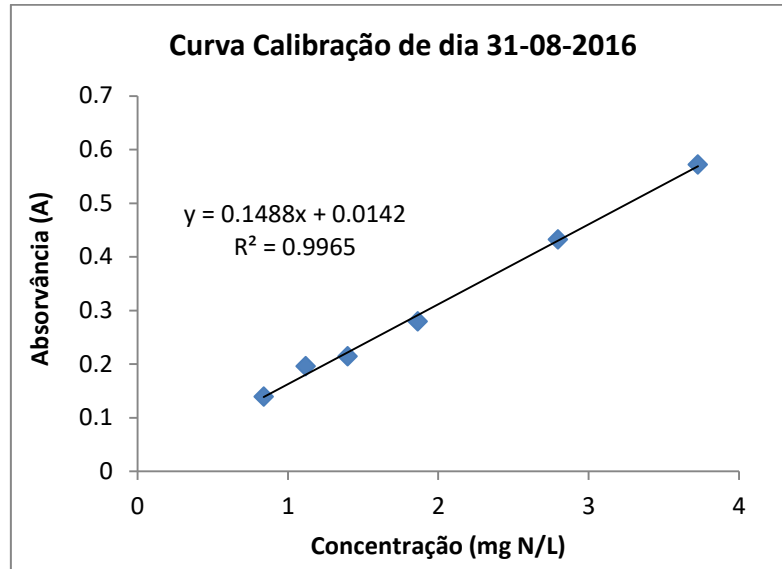
Por outro lado, supondo que o laboratório pretendia determinar um valor de LQ e LD, teria que o efectuar através dos dados fornecidos pelas curvas de calibração.

Assim, tendo por base três curvas de calibração, espaçadas no tempo, retirar-se-ia a informação necessária à determinação do LQ.

O limite de quantificação seria dado pela equação (1.13).

3.7 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho de dia 31-08-2016

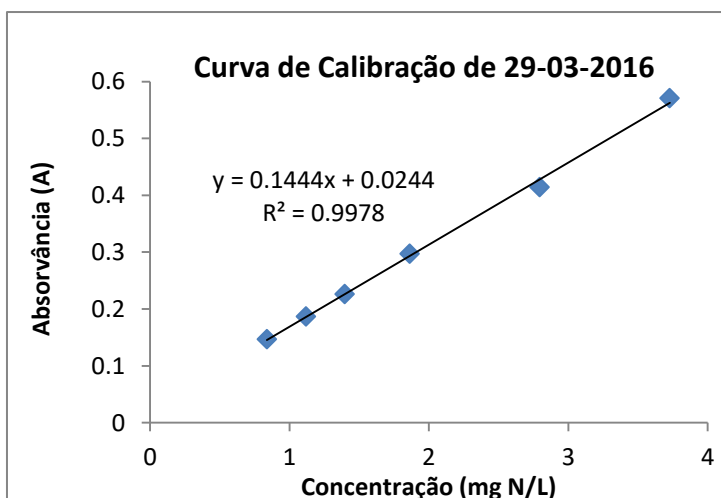
Padrões da Curva (mg N/L)	Absorvância (y)	Absorvância (Ajuste Linear) y_1	$(y-y_1)^2$	$\sum (y-y_1)^2$	S_{y_1}	LQ
0.839	0.139	0.1390432	1.86624E-09	0.000476414	0.010913	<u>0.73343148</u>
1.118	0.196	0.1805584	0.000238443			
1.398	0.214	0.2222224	6.76079E-05			
1.864	0.279	0.2915632	0.000157834			
2.796	0.432	0.4302448	3.08073E-06			
3.728	0.572	0.5689264	9.44702E-06			



3.3 Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 31-08-2016

3.8 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho de dia 29-03-2016

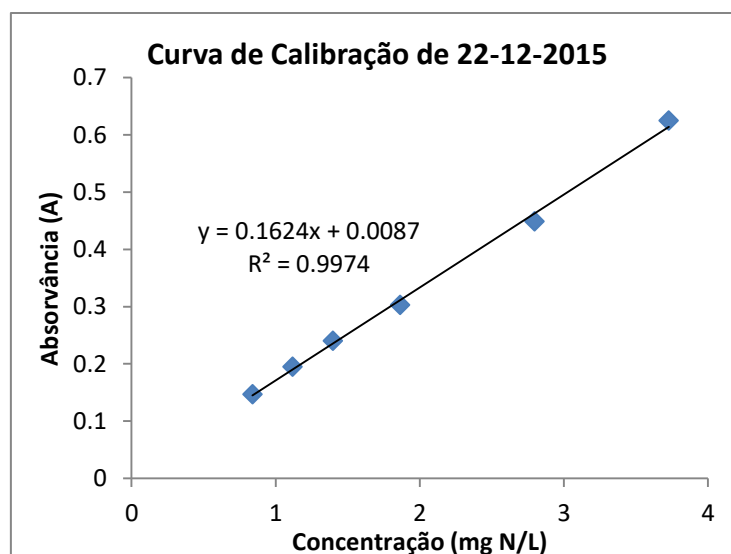
Padrões da Curva (mg N/L)	Absorvância (y)	Absorvância (Ajuste Linear) y_1	$(y-y_1)^2$	$\Sigma (y-y_1)^2$	S_{y_1}	LQ
0.839	0.147	0.1455516	2.09786E-06	0.000283854	0.008424	0.58337874
1.118	0.187	0.1858392	1.34746E-06			
1.398	0.226	0.2262712	7.35494E-08			
1.864	0.297	0.2935616	1.18226E-05			
2.796	0.414	0.4281424	0.000200007			
3.728	0.571	0.5627232	6.85054E-05			



3.4 Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 21-06-2016

3.9 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores da sessão de trabalho de dia 22-12-2015

Padrões da Curva (mg N/L)	Absorvância (y)	Absorvância (Ajuste Linear) y_1	$(y-y_1)^2$	$\sum (y-y_1)^2$	S_{y_1}	LQ
0.839	0.147	0.1449536	4.18775E-06	0.000423444	0.010289	<u>0.6335515</u>
1.118	0.195	0.1902632	2.24373E-05			
1.398	0.240	0.2357352	1.81885E-05			
1.864	0.303	0.3114136	7.07887E-05			
2.796	0.449	0.4627704	0.000189624			
3.728	0.625	0.6141272	0.000118218			



3.5 Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 22-12-2015

3.1.4 Limite de Detecção

Após validação do limite de quantificação, obtemos o limite de detecção. Este último é dado por uma equação semelhante ao cálculo do LQ, no entanto, multiplicada por 3,3:

$$LD = \left(\frac{S_{y/x}}{b} \right) \times 3,3 \quad (3.2)$$

Logo, o valor do limite de LD será:

3.10 Valores referentes ao LD calculado a partir das três curvas de calibração e média dos três valores

	LD
31-08-2016	0.242032
29-03-2016	0.192515
22-12-2015	0.209072
Média	0.214540

Constatou-se que o LD deste método, com base nas curvas de calibração apresentadas, é 0,214 mg N/L.

Sabemos que o $LQ_{teórico} = 0,839$ mg N/L e o $LD_{teórico} = 0,277$ mg N/L são bons limites estipulados para rotina de trabalho. Tal deve-se a ambos os valores obtidos ($LQ = 0,650$ mg N/L e $LD = 0,214$ mg N/L) serem inferiores ao estipulado, permitindo constatar que é exequível a sua diferenciação do sinal do branco, possibilitando a quantificação segura de amostras próximas do LQ.

3.1.5 Precisão

A precisão é constituída por duas componentes: a repetibilidade e a reprodutibilidade.

3.1.5.1 Repetibilidade

Foram realizados dez ensaios para os padrões dos extremos da gama de trabalho (padrão 0,839 mg N/L e padrão 3,728 mg N/L), em três dias distintos. Calculou-se a média, desvio padrão (S_r) e coeficiente de variação (CV):

3.11 Estudo de Repetibilidade do padrão de 0,839 mg N/L em três dias distintos

30-07-2016	Concentração obtida (mg N/L)	20-08-2016	Concentração obtida (mg N/L)	27-08-2016	Concentração obtida (mg N/L)
1	0.773	1	0.870	1	0.905
2	0.805	2	0.835	2	0.979
3	0.825	3	0.889	3	0.923
4	0.781	4	0.919	4	0.945
5	0.795	5	0.875	5	0.847
6	0.833	6	0.792	6	0.811
7	0.777	7	0.835	7	0.830
8	0.792	8	0.889	8	0.867
9	0.818	9	0.912	9	0.825
10	0.818	10	0.853	10	0.900
Média	0.802	Média	0.867	Média	0.883
Desvio Padrão	0.020	Desvio Padrão	0.037	Desvio Padrão	0.053
CV(%)	2.515	CV(%)	4.260	CV(%)	6.028

3.12 Estudo de Repetibilidade do padrão de 3,729 mg N/L em três dias distintos

30-07-2016	Concentração obtida (mg N/L)	20-08-2016	Concentração obtida (mg N/L)	27-08-2016	Concentração obtida (mg N/L)
1	3.665	1	3.575	1	3.557
2	3.464	2	3.682	2	3.673
3	3.537	3	3.693	3	3.566
4	3.554	4	3.688	4	3.750
5	3.670	5	3.613	5	3.770
6	3.591	6	3.610	6	3.725
7	3.601	7	3.708	7	3.627
8	3.754	8	3.659	8	3.608
9	3.692	9	3.786	9	3.697
10	3.661	10	3.686	10	3.683
Média	3.619	Média	3.670	Média	3.666
Desvio Padrão	0.081	Desvio Padrão	0.057	Desvio Padrão	0.070
CV(%)	2.247	CV(%)	1.545	CV(%)	1.918

Como se verifica, após análise das tabelas 3.11 e 3.12, como CV é inferior a 10%, existe repetibilidade de ambos os padrões. Constatase que o método em revalidação é preciso em termos de repetibilidade.

3.1.5.2 Reprodutibilidade

Este parâmetro de análise da precisão tem em conta a capacidade de reproduzir o mesmo resultado, em dias diferentes.

Para este estudo, compilaram-se os resultados obtidos em dez dias diferentes para o primeiro padrão lido em cada sessão de trabalho.

3.13 Estudo de Reprodutibilidade do padrão de 0,839 mg N/L em dez dias distintos

Data	Concentração obtida (mg N/L)
31-08-2016	0.834
25-08-2016	0.764
03-08-2016	0.754
07-07-2016	0.839
21-06-2016	0.823
28-04-2016	0.849
29-03-2016	0.815
10-03-2016	0.801
25-02-2016	0.876
12-02-2016	0.841
Média	0.820
Desvio Padrão	0.036
CV(%)	4.375

3.14 Estudo de Reprodutibilidade do padrão de 3,729 mg N/L em dez dias distintos

Data	Concentração obtida (mg N/L)
31-08-2016	3.769
25-08-2016	3.595
03-08-2016	3.447
07-07-2016	3.648
21-06-2016	3.766
28-04-2016	3.644
29-03-2016	3.704
10-03-2016	3.575
25-02-2016	3.496
12-02-2016	3.779
Média	3.642
Desvio Padrão	0.110
CV(%)	3.010

Com base nas tabelas 3.13 e 3.14, verifica-se que, como CV em ambas as tabelas é inferior a 10%, o método é reprodutível ao longo do tempo, demonstrando precisão na componente em causa.

3.1.6 Exactidão do método

Na exactidão estudou-se a aproximação do valor obtido ao valor de referência, aplicando o estudo aos ensaios de recuperação.

Efectuou-se um levantamento dos ensaios de recuperação realizados em sessões de trabalho. Determinou-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Devido ao facto de no último ano, o ISQ – LABQUI não ter participado em nenhum ensaio interlaboratorial para o parâmetro de azoto amoniacal, o cálculo da incerteza da exactidão, será analisado e calculado apenas com os ensaios de recuperação.

3.15 Cálculo do ensaio de recuperação para dez dias diferentes com padrões alternados (padrão 0,839 mg N/L e padrão 1,631 mg N/L)

Data	Concentração fortificação (mg N/L)	Concentração Amostra (mg N/L)	Concentração Amostra Fortificada (mg N/L)	% Recuperado	bias (%)	bias ² (%)
31-08-2016	0.839	1.843	2.786	112.40	12.40	153.65
25-08-2016	1.631	2.042	3.563	93.26	-6.74	45.49
05-07-2016	1.631	0.9385	2.621	103.16	3.16	9.97
21-06-2016	1.631	1.175	2.907	106.19	6.19	38.35
01-06-2016	1.631	0.857	2.49	100.12	0.12	0.02
25-05-2016	1.631	0.829	2.535	104.60	4.60	21.15
13-05-2016	0.839	2.526	3.364	99.88	-0.12	0.01
28-04-2016	1.631	1.028	2.496	90.01	-9.99	99.88
29-03-2016	1.631	1.113	2.693	96.87	-3.13	9.78
10-03-2016	1.631	0.849	2.421	96.38	-3.62	13.09

No decurso deste trabalho de validação foram analisados ensaios de recuperação de amostra reais, cujo critério de aceitação foi $\pm 20\%$.

Em seguida aplicou-se um teste *t-student*, para confirmar a existência de um desvio significativo à recuperação de 100% do padrão de fortificação. Então, assumindo H_0 e H_A como:

H_0 – Hipótese nula: não existe diferença significativa entre os valores de referência e os valores obtidos;

H_A – Hipótese alternativa: Existe diferença significativa entre os valores de referência e os valores obtidos.

Estas duas hipóteses foram aplicadas ao teste t para diferenças emparelhadas.

Aplicou-se a equação 1.18, para determinar o valor experimental (valor teste) e comparou-se com o valor t para um intervalo de

confiança de 99% e 10 graus de liberdade. Deste cálculo resultou um t_{exp} de -0.18. Comparando o valor obtido com o valor tabelado de *t-student*, nas mesmas condições, temos $t_{\text{tab}} = 3.25$, constatata-se que a hipótese nula H_0 é a hipótese válida, ou seja, os erros sistemáticos não são significativos.

3.1.7 Cálculo da Incerteza

No cálculo da incerteza, aplicou-se o método de abordagem baseada em dados de validação e controlo de qualidade aplicado ao método em estudo.

Tal como referido anteriormente, a incerteza combina os valores obtidos para a incerteza da precisão e para a incerteza da exactidão.

3.1.7.1 Incerteza da exactidão

A incerteza da exactidão é calculada com base nos valores dos ensaios de recuperação, apresentados na tabela 3.15, e aplicando a equação (1.24).

3.16 Cálculo da incerteza de exactidão associada aos ensaios de recuperação do método

n	10.00
Rm	100.29
$\sum (\text{bias}^2)$	391.37
bias_{RMS}	6.26
$\mu_{\text{adição}}$	0.20
$\mu_{\text{exactidão}}$	6.26

3.1.7.2 Incerteza da precisão

Tendo como base a tabela 3.12, determinou-se a precisão intermédia. Para tal, compilaram-se trinta resultados do padrão referente ao limite de quantificação, calculando-se a sua média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Após o seu cálculo, aplica-se a equação 1.21. Onde o número de ensaios será trinta e a média, bem como o desvio padrão, serão dados pela tabela 3.18.

Neste método de análise, os padrões apenas são destilados e não são extraídos em lisímetro, como as amostras reais. Logo, será necessário alargar o nosso estudo aos duplicados de análise.

3.17 Determinação da precisão intermédia do método para o padrão referente ao limite de quantificação

Data	Concentração obtida (mg N/L) (y)	(y-y _{médio})
30-07-2016	0.773	0.006
	0.805	0.002
	0.825	0.001
	0.781	0.005
	0.795	0.003
	0.833	0.000
	0.777	0.005
	0.792	0.003
	0.818	0.001
	0.818	0.001
20-08-2016	0.870	0.000
	0.835	0.000
	0.889	0.001
	0.919	0.005
	0.875	0.001
	0.792	0.003
	0.835	0.000
	0.889	0.001
	0.912	0.004
	0.853	0.000
27-08-2016	0.905	0.003
	0.979	0.016
	0.923	0.005
	0.945	0.009
	0.847	0.000
	0.811	0.002
	0.830	0.000
	0.867	0.000
	0.825	0.001
	0.900	0.002

3.18 Cálculo da média, desvio padrão, coeficiente de variação e desvio padrão residual da precisão

Média	0.851
Desvio Padrão	0.054
CV (%)	6.299
$\Sigma(y-y_{\text{médio}})^2$	0.083
S_{precisão}	0.054

Relativamente ao estudo de duplicados temos:

3.19 Determinação da precisão intermédia do método para os duplicados de ensaio

Data	Concentração I (mg N/L)	Concentração II (mg N/L)	Média	Diferença
31-08-2016	1.212	1.209	1.211	0.002
25-08-2016	2.309	2.348	2.329	-0.017
03-08-2016	1.381	1.334	1.358	0.035
08-07-2016	2.081	2.042	2.062	0.019
07-07-2016	1.572	1.588	1.580	-0.010
05-07-2016	0.932	0.945	0.939	-0.014
21-06-2016	1.204	1.185	1.195	0.016
01-06-2016	1.811	1.782	1.797	0.016
25-05-2016	3.320	3.200	3.260	0.037
13-05-2016	2.495	2.517	2.506	-0.009
28-04-2016	3.496	3.502	3.499	-0.002
29-03-2016	1.705	1.697	1.701	0.005
10-03-2016	1.552	1.529	1.541	0.015
25-02-2016	1.343	1.390	1.367	-0.034
12-12-2016	2.516	2.528	2.522	-0.005
19-01-2016	1.291	1.291	1.291	0.000
22-12-2015	1.225	1.234	1.230	-0.007
11-11-2015	2.220	2.240	2.230	-0.009

Para cada valor da tabela 3.19, serão calculadas as amplitudes relativas, bem como o respectivo CV e precisão do método ($S_{\text{precisão}}$). A precisão é calculada pela equação 1.21.

3.20 Média de amplitudes, Desvio Padrão, coeficiente de variação e precisão do método, associados aos valores obtidos na tabela 3.19

Média de Amplitudes	0.026
Desvio Padrão	0.028
CV(%)	1.049
S_{precisão}	0.152

Como sabemos que $u_{\text{precisão}}$ raiz quadrada da $s_{\text{precisão}}$ duplicados e da $S_{\text{precisão}}$ padrões, mas em %, então, através da equação 1.20, constatou-se que a incerteza da precisão é:

$$u_{\text{precisão}} = \sqrt{1,049^2 + 6,299^2} = 6,386$$

3.1.7.3 Incerteza Combinada

No cálculo da incerteza combinada, aplicou-se a equação 1.26:

$$u_c = \sqrt{u_{\text{precisão}}^2 + u_{\text{exactidão}}^2}$$

$$u_c = \sqrt{6,386^2 + 6,259^2}$$

$$u_c = 8,94$$

3.1.7.4 Incerteza Expandida

Para determinar a incerteza expandida basta aplicar a equação 1.27:

$$U = K \times u_c = 2 \times 8,94 = 17,88$$

Verifica-se que a incerteza do método é de 18%.

3.2 Revalidação do método para Azoto Nítrico

Na revalidação do método de Azoto Nítrico, aplicaram-se os mesmos cálculos e testes que para o Azoto Amoniacal.

3.2.1 Gama de trabalho

Este método apresenta uma gama de trabalho de 0,4 mg NO₃/L a 5,0 mg NO₃/L. A sua curva de calibração é constituída pelos seguintes padrões:

3.21 Tabela referente às concentrações que constituem a gama de trabalho

Referência Padrões	Concentração (mg NO ₃ /L)
Branco	0
P1	0.4
P2	1.0
P3	3.0
P4	5.0

Apesar da gama de trabalho ser constituída apenas por quatro concentrações diferentes, as mesmas são equidistantes de modo a abranger, todos os valores de amostras reais, que se situam dentro da gama de trabalho.

Para validar a gama de trabalho foi necessário aplicar o teste de homogeneidade de variâncias [26].

Realizaram-se dez ensaios para cada padrão dos extremos da gama de trabalho (padrão 0,4 mg NO₃/L e padrão 5,0 mg NO₃/L).

3.22 Resultados das absorvâncias dos dez ensaios dos dois padrões dos extremos da curva de calibração

Padrão (mg NO ₃ /L)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀
0.4	0.009	0.010	0.009	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
5	0.103	0.101	0.097	0.099	0.102	0.100	0.102	0.100	0.101	0.099

Após a leitura dos padrões, procedeu-se à verificação da existência dos *outliers*, aplicando o teste de Grubbs.

3.23 Resumo de dados e resultados do teste aos outliers (teste de Grubbs)

	P 0.4 mg NO ₃ /L	P 5.0 mg NO ₃ /L
Valor mínimo de absorvância	0.008	0.099
Valor máximo de absorvância	0.010	0.103
G_{obtido mínimo}	0.572	1.914
G_{obtido máximo}	2.288	1.464
G_{tabelado}	2.410	2.410

Com base na tabela 3.23 verifica-se que, **G_{tabelado}** é superior ao **G_{obtido mínimo}** e superior ao **G_{obtido máximo}** para os padrões referidos na tabela 3.22 e, como tal,

conclui-se que os valores não são *outliers* e poderão ser todos utilizados no teste de homogeneidade de variâncias.

Neste estudo, calcularam-se as variâncias para os dois padrões, aplicando a equação (1.9) e obtendo-se $s_1^2 = 0.00115$ e $s_{10}^2 = 0.00523$ para o padrão de 0.4 mg NO₃/L e 5.0 mg NO₃/L respectivamente.

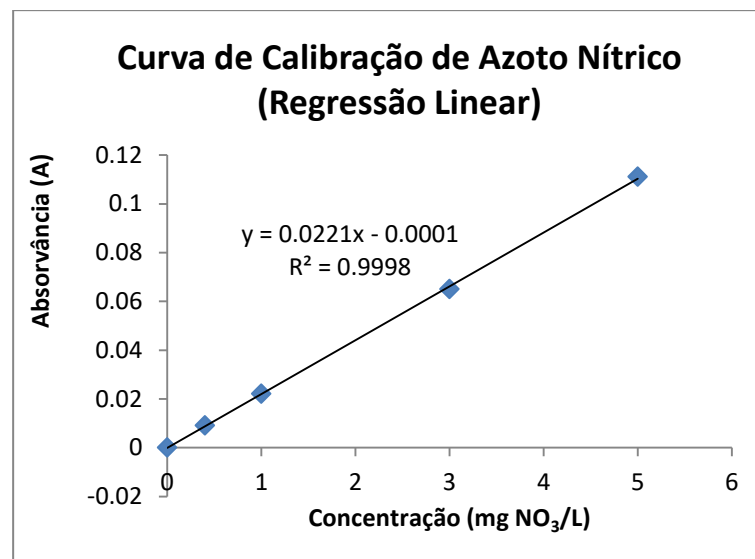
Com base nos valores obtidos, calculou-se o valor de F_{obtido} através da equação (1.11), comparando o seu valor obtido com o valor crítico tabelado para o teste de Fisher (para um intervalo de confiança de 99% e n=10).

Visto $F_{\text{obtido}} = 4.543$ e o $F_{\text{crítico}} = 5.351$, então, constata-se que existe homogeneidade de variâncias. Logo, confirma-se que a gama de trabalho está bem ajustada.

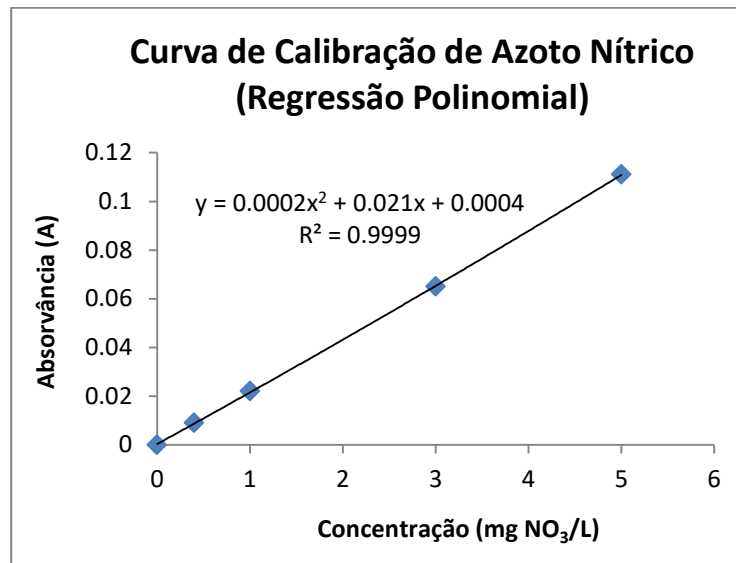
3.2.2 Linearidade

Exactamente como para a revalidação do azoto amoniacal e tendo por base a norma ISO 8466-1 [26], determinou-se o coeficiente de correlação (r) e avaliou-se a linearidade através do modelo estatístico – teste de Mandel.

À semelhança do método de determinação do teor de azoto amoniacal, também nestes método, a recta de calibração é realizada sempre que se realiza uma sessão de trabalho. No entanto, neste trabalho, será apenas demonstrado o estudo da linearidade para uma curva de calibração, a título de exemplo.



3.6 Gráfico de dispersão com regressão linear referente à curva de calibração de Azoto Nítrico.



3.7 Gráfico de dispersão com regressão polinomial referente à curva de calibração de Azoto Nítrico.

Analisando os dois gráficos confirma-se que, visualmente, ambos são lineares. A partir dos dois gráficos, retiramos os valores das equações de 1º e 2º grau, bem como os valores dos coeficientes de determinação (r^2).

Um dos critérios de aceitação exigidos pelo método é a obtenção de um coeficiente de correlação (r) mínimo de 0,995. Este coeficiente corresponde a um coeficiente de determinação de $r^2 \geq 0,990$.

Analisando ambos os gráficos verifica-se um r^2 superior ao critério exigido.

Para confirmar a linearidade visual, aplicou-se um modelo estatístico – teste de Mandel. Através das equações 1.5 e 1.6, determinou-se o valor do desvio padrão residual tanto para a regressão linear como para a regressão polinomial. Aplicando a equação 1.7, determinou-se a diferença de variâncias. Com a equação 1.8, determinou-se o valor PG

Os valores obtidos foram todos compilados na tabela seguinte, onde:

x = concentração mg NO₃/L;

y = Absorvância medida;

y_1 = Absorvância calculada por regressão linear;

y_2 = Absorvância calculada por regressão polinomial.

3.24 Valores obtidos e cálculos para determinação da linearidade do método

x	y	y ₁	y ₂	(y-y ₁) ²	(y-y ₂) ²	Σ (y-y ₁) ²
0.0	0	-0.0001	0.00040	0.00000001	0.00000016	
0.4	0.009	0.00874	0.00883	6.76E-08	2.8224E-08	
1.0	0.022	0.022	0.02160	1.20371E-35	1.6E-07	0.000001878
3.0	0.065	0.0662	0.06520	1.44E-06	4E-08	
5.0	0.111	0.1104	0.11040	3.6E-07	3.6E-07	

3.25 Valores obtidos e cálculos para determinação da linearidade do método (continuação)

x	Σ(y-y ₂) ²	S _{y1}	S _{y2}	DS ²	PG	F _{crítico}
0						
0.4						
1	7.482E-07	0.000685128	0.000499408	1.12938E-06	4.528227	98.50251
3						
5						

O valor de PG foi comparado com o valor de F_{crítico}. Como F_{crítico} é superior ao valor de PG obtido, constatou-se que a nossa curva de calibração apresenta linearidade, logo, o método em estudo apresenta uma função de calibração linear.

3.2.3 Limite de Quantificação

Como se trata de um método validado e implementado, procedeu-se ao cálculo do coeficiente de variação. No entanto, para comprovarmos que o LQ está bem ajustado, determinámos o valor do LQ a partir dos dados obtidos em curvas de calibração. O valor do limite de quantificação para este método é de 0.4 mg NO₃/L.

3.26 Compilação de valores do padrão de 0,4 mg NO₃/L (limite de quantificação) com respectiva média, desvio padrão (s) e coeficiente de variação (%CV)

Data	Concentração (mg NO ₃ /L)
31-08-2016	0.360
31-08-2016	0.412
25-08-2016	0.420
25-08-2016	0.420
27-06-2016	0.410
27-06-2016	0.386
17-05-2016	0.413
17-05-2016	0.402
29-03-2016	0.412
29-03-2016	0.378
Média	0.401
s	0.020
CV(%)	5.000

Analisando a tabela 3.26, como CV é inferior a 10%, o LQ mantêm-se ajustado e deverá ser mantido.

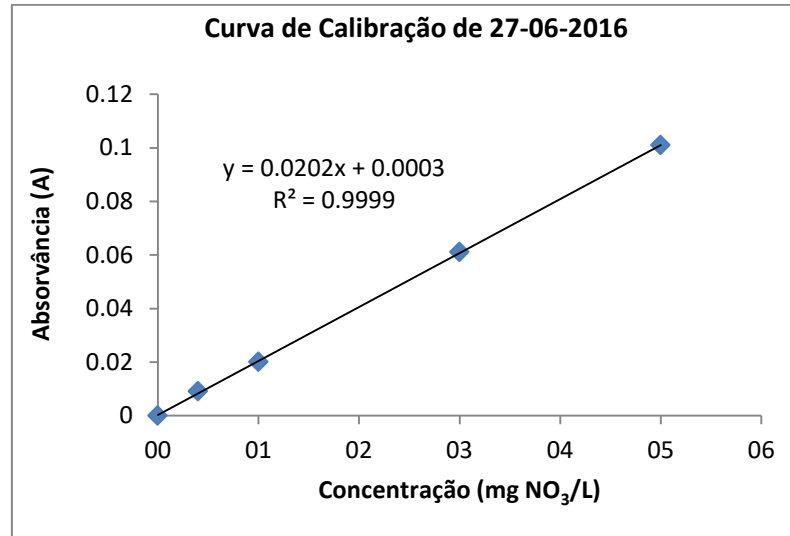
Supondo que não temos nenhum LQ definido e que pretendemos estabelecer um, efectuaram-se os cálculos através dos dados obtidos por uma curva de calibração.

Assim, tendo por base três curvas de calibração, espaçadas no tempo, retirou-se informação necessária à determinação do LQ.

O limite de quantificação será dado pela equação (1.13).

3.27 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores de sessão de trabalho de dia 27-06-2016

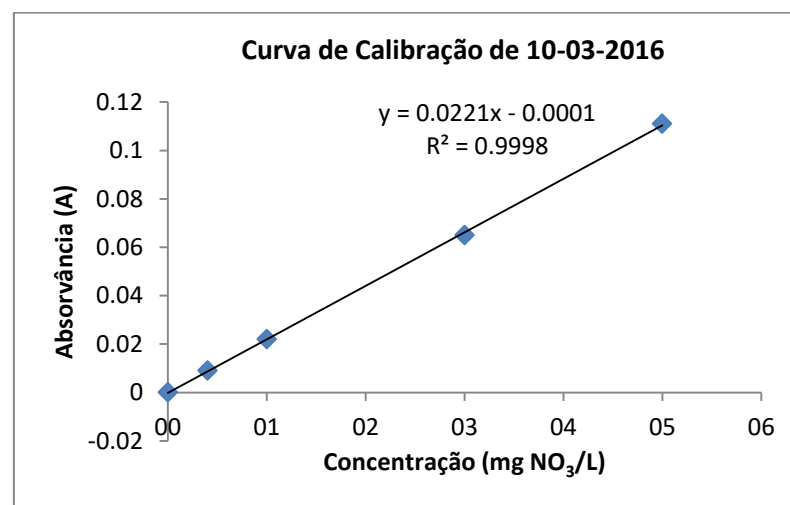
<u>Padrões da Curva</u> (mg NO ₃ /L)	<u>Absorvância (y)</u>	<u>Absorvância</u> (Ajuste Linear) y ₁	(y-y ₁) ²	Σ (y-y ₁) ²	S _{y1}	LQ
0.0	0.000	0.0003	0.00000009			
0.4	0.009	0.0084	3.844E-07			
1.0	0.020	0.0205	0.00000025	0.000000824	0.000454	0.22474375
3.0	0.061	0.0609	1E-08			
5.0	0.101	0.1013	9E-08			



3.8 Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 27-06-2016

3.28 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores de sessão de trabalho de dia 10-03-2016

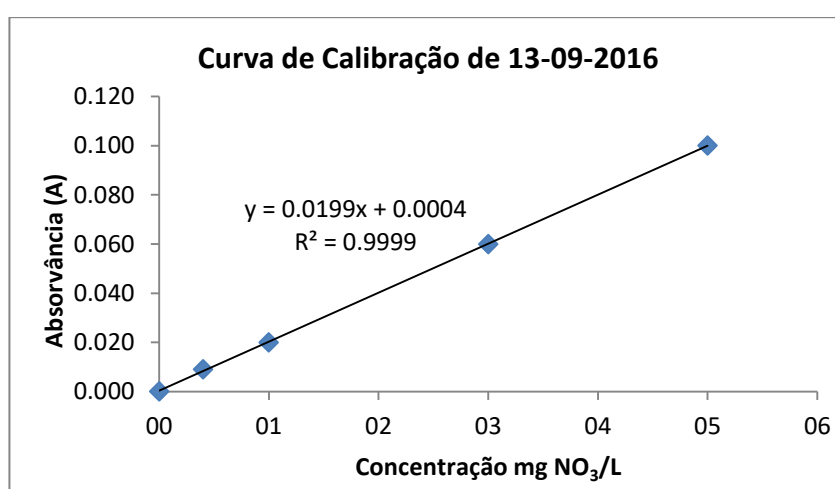
<u>Padrões da Curva</u> <u>(mg NO₃/L)</u>	<u>Absorvância</u> <u>(y)</u>	<u>Absorvância</u> <u>(Ajuste Linear) y₁</u>	<u>(y-y₁)²</u>	<u>Σ (y-y₁)²</u>	<u>S_{y1}</u>	<u>LQ</u>
0.0	0.000	0.0001	0.00000001			
0.4	0.009	0.0089	3.6E-09			
1.0	0.022	0.0222	4E-08	0.000002174	0.000737	<u>0.33355507</u>
3.0	0.065	0.0664	0.00000196			
5.0	0.111	0.1106	1.6E-07			



3.9 Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 10-03-2016

3.2.9 Cálculos necessários à determinação do LQ, com valores de sessão de trabalho de dia 13-09-2016

Padrões da Curva (mg NO ₃ /L)	Absorvância (y)	Absorvância (Ajuste Linear) y ₁	(y-y ₁) ²	Σ (y-y ₁) ²	S _{y₁}	LQ
0.0	0.000	0.0004	0.00000016			
0.4	0.009	0.00836	4.096E-07			
1.0	0.020	0.0203	9E-08	0.000000680	0.000412	0.20713029
3.0	0.060	0.0601	1E-08			
5.0	0.100	0.0999	1E-08			



3.10 Gráfico da curva de calibração da sessão de trabalho de 13-09-2016

3.2.4 Limite de Detecção

Após validação do limite de quantificação, obtemos o limite de detecção. Dado pela equação 3.2, temos:

3.30 Valores referentes ao LD calculado a partir das três curvas de calibração e média dos três valores

	LD
27-06-2016	0.074165438
10-03-2016	0.110073172
13-09-2016	0.068352996
Média	0.084197202

Constatou-se que o LD deste método, com base nas curvas de calibração apresentadas, é 0.0842 mg NO₃/L.

Sabemos que o $LQ_{teórico} = 0.40 \text{ mg NO}_3/\text{L}$ e o $LD_{teórico} = 0.13 \text{ mg NO}_3/\text{L}$ são bons limites estipulados para rotina de trabalho, pois os valores obtidos ($LQ = 0.255 \text{ mg NO}_3/\text{L}$ e $LD = 0.084 \text{ mg NO}_3/\text{L}$) são inferiores ao estipulado.

3.2.5 Precisão

A precisão é constituída por duas componentes: a repetibilidade e a reprodutibilidade.

3.2.5.1 Repetibilidade

Foram realizados dez ensaios para os padrões dos extremos da gama de trabalho (padrão 0,40 mg NO₃/L e padrão 5,0 mg NO₃/L), em três dias distintos. Calculou-se a média, desvio padrão (S_r) e coeficiente de variação (CV):

3.31 Estudo de Repetibilidade do padrão de 0,4 mg NO₃/L em três dias distintos

20-08-2016	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)	27-08-2016	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)	13-09-2016	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)
1	0.459	1	0.362	1	0.448
2	0.402	2	0.412	2	0.472
3	0.410	3	0.412	3	0.436
4	0.402	4	0.404	4	0.375
5	0.377	5	0.396	5	0.412
6	0.410	6	0.387	6	0.375
7	0.435	7	0.438	7	0.399
8	0.459	8	0.412	8	0.375
9	0.435	9	0.404	9	0.387
10	0.402	10	0.412	10	0.399
Média	0.419	Média	0.404	Média	0.408
Desvio Padrão	0.026	Desvio Padrão	0.019	Desvio Padrão	0.032
CV(%)	6.086	CV(%)	4.651	CV(%)	7.895

3.32 Estudo de Repetibilidade do padrão de 5,0 mg NO₃/L em três dias distintos

30-07-2016	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)	20-08-2016	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)	27-08-2016	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)
1	5.128	1	5.010	1	4.792
2	4.741	2	5.371	2	5.096
3	5.002	3	4.986	3	4.891
4	4.876	4	5.480	4	4.998
5	5.044	5	4.642	5	5.088
6	5.280	6	4.793	6	4.735
7	4.876	7	4.977	7	4.965
8	4.943	8	5.086	8	4.899
9	5.070	9	5.061	9	4.702
10	4.960	10	4.793	10	4.940
Média	4.992	Média	5.020	Média	4.911
Desvio Padrão	0.143	Desvio Padrão	0.243	Desvio Padrão	0.129
CV(%)	2.859	CV(%)	4.838	CV(%)	2.626

Como se verifica, após análise das tabelas 3.31 e 3.32, como CV é inferior a 10%, existe repetibilidade de ambos os padrões. Constatase que o método em revalidação é preciso em termos de repetibilidade.

3.2.5.2 Reprodutibilidade

3.33 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 0,4 mg NO₃/L em dez dias distintos

Data	Concentração obtida (mg NO ₃ /L)
31-08-2016	0.360
25-08-2016	0.420
05-07-2016	0.366
27-06-2016	0.410
24-05-2016	0.421
17-05-2016	0.413
29-03-2016	0.412
10-03-2016	0.442
02-03-2016	0.379
Média	0.403
Desvio Padrão	0.026
CV(%)	6.497

3.34 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 5,0 mg NO₃/L em dez dias distintos

Data	Concentração obtida (mg NO₃/L)
31-08-2016	4.971
25-08-2016	4.683
05-07-2016	4.813
27-06-2016	4.697
24-05-2016	4.859
17-05-2016	5.051
29-03-2016	4.735
10-03-2016	5.132
02-03-2016	4.964
11-02-2016	4.942
Média	4.885
Desvio Padrão	0.145
CV(%)	2.966

Com base nas tabelas 3.33 e 3.34, verifica-se que, como CV em ambas as tabelas é inferior a 10%, o método é reprodutível ao longo do tempo, demonstrando precisão na componente em causa.

3.2.6 *Exactidão*

Na exactidão efectuou-se um levantamento dos ensaios de recuperação realizados em sessões de trabalho. Determinou-se a média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Devido ao facto de no último ano, o ISQ – LABQUI não ter participado em nenhum ensaio interlaboratorial para o parâmetro de azoto nítrico, o cálculo da incerteza da exactidão, será analisado e calculado apenas com os ensaios de recuperação.

3.35 Cálculo do ensaio de recuperação para dez dias diferentes com padrões alternados (padrão 0,4mg NO₃/L, padrão 1,0 mg NO₃/L e padrão 3,0 mg NO₃/L)

Data	Concentração fortificação (mg NO ₃ /L)	Concentração Amostra (mg NO ₃ /L)	Concentração Amostra Fortificada (mg NO ₃ /L)	% Recuperado	bias (%)	bias ² (%)
31-08-2016	3.0	0.542	3.582	101.33	1.33	1.78
25-08-2016	0.4	0.175	0.561	96.50	-3.50	12.25
05-07-2016	1.0	1.895	2.927	103.20	3.20	10.24
27-06-2016	3.0	0.633	3.501	95.60	-4.40	19.36
01-06-2016	1.0	4.064	5.014	95.00	-5.00	25.00
24-05-2016	3.0	1.107	4.073	98.87	-1.13	1.28
17-05-2016	1.0	0.722	1.681	95.90	-4.10	16.81
29-03-2016	3.0	1.650	4.892	108.07	8.07	65.07
10-03-2016	3.0	1.780	4.701	97.37	-2.63	6.93
02-03-2016	3.0	1.674	4.514	94.67	-5.33	28.44

De acordo com o procedimento interno do laboratório o critério de aceitação foi $\pm 10\%$. Logo, como todos os ensaios de recuperação listados na tabela 3.35 estão com desvio inferior a 10%, existe exactidão do método.

Em seguida aplicou-se um teste *t-student*, para confirmar a existência de um desvio significativo à recuperação de 100% do padrão de fortificação. Então, assumindo **H₀** e **H_A** como:

H₀ – Hipótese nula: não existe diferença significativa entre os valores de referência e os valores obtidos;

H_A – Hipótese alternativa: Existe diferença significativa entre os valores de referência e os valores obtidos.

Estas duas hipóteses foram aplicadas no teste t para diferenças emparelhadas.

Aplicou-se a equação 1.18, para determinar o valor experimental (valor teste) e comparou-se com o valor t para um intervalo de confiança de 99% e 10 graus de liberdade. Deste cálculo resultou um **t_{exp}** de -0.56. Comparando o valor obtido com o valor tabelado de *t-student*, nas mesmas condições, temos **t_{tab}** = 3.25. Como **t_{tab}** é superior a **t_{exp}**, constatata-se que a hipótese nula **H₀** é a hipótese válida, ou seja, os erros sistemáticos não são significativos.

3.2.7 Incerteza

No cálculo da incerteza, aplicou-se o método de abordagem baseada em dados de validação e controlo de qualidade aplicado ao método em estudo.

3.2.7.1 Incerteza da exactidão

A incerteza da exactidão é calculada com base nos valores dos ensaios de recuperação, apresentados na tabela 3.35, aplicando a equação 1.24.

3.36 Cálculo da incerteza de exactidão associada aos ensaios de recuperação do método

n	10.00
Rm	98.65
$\sum (\text{bias}^2)$	187.17
bias_{RMS}	4.33
$\mu_{\text{adição}}$	0.33
$\mu_{\text{exactidão}}$	4.339

3.2.7.2 Incerteza da precisão

Para o cálculo da incerteza da precisão, determinou-se a precisão intermédia do padrão referente ao limite de quantificação. Para tal, compilou-se trinta resultados do padrão referente ao limite de quantificação (tabela 3.37), calculando-se a sua média, desvio padrão e coeficiente de variação.

Após o seu cálculo, aplica-se a equação 1.21. Onde o número de ensaios será trinta e a média, bem como o desvio padrão, serão dados pela tabela 3.37.

3.37 Determinação da precisão intermédia do método para o padrão referente ao limite de quantificação

Data	Concentração obtida (mg N/L) (y)	(y-y _{médio})
20-08-2016	0.459	0.002
	0.402	0.000
	0.410	0.000
	0.402	0.000
	0.377	0.001
	0.410	0.000
	0.435	0.001
	0.459	0.002
	0.435	0.001
	0.402	0.000
27-08-2016	0.362	0.002
	0.412	0.000
	0.412	0.000
	0.404	0.000
	0.396	0.000
	0.387	0.001
	0.438	0.001
	0.412	0.000
	0.404	0.000
	0.412	0.000
13-09-2016	0.448	0.001
	0.472	0.004
	0.436	0.001
	0.375	0.001
	0.412	0.000
	0.375	0.001
	0.399	0.000
	0.375	0.001
	0.387	0.001
	0.399	0.000
Média	0.410	
Desvio Padrão	0.027	
CV (%)	6.659	
$\sum(y-y_{\text{médio}})^2$	0.022	
S_{precisão Padrões}	0.027	

Neste método de análise, os padrões são preparados exactamente como as amostras, logo, a determinação da incerteza pode ser dada apenas pela precisão intermédia (tabela 3.37).

Como sabemos $u_{\text{precisão}} = s_{\text{precisão}}$, através da equação 1.20. No entanto, como pretendemos trabalhar em percentagem, temos $u_{\text{precisão}} = \% \text{ CV}$. Constatou-se que a incerteza da precisão é:

$$u_{\text{precisão}} = 6.659 \%$$

3.2.7.3 Incerteza Combinada

No cálculo da incerteza combinada, aplicou-se a equação 1.26:

$$\begin{aligned} u_c &= \sqrt{u_{\text{precisão}}^2 + u_{\text{exactidão}}^2} \\ u_c &= \sqrt{4.339^2 + 6.659^2} \\ u_c &= 7,948 \% \end{aligned}$$

3.2.7.4 Incerteza Expandida

Para determinar a incerteza expandida basta aplicar a equação 1.27:

$$U = K \times u_c = 2 \times 7,948 = 15,897 \%$$

Verifica-se que a incerteza do método é de 16 %.

3.3 Revalidação do método para Azoto Kjeldahl

O método de determinação do azoto Kjeldahl em lamas apresenta uma revalidação distinta da revalidação do azoto amoniacal e azoto nítrico. Este facto deve-se à sua metodologia. Este método é digerido em placa de aquecimento, seguindo-se uma destilação e terminando com um processo de titulação.

Na determinação de azoto Kjeldahl, não existe gama de trabalho definida, como nos métodos anteriores. Neste método, o controlo de qualidade é feito através do estudo do branco, dois padrões de controlo, análise de duplicados e ensaios de recuperação, bem como a padronização do titulante.

Assim, na revalidação do método procedeu-se ao estudo da repetibilidade dos padrões, do branco e da padronização do título.

No que diz respeito à exactidão, foram analisados os ensaios de recuperação.

3.3.1 Precisão

A precisão é constituída por duas componentes: a repetibilidade e a reprodutibilidade.

3.3.1.1 Repetibilidade

Foram analisados, para três dias distintos, em dez ensaios independentes, os padrões de 0,01 g e 0,1 g, o ensaio em branco e a padronização do titulante.

No caso do ensaio em branco, todos os testes do branco, bem como todos os brancos analisados em rotina de trabalho deram um resultado nulo, não se gastando nenhuma gota de titulante. Logo, não será apresentada nenhuma tabela nem será contabilizado nos cálculos.

3.3.8 Repetibilidade do Padrão 187 g/Kg (pesagem de 0,01 g)

30-07-2016	Concentração obtida (g N/Kg)	23-08-2016	Concentração obtida (g N/Kg)	06-09-2016	Concentração obtida (g N/Kg)
1	204.889	1	204.7615385	1	203.7874889
2	183.334	2	188.2513711	2	211.0143112
3	172.900	3	171.3179348	3	203.88753
4	174.633	4	186.5316092	4	199.6899915
5	186.986	5	171.4052676	5	211.046317
6	194.583	6	185.6588346	6	205.9127364
7	183.607	7	176.4126838	7	202.6745535
8	181.186	8	181.5609284	8	192.6165041
9	205.295	9	204.3416583	9	217.3262483
10	190.872	10	181.0899563	10	195.6372426
Média	187.829	Média	185.133	Média	204.359
Desvio Padrão	10.634	Desvio Padrão	11.183	Desvio Padrão	7.062
CV(%)	5.662	CV(%)	6.041	CV(%)	3.456

3.39 Repetibilidade do Padrão 187 g/Kg (pesagem de 0,1 g)

30-07-2016	Concentração obtida (g N/Kg)	23-08-2016	Concentração obtida (g N/Kg)	06-09-2016	Concentração obtida (g N/Kg)
1	176.0604799	1	171.3963351	1	203.8451056
2	185.2935484	2	181.627762	2	193.8827489
3	194.0060727	3	187.5333206	3	207.8611413
4	173.7636042	4	184.9412087	4	203.3305396
5	179.9356012	5	193.268805	5	204.2812357
6	190.6251941	6	177.0933771	6	191.3833106
7	195.4493564	7	192.1176879	7	204.9859098
8	177.5969402	8	180.5602985	8	204.2835342
9	176.4618321	9	176.3567178	9	179.3130311
10	195.4753837	10	177.4999545	10	193.6590147
Média	184.467	Média	182.240	Média	198.683
Desvio Padrão	8.297	Desvio Padrão	6.774	Desvio Padrão	8.436
CV(%)	4.498	CV(%)	3.717	CV(%)	4.246

3.40 Repetibilidade da Padronização do titulante (HCl 0,1N)

30-07-2016	Concentração obtida (mg N/L)	23-08-2016	Concentração obtida (mg N/L)	06-09-2016	Concentração obtida (mg N/L)
1	0.1012	1	0.1016	1	0.1010
2	0.1010	2	0.1008	2	0.1004
3	0.1016	3	0.1014	3	0.1020
4	0.1012	4	0.1010	4	0.1014
5	0.1008	5	0.1013	5	0.1016
6	0.1014	6	0.1016	6	0.1018
7	0.1012	7	0.1010	7	0.1018
8	0.1016	8	0.1012	8	0.1006
9	0.1010	9	0.1014	9	0.1004
10	0.1004	10	0.1008	10	0.1012
Média	0.101	Média	0.101	Média	0.101
Desvio Padrão	0.0004	Desvio Padrão	0.0003	Desvio Padrão	0.0006
CV(%)	0.350	CV(%)	0.288	CV(%)	0.575

3.3.1.2 Reprodutibilidade

Foi efectuado um levantamento, em dez dias distintos, de valores referentes aos padrões.

3.41 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 187 g/Kg (pesagem de 0,01 g) em dez dias distintos

Data	Concentração obtida (mg N/L)
01-09-2016	199.650
25-08-2016	184.932
16-08-2016	191.097
29-07-2016	185.426
08-07-2016	177.924
13-06-2016	212.952
25-05-2016	208.749
29-03-2016	198.942
12-02-2016	187.734
22-01-2016	193.338
Média	194.074
Desvio Padrão	10.466
CV(%)	5.393

3.42 Estudo de reprodutibilidade do padrão de 187 g/Kg (pesagem de 0,1 g) em dez dias distintos

Data	Concentração obtida (mg N/L)
01-09-2016	191.675
25-08-2016	185.689
16-08-2016	178.840
29-07-2016	173.365
08-07-2016	180.990
13-06-2016	179.048
25-05-2016	184.372
29-03-2016	184.932
12-02-2016	191.937
22-01-2016	192.497
Média	184.335
Desvio Padrão	6.084
CV(%)	3.301

3.3.2 Exactidão

Para o estudo da exactidão procedeu-se a um levantamento de dez valores de ensaios de recuperação, em dez dias diferentes.

3.43 Cálculo do ensaio de recuperação para dez dias diferentes com o padrão 187 g/Kg (pesagem de 0,01g)

Data	Concentração fortificação (mg N/L)	Concentração Amostra (mg N/L)	Concentração Amostra Fortificada (mg N/L)	% Recuperado	bias (%)	bias ² (%)
01-09-2016	0.984	4.969	5.881	92.65	-7.35	54.05
25-08-2016	3.063	13.982	17.572	117.22	17.22	296.52
08-07-2016	2.338	16.774	19.235	105.27	5.27	27.81
28-06-2016	1.851	9.223	11.190	106.20	6.20	38.43
13-06-2016	4.561	12.728	17.179	97.59	-2.41	5.81
01-06-2016	1.700	23.681	25.308	95.70	-4.30	18.46
25-05-2016	0.548	23.685	24.237	100.66	0.66	0.43
06-05-2016	0.886	21.813	22.754	106.19	6.19	38.27
29-03-2016	1.685	34.904	36.651	103.65	3.65	13.34
10-03-2016	3.066	8.840	12.120	107.01	7.01	49.11

Em seguida aplicou-se um teste *t-student*, para confirmar a existência de um desvio significativo à recuperação de 100% do padrão de fortificação. Então, assumindo H_0 e H_A como:

H_0 – Hipótese nula: não existe diferença significativa entre os valores de referência e os valores obtidos;

H_A – Hipótese alternativa: Existe diferença significativa entre os valores de referência e os valores obtidos.

Estas duas hipóteses foram aplicadas ao teste t para diferenças emparelhadas.

Aplicou-se a equação 1.18, para determinar o valor experimental (valor teste) e comparou-se com o valor t para um intervalo de confiança de 99% e 10 graus de liberdade. Deste cálculo resultou um t_{exp} de 1.44. Comparando o valor obtido com o valor tabelado de *t-student*, nas mesmas condições, temos $t_{tab} = 3.25$, constatata-se que a hipótese nula H_0 é a hipótese válida, ou seja, os erros sistemáticos não são significativos

No último ano, o ISQ – LABQUI não obteve avaliação nos ensaios interlaboratoriais em que participou para o parâmetro azoto total. Como tal, não poderão ser contabilizados no cálculo da incerteza.

3.3.3 Incerteza

No cálculo da incerteza, aplicou-se o método de abordagem baseada em dados de validação e controlo de qualidade aplicado, à semelhança do efectuado nos métodos anteriores.

3.3.3.1 Incerteza da exactidão

A incerteza da exactidão é calculada com base nos valores dos ensaios de recuperação, apresentados na tabela 3.43.

3.44 Cálculo da incerteza de exactidão associada aos ensaios de recuperação do método

n	10.00
Rm	103.21
Σ (bias²)	542.23
bias_{RMS}	7.36
$\mu_{\text{adição}}$	1.00
$\mu_{\text{exactidão}}$	7.43

3.3.3.2 Incerteza da precisão

Para o cálculo da incerteza da precisão (equação 1.21), determinou-se a precisão intermédia do padrão referente ao limite de quantificação (padrão de pesagem 0,01g). Para tal, efectuou-se um levantamento de trinta resultados do padrão referente ao controlo do limite de quantificação (tabela 3.45), calculando-se a sua média, desvio padrão e coeficiente de variação.

3.45 Determinação da precisão intermédia do método para o padrão referente ao limite de quantificação

Data	Concentração obtida (mg N/L) (y)	(y-y_{médio})
30-07-2016	204.889	154.978
	183.334	82.925
	172.900	381.817
	174.633	317.115
	186.986	29.749
	194.583	4.592
	183.607	78.031
	181.186	126.665
	205.295	165.244
	190.872	2.460
23-08-2016	204.762	151.812
	188.251	17.547
	171.318	446.155
	186.532	34.913
	171.405	442.474
	185.659	45.989
	176.413	256.885
	181.561	118.361
	204.342	141.642
	181.090	128.831
06-09-2016	203.787	128.758
	211.014	344.993
	203.888	131.038
	199.690	52.558
	211.046	346.183
	205.913	181.506
	202.675	104.739
	192.617	0.031
	217.326	619.309
	195.637	10.220
Média	192.440	
Desvio Padrão	13.193	
CV (%)	6.856	
$\Sigma(y-y_{\text{médio}})^2$	5047.521	
S_{precisão Padrões}	13.193	

Neste método de análise, os padrões são preparados exactamente como as amostras, logo, a determinação da incerteza pode ser dada apenas pela precisão intermédia (tabela 3.45).

Como sabemos $u_{\text{precisão}} = s_{\text{precisão}}$, através da equação 1.20. No entanto, como pretendemos trabalhar em percentagem, temos $u_{\text{precisão}} = \% \text{ CV}$. Constatou-se que a incerteza da precisão é:

$$u_{\text{precisão}} = 6,856\%$$

3.3.3.3 Incerteza Combinada

No cálculo da incerteza combinada, aplicou-se a equação 1.26:

$$\begin{aligned}u_c &= \sqrt{u_{\text{precisão}}^2 + u_{\text{exactidão}}^2} \\u_c &= \sqrt{6,856^2 + 7,431^2} \\u_c &= 10,111\%\end{aligned}$$

3.3.3.4 Incerteza Expandida

Para determinar a incerteza expandida basta aplicar a equação 1.27:

$$U = K \times u_c = 2 \times 10,111 = 20,221\%$$

Verifica-se que a incerteza do método é de 20%.

4 Conclusões

Foi referido ao longo de todo o trabalho, a importância do azoto e do seu “ciclo de vida” no nosso ecossistema. A validação e implementação de análise do teor de várias fontes de azoto é de extrema importância, visto ser necessário controlar os níveis de concentração dos diferentes tipos de azotos que são libertados para a atmosfera e que, por vezes, poluem o ar.

Durante o processo de revalidação foram analisadas as diversas componentes de controlo de qualidade para cada método. Foram também abordados testes estatísticos para comprovar e aceitar os resultados obtidos experimentalmente.

Relativamente ao azoto amoniacal, foi possível concluir que a gama de trabalho está bem ajustada para os efeitos pretendidos e que estamos perante um método linear. O teste de homogeneidade de variâncias permitiu concluir que as variâncias dos limites da gama de trabalho não são susceptíveis de influenciar a linearidade do método. Obteve-se um valor de PG inferior ao $F_{\text{crítico}}$ (obtido pelo teste F-Snedecor).

Em todas as rectas analisadas, o valor do coeficiente de correlação estava dentro do critério exigido ($r \geq 0,995$), comprovando que a relação entre o sinal medido e as concentrações dos respectivos padrões está bem adaptada.

O limite de quantificação do método está bem calculado pois obteve-se um $LQ = 0,650$ mg N/L. Comparando com o $LQ_{\text{teórico}} = 0,839$ mg N/L. Ao nível do LD, obteve-se um valor de $0,214$ mg N/L, inferior ao $LD_{\text{teórico}} = 0,277$ mg N/L. Com base nestes valores, conclui-se que é possível determinar e quantificar o analito para concentrações até $0,839$ mg N/L, permitindo diferenciar-se do sinal do branco e do sinal de ruído do equipamento.

Ao nível da precisão do método, concluiu-se que o método é preciso, tanto em repetibilidade como em reprodutibilidade, pois o coeficiente de variação em ambos os testes foi inferior a 10%.

Relativamente à exactidão do método, estudou-se a exactidão dos ensaios de recuperação. No primeiro caso, verificou-se que cumpre um critério de aceitação de $\pm 20\%$. Verificou-se também, através do teste *t-student*, aplicado aos ensaios de recuperação, que os erros sistemáticos não são significativos.

Após análise da exactidão e precisão, calculou-se a incerteza do método. Constatou-se que o método apresenta uma incerteza de 18 %.

Para o estudo do azoto nítrico, realizaram-se os mesmos testes e cálculos, concluindo-se que o método apresenta uma gama de trabalho bem ajustada, sem variâncias significativas ao nível do teste de homogeneidade de variâncias. O seu limite de quantificação e limite de detecção estão bem estipulados para os critérios exigidos.

O método revelou ser exacto e preciso, na gama de concentrações aplicadas. Para finalizar, calculou-se a incerteza do método, obtendo-se uma incerteza de 16 %.

O método de determinação de azoto total não apresenta curvas de calibração nem gamas de trabalho. O método baseia-se na quantificação por titulimetria. O seu

controlo de qualidade cinge-se a dois padrões de controlo (o referente ao LQ controla todo o processo de tratamento da amostra e o segundo padrão controla o volume máximo de titulante gasto), ao ensaio em branco e à padronização do titulante. Este controlo é ainda acompanhado de duplicados e ensaios de recuperação.

O estudo de repetibilidade e reprodutibilidade para os padrões, ensaio em branco e padronização do titulante, cumpriram os critérios exigidos (CV inferior a 10%). No que diz respeito aos ensaios de recuperação, também foram cumpridos os requisitos exigidos. Logo, verificou-se que o método é exacto e preciso. A incerteza calculada foi de 20 %.

Como se verifica, os três métodos cumprem os requisitos necessários à sua revalidação. Concluiu-se assim que é possível continuar a analisar os ensaios solicitados com rigor e certeza no resultado reportado.

No entanto, salienta-se o facto de, no futuro, se pretender realizar testes laboratoriais aos métodos estudados. Relativamente ao tempo de digestão/ lixiviação dos ensaios, tempo de destilação e volume de reagentes utilizados. A economia de tempo e recursos é sempre uma mais valia na área em estudo.

5 Referências

- [1] Militão, Cristina M. T., *Estudo do ciclo do azoto. Uma aplicação para o ensino*, Departamento de Botânica, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **2004**, Porto
- [2] <http://www.nature.com/scitable/knowledge/library/the-nitrogen-cycle-processes-players-and-human-1564463>, *The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact | Learn Science at Scitable*, acedido a 03-01-2016
- [3] <http://www.lenntech.com/nitrogen-cycle.htm>, *Nitrogen Cycle*, acedido a 02-01-2016
- [4] Ferree, M., Shannon, R. D., *Wat. Res.*, **2001**, 35 (1), 327-332;
- [5] Decreto – Lei nº 276/2009 publicado em Diário da República, 1.ª série — N.º 192 — 2 de Outubro de 2009, referente à legislação para lamas de ETAR's e solos
- [6] http://www.aguasdosado.pt/backoffice/files/file_180_1_1318416801.pdf, *file_180_1_1318416801.pdf*, acedido a 06-04-2016
- [7] Norma EN 12880:2000, *Charaterization of sludges – Determination of dry residue and water content*, European Standard, **2000**
- [8] Norma ISO 11464:2006, *Soil Quality – Pretreatment of samples for physico – chemical analysis*, International Standard, **2006**
- [9] Norma ISO 14256-1:2003 – *Soil Quality – Determination of nitrate and ammonium in field-moist soils by extraction with potassium chloride solution*, Internantional Standard, **2003**
- [10] NIIR Board, *Modern Technology of Oils, Fats & its Derivatives*, 2nd Edition, Asia Pacific Business Press Inc., **2013**
- [11] Wang, L. K., Hung, Y., Shammass N. K., *Handbook of Environmental Engineering – Advanced Physicochemical Treatment Processes, Volume 4*, 1st Edition, Human Press Inc., **2004**, New Jersey
- [12] Skoog, Douglas A., West, Donald M., Holler F. James, Crouch, Stanley R., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th Edition, Brooks/Cole Cengage Learning, **2013**, USA

- [13] <http://www.chemavishkar.com/2013/06/bollman-extractor-or-basket-extractor.html>, *Bollman Extractor OR Basket Extractot | ChemAvishKar*, acessido a **07-06-2016**
- [14] <http://www.steviashantanu.com/new-extraction-methods>, *New Methods for Stevia Extraction*, acessido a **07-06-2016**
- [15] <http://www.heidolph-instruments.com/products/shakers-mixers/overhead-shakers/reax-2012/reax-2012-overead-shaker-from-heidolph/>, *Reax 20/12 - Overhead Shaker from Heidolph*, acessido a **07-06-2016**
- [16] <http://www.medicalexpo.es/prod/heidolph/product-104361-683773.html>, *Agitador de laboratorio / aéreo / rotativo / analógico – Reax 20/12 – Heidolph – Vídeos*, acessido a **07-06-2016**
- [17] <http://www.chem.umass.edu/~samal/269/distill.pdf>, *distillation*, acessido a **13-03-2016**
- [18] <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/Distillation/Distillation.html>, *Distillation*, acessido a **13-03-2016**
- [19] <http://www.che.utah.edu/~ring/Design%20I/Articles/distillation%20design.pdf>, *distillation.pdf*, acessido a **13-03-2016**
- [20] <http://www.gerhardt.de/en/product-lines/steam-distillation/distillation-systems-vapodestr/>, *Distillation Systems VAPODEST®*, acessido a **09-03-2016**
- [21] <http://gradestack.com/CBSE-Class-11th-Science/Organic-Chemistry-Some/Fractional-and-Steam/17562-3564-29269-study-wtw>, *Fractional and Steam Distillation – Organic Chemistry – Some Basic Principles and Techniques – Everonn – CBSE Class 11th Science with Maths*, acessido a **11-03-2016**
- [22] <http://www.chemguide.co.uk/physical/phaseeqia/immiscible.html>, *immiscible liquids and steam distillation*, acessido a **11-03-2016**
- [23] *A Guide To Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus, LABCONCO, an Industry Service Publication*, <http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>, acessido a **11-10-2015**

- [24] Castro, Augusto, et al, *Guia Relacre 13 – Validação de Métodos internos de ensaio em análise química*, 1ª Edição, **2000**, Relacre
- [25] Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*, Instituto Português da Qualidade, **2005**
- [26] Norma ISO 8466 – 1:1990, *Water Quality – Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*, International Standard, **1990**
- [27] L. Huber, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*, Interpharm, Informa Healthcare, New York, USA, **2007**
- [28] <http://www.nist.gov>, *National Institute of Standards and Technology*, acedido a **14-05-2016**
- [29] <https://ec.europa.eu/jrc/institutes/irmm/>, *IRMM – JRC Science Hub – European Commission*, acedido a **14-05-2016**
- [30] <https://www3.epa.gov>, *US Environmental Protection Agency*, acedido a **14-05-2016**
- [31] <http://www.relacre.pt/pt/home>, *Relacre – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal*, acedido a **14-05-2016**
- [32] <https://www.lgcpt.com/productviewnarrow.aspx?SchemeID=77>, *LGC Standards – Excellence through measurement*, acedido a **14-05-2016**
- [33] <http://www.bipea.org>, *Home page | BIPEA*, acedido a **14-05-2016**
- [34] <http://www.iso.org/iso/home.html>, *ISO – International Organization for Standardization*, acedido a **14-05-2016**
- [35] <http://iupac.org>, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, acedido a **14-05-2016**
- [36] Norma ISO 11352:2012 – *Water Quality – Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*, International Standard, **2012**
- [37] OGC007, *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos*, Instituto Português de Acreditação (IPAC), **2007**

[38] Norma EN 13342:2000 – *Characterisation of sludges – Determination of Kjeldahl Nitrogen*, European Standard, **2000**

[39] Rodier, Jean, *L'Analyse de l'eau*, 9^e édition, Dunod, **2009**

[40] Rice, E. W., Baird, R. B., Eaton, A. D., Clesceri, L. S., *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, American Public Health Association, 22nd Edition, 2012, Washington