

Mestrado em Engenharia Química  
Optimização Energética na Indústria Química

**Tânia Rebelo**

Julho  
2009

**Implementação, validação e  
análise técnico-económico de alguns  
parâmetros analíticos no controlo de águas**



---

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b><i>Título</i></b>             | Implementação, validação e análise técnico-económico de alguns parâmetros analíticos no controlo de águas |
| <b><i>Autor(a)</i></b>           | Tânia Sofia Cardoso Ribeiro Rebelo  |
| <b><i>Orientador(a)</i></b>      | Maria Goreti Ferreira Sales   |
| <b><i>Co-orientadores</i></b>    | Ana Margarida Fernandes Heitor<br>Sofia Alexandra Alves Almeida   |
| <b><i>Data da publicação</i></b> | Julho de 2009   |

---

Esta publicação não pode ser reproduzida nem transmitida, no todo ou em parte, por qualquer processo aleatório, mecânico, fotocópia, gravação ou outros, sem prévia autorização escrita do autor.

## Agradecimentos

À Doutora Maria Goreti Sales, pelo acompanhamento científico, pela dedicação, pelo carinho, pela confiança que depositou em mim e por toda a disponibilidade e incentivo.

À Dr.<sup>a</sup> Ana Margarida Heitor, assessora do Centro de Qualidade Hídrica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, por toda a colaboração prestada ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

À minha amiga Eng.<sup>a</sup> Sofia Almeida, pela ajuda ao longo deste trabalho, pelo incentivo, mas principalmente por todo o carinho e dedicação.

A todas as pessoas do laboratório do Centro de Qualidade Hídrica do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge que, em algum momento, contribuíram com os seus saberes e/ou amizade para levar a bom termo a presente dissertação.

Ao meu marido, Rui Rebelo, pela paciência que demonstrou ao longo deste trabalho, mas principalmente por todo o carinho, apoio e dedicação.

Aos meus pais e restante família por todo o apoio e compreensão.

## Resumo

A presente dissertação descreve a validação de métodos internos em análise química, dedicados às determinações de boro, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e turvação em águas de consumo. Esta validação é baseada em valores analíticos de amostras que dão entrada no Centro de Qualidade Hídrica do Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – Delegação do Porto.

A validação desses métodos passou pela avaliação das principais características de desempenho do método, nomeadamente gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, limites de detecção e de quantificação e exactidão e precisão. O estabelecimento dessas características para cada um dos métodos seguiu um desenvolvimento experimental específico, tendo-se avaliado a qualidade dos resultados por tratamento estatístico adequado.

Para além da validação do método foram estabelecidas cartas de controlo com os valores analíticos obtidos, no sentido de simplificar os procedimentos de rotina do laboratório.

De acordo com os resultados obtidos foram validadas as metodologias relativas à determinação de boro e da turvação. A metodologia de determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ainda se encontra em desenvolvimento. Relativamente às metodologias validadas foi ainda realizada uma análise económica.

Palavras-chave: Validação, boro, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, turvação e água.

## Abstract

This work reports the validation of analytical methods for boron, polycyclic aromatic hydrocarbons and turbidity determinations in water. Samples used for this purpose are from the Centro de Qualidade Hídrica of the Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira of the Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – Delegação do Porto.

The main analytical features of the previous methods were established for this purpose. Working concentration range, linearity properties, sensitivity, limits of detection and quantification, and accuracy and precision were included here. Each feature was studied by means of a specific procedure. The quality of the obtained results was evaluated after suitable statistical treatment.

Several control charts were reported, with the purpose of defining upper and lower values of warning and control limits, which are useful data in routine applications of the validated methods.

The data reported here allowed the validation of the methods for boron and turbidity determinations. Polycyclic aromatic hydrocarbon methods are still under development. An economical analysis is also carried out.

Keywords: Validation, boron, polycyclic aromatic hydrocarbons, turbidity and water.

## Índice Sistemático

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Introdução</b> .....  | <b>1</b>  |
| 1.1. <i>Caracterização de Métodos Internos</i> .....              | 2         |
| 1.1.1. Descrição do Método .....                                  | 2         |
| 1.1.2. Avaliação Analítica.....                                   | 3         |
| 1.1.2.1. Avaliação Indirecta.....                                 | 4         |
| 1.1.2.2. Avaliação Directa .....                                  | 9         |
| 1.2. <i>Qualidade dos Resultados</i> .....                        | 12        |
| 1.2.1. Exactidão e Precisão .....                                 | 12        |
| 1.2.2. Incerteza e Erro .....                                     | 12        |
| 1.2.3. Critérios de Aceitação .....                               | 13        |
| 1.2.4. Algarismos Significativos .....                            | 13        |
| 1.2.5. Documentação.....  | 14        |
| 1.3. <i>Controlo da Qualidade</i> .....                           | 14        |
| 1.3.1. Controlo de Qualidade Externo .....                        | 14        |
| 1.3.2. Controlo de Qualidade Interno .....                        | 17        |
| 1.3.2.1. Duplicados .....   | 17        |
| 1.3.2.2. Amostras “Cegas” .....                                   | 18        |
| 1.3.2.3. Ensaios de Recuperação .....                             | 18        |
| 1.3.3. Cartas de Controlo.....                                    | 18        |
| 1.4. <i>Incertezas</i> .....                                      | 22        |
| 1.4.1. Quantificação da Incerteza Associada à Precisão.....       | 23        |
| 1.4.2. Quantificação da Incerteza Associada à Exactidão.....      | 24        |
| 1.5. <i>Apresentação de Resultados de Análises Químicas</i> ..... | 25        |
| 1.5.1. Validação Técnica de Resultados .....                      | 25        |
| 1.5.2. Apresentação Técnica de Resultados.....                    | 25        |
| <b>2. Determinação de Boro</b> .....                              | <b>27</b> |
| 2.1. <i>Metodologias Analíticas</i> .....                         | 28        |
| 2.2. <i>Parte Experimental</i> .....                              | 31        |
| 2.2.1. Material e Aparelhos Utilizados.....                       | 31        |
| 2.2.2. Reagentes .....  | 31        |
| 2.2.3. Soluções.....  | 31        |
| 2.2.4. Preparação de Soluções não Padrão.....                     | 31        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.5     | Preparação de Padrões .....                                  | 32        |
| 2.2.5.1.  | Preparação das Soluções Padrão de Calibração .....           | 32        |
| 2.2.5.2.  | Preparação da Solução Padrão de Controlo .....               | 32        |
| 2.2.5.3.  | Ensaio de Recuperação .....                                  | 32        |
| 2.2.6.    | Recolha e Conservação da Amostra .....                       | 32        |
| 2.2.5.    | Procedimento Analítico .....                                 | 33        |
| 2.3.      | <i>Resultados e Discussões</i> .....                         | 33        |
| 2.3.1     | Validação do Método .....                                    | 33        |
| 2.3.1.1.  | Gama de Trabalho .....                                       | 33        |
| 2.3.1.2.  | Estudo do Limite de Quantificação .....                      | 34        |
| 2.3.1.3.  | Estudo da Linearidade .....                                  | 34        |
| 2.3.1.4.  | Estudo de Precisão e Exactidão .....                         | 35        |
| 2.3.1.5.  | Estudo da Sensibilidade .....                                | 37        |
| 2.3.1.6.  | Incerteza Associada aos Resultados do Método de Ensaio ..... | 37        |
| 2.3.2     | Plano de Controlo Interno .....                              | 39        |
| 2.3.3.    | Controlo de Rotina .....                                     | 39        |
| 2.3.3.1   | Carta de Média e de Amplitudes .....                         | 39        |
| 2.3.3.2.  | Carta de Controlo de Duplicados de Amostra .....             | 41        |
| 2.3.4.    | Análise Técnico Económica .....                              | 42        |
| <b>3.</b> | <b>Determinação de HAPs</b> .....                            | <b>45</b> |
| 3.1.      | <i>Metodologias Analíticas</i> .....                         | 49        |
| 3.2.      | <i>Parte Experimental</i> .....                              | 54        |
| 3.2.1.    | Material e Aparelhos Utilizados .....                        | 54        |
| 3.2.2.    | Reagentes .....  | 54        |
| 3.2.3.    | Soluções .....   | 55        |
| 3.2.4     | Preparação de Padrões .....                                  | 55        |
| 3.2.4.1.  | Preparação das Soluções Padrão de Calibração .....           | 55        |
| 3.2.4.2.  | Preparação das Soluções Padrões Individuais .....            | 55        |
| 3.2.5.    | Pré-Tratamento das Soluções Padrão .....                     | 55        |
| 3.3.      | <i>Resultados e Discussão</i> .....                          | 56        |
| <b>4.</b> | <b>Determinação de Turvação</b> .....                        | <b>57</b> |
| 4.1.      | <i>Metodologias Analíticas</i> .....                         | 58        |
| 4.2.      | <i>Procedimento Experimental</i> .....                       | 59        |
| 4.2.1.    | Material e Aparelhos Utilizados .....                        | 59        |
| 4.2.2.    | Reagentes .....  | 59        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.2.3. Soluções .....   | 59        |
| 4.2.4. Calibração do Equipamento .....                                | 59        |
| 4.2.5 Preparação de Padrões .....                                     | 60        |
| 4.2.5.1. Soluções Padrão de Calibração .....                          | 60        |
| 4.2.5.2. Soluções Padrão de Gelex.....                                | 60        |
| 4.2.5.3. Solução Padrão de Controlo do LQ.....                        | 61        |
| 4.2.6. Recolha e Conservação da Amostra.....                          | 61        |
| 4.2.7. Procedimento Analítico .....                                   | 61        |
| <i>4.3. Resultados e Discussões.....</i>                              | <i>61</i> |
| 4.3.1 Validação do Método .....                                       | 61        |
| 4.3.1.1. Gama de Trabalho .....                                       | 62        |
| 4.3.1.2. Estudo da Sensibilidade.....                                 | 62        |
| 4.3.1.3. Estudo do Controlo de Brancos .....                          | 63        |
| 4.3.1.4. Estudo de Precisão e Exactidão.....                          | 64        |
| 4.3.1.5. Estudo da Linearidade .....                                  | 65        |
| 4.3.1.6. Estudo do Limite de Quantificação.....                       | 66        |
| 4.3.1.7. Controlo dos Padrões de Gelex 1,8 NTU .....                  | 67        |
| 4.3.1.8. Controlo do Padrão de Gelex 18 NTU.....                      | 68        |
| 4.3.1.9. Incerteza Associada aos Resultados do Método de Ensaio ..... | 68        |
| 4.3.2 Plano de Controlo Interno .....                                 | 71        |
| 4.3.3. Controlo de Rotina .....                                       | 71        |
| 4.3.3.1. Carta de Controlo de Duplicados de Amostra .....             | 71        |
| 4.3.4. Análise Técnico-Económica.....                                 | 72        |
| <b>5 Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro .....</b>            | <b>73</b> |
| <b>6. Bibliografia.....</b>   | <b>75</b> |

## **Anexos**

**Anexo A** *Generalidades*

**Anexo B** *Determinação de boro*

**Anexo C** *Determinação de HAPs*

**Anexo D** *Determinação de turvação*

## Índice de Figuras

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 1</b>  | Correlação positiva e negativa, respectivamente.....  | 5  |
| <b>Figura 2</b>  | Exactidão e precisão. ....  | 12 |
| <b>Figura 3</b>  | Valor verdadeiro e incerteza do resultado.....  | 13 |
| <b>Figura 4</b>  | Avaliação do desempenho. ....   | 16 |
| <b>Figura 5</b>  | Hierarquia de padrões. ....   | 16 |
| <b>Figura 6</b>  | Exemplo de uma carta de valores individuais para o tampão 4 de pH. ....   | 19 |
| <b>Figura 7</b>  | 1 ponto fora de $\pm 3\sigma$ , a probabilidade normal de acontecer é de 0,3%. ....                                   | 21 |
| <b>Figura 8</b>  | 2 pontos em 3 pontos consecutivos fora de $\pm 2\sigma$ , a probabilidade normal de acontecer foi ultrapassada.....   | 21 |
| <b>Figura 9</b>  | 4 pontos em 5 pontos consecutivos fora de $\pm 1\sigma$ , a probabilidade normal de acontecer foi ultrapassada.....   | 21 |
| <b>Figura 10</b> | 15 pontos consecutivos dentro de $\pm 1\sigma$ , o desvio padrão actual é inferior ao teórico. ....                   | 21 |
| <b>Figura 11</b> | 9 pontos consecutivos de um dos lados da média, existe um desvio sistemático relativamente ao valor estabelecido..... | 21 |
| <b>Figura 12</b> | 8 pontos consecutivos fora de $\pm 1\sigma$ , existem duas distribuições em vez de uma só. ....                       | 21 |
| <b>Figura 13</b> | 6 pontos consecutivos a subir ou a descer, existe uma tendência não aleatória. ....                                   | 21 |
| <b>Figura 14</b> | 14 pontos consecutivos alternando a subir e a descer, existe uma série temporal que afecta os dados.....              | 21 |
| <b>Figura 15</b> | Gama de trabalho.....   | 34 |
| <b>Figura 16</b> | Estudo do limite de quantificação. ....   | 35 |
| <b>Figura 17</b> | Estudo da linearidade.....  | 35 |
| <b>Figura 18</b> | Estudo da precisão e exactidão.....   | 36 |
| <b>Figura 19</b> | Estudo da sensibilidade.....  | 37 |
| <b>Figura 20</b> | Incerteza associada aos resultados do método de ensaio. ....  | 38 |
| <b>Figura 21</b> | Valores para cálculo dos limites de aviso e de controlo das cartas de controlo. ....                                  | 40 |
| <b>Figura 22</b> | Carta de médias. ....   | 41 |
| <b>Figura 23</b> | Carta de amplitudes. ....   | 41 |
| <b>Figura 24</b> | Carta de controlo de duplicados de amostra.....   | 42 |
| <b>Figura 25</b> | Estruturas dos HAPs mais importantes. ....  | 46 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 26</b> | Transporte dos HAPs pelas diferentes fontes de exposição. ....        | 49 |
| <b>Figura 27</b> | Estudo da gama de trabalho.....                                       | 62 |
| <b>Figura 28</b> | Critérios de aceitação para o declive e para ordenada na origem. .... | 63 |
| <b>Figura 29</b> | Estudo do controlo de brancos. ....                                   | 64 |
| <b>Figura 30</b> | Estudo de precisão e exactidão.....                                   | 64 |
| <b>Figura 31</b> | Estudo da linearidade.....  | 65 |
| <b>Figura 32</b> | Estudo do limite de quantificação. ....                               | 66 |
| <b>Figura 33</b> | Estudo dos valores padrão de controlo gelex 1,8 NTU .....             | 67 |
| <b>Figura 34</b> | Estudo dos valores padrão de controlo gelex 18 NTU. ....              | 68 |
| <b>Figura 35</b> | Incerteza associada aos resultados do método de ensaio.....           | 70 |
| <b>Figura 36</b> | Carta de controlo de duplicados da amostra.....                       | 71 |

## Índice de Tabelas

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b> | Tipo de cartas de controlo. ....                                  | 20 |
| <b>Tabela 2</b> | Determinação do boro. ....  | 30 |
| <b>Tabela 3</b> | Consumo de reagentes para a determinação de boro. ....            | 43 |
| <b>Tabela 4</b> | Determinação dos HAPs por cromatografia líquida (HPLC).....       | 51 |
| <b>Tabela 5</b> | Determinação dos HAPs por cromatografia gasosa (GC).....          | 52 |
| <b>Tabela 6</b> | Determinação dos HAPs por métodos ópticos de luminescência. ....  | 53 |
| <b>Tabela 7</b> | Soluções padrão compreendidas na gama de trabalho 0,2-20 NTU..... | 60 |

## Lista de abreviaturas

|               |   |
|---------------|---|
| <b>R</b>      | Coeficiente de correlação                         |
| <b>CQ</b>     | Controlo de qualidade                             |
| <b>Er</b>     | Erro relativo                                     |
| <b>En</b>     | Erro normalizado                                  |
| <b>EIL</b>    | Ensaio interlaboratoriais                         |
| <b>Z</b>      | Factor de desempenho                              |
| <b>HAPs</b>   | Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos           |
| <b>IUPAC</b>  | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| <b>LD</b>     | Limite de detecção                                |
| <b>LQ</b>     | Limite de quantificação                           |
| <b>r</b>      | Limite de repetibilidade                          |
| <b>re</b>     | Limite de reprodutibilidade                       |
| <b>LC</b>     | Limite central                                    |
| <b>LSA</b>    | Limite superior de aviso                          |
| <b>LIA</b>    | Limite inferior de aviso                          |
| <b>LSC</b>    | Limite superior de controlo                       |
| <b>LIC</b>    | Limite inferior de controlo                       |
| <b>MRCs</b>   | Materiais de referência certificados              |
| <b>MR</b>     | Material de referência                            |
| <b>MRI</b>    | Materiais de referência internos                  |
| <b>SQ</b>     | Sistema da qualidade                              |
| <b>PG</b>     | Teste de homogeneidade de variâncias              |
| <b>t</b>      | Teste de hipóteses, (teste t)                     |
| <b>UV/Vis</b> | Ultra-violeta visível                             |
| <b>NTU</b>    | Unidade nefelométrica de turbidez                 |

## 1. Introdução

O laboratório deve validar métodos não normalizados, métodos concebidos ou desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização previsto e extensões ou modificações de métodos normalizados, no sentido de confirmar que os métodos são adequados à utilização prevista [1]. Relativamente ao Centro de Qualidade Hídrica do Centro de Saúde Pública Doutor Gonçalves Ferreira do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) que apresenta quase todos os seus métodos validados, importam estudar três metodologias relativas às determinações de boro, de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e de turvação.

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 [1]. Para isso, há que verificar a conformidade do método com vários critérios, através de ensaios que estejam ajustados à natureza do método e das amostras a analisar.

De uma forma geral, a validação requer a caracterização completa da metodologia em causa. Esta caracterização passa pelo estudo dos seguintes parâmetros: gama de trabalho; linearidade; limiares analíticos (limites de detecção e quantificação); sensibilidade; precisão e exactidão [2].

## 1.1. Caracterização de Métodos Internos

A caracterização do método impõe a elaboração de documentos descritivos que devem conter toda a informação necessária para a reprodução e/ou execução da metodologia correspondente. Além disso, impõem-se neste contexto, a avaliação de alguns parâmetros analíticos capazes de descreverem as características de operacionalidade do método. Em termos de rotina laboratorial, os documentos produzidos nesta fase devem encontrar-se, de uma forma geral, facilmente acessíveis, devendo respeitar também algumas especificidades legais. Neste sentido, a caracterização do método passa por estas etapas fundamentais, iniciando-se pela descrição do método.

### 1.1.1. Descrição do Método

Quando se pretende validar um método interno de ensaio ter-se-á de efectuar a sua descrição e caracterização. A descrição dos métodos internos de ensaio deve ser feita em documentos, de forma detalhada, para que qualquer pessoa com preparação adequada os possa executar. Estes documentos deverão conter os mesmos elementos de uma norma, divididos em elementos identificadores do documento e elementos descritivos do método. A identificação do documento passa pela apresentação dos documentos seguintes: (i) título ou designação do ensaio; (ii) código identificador do ensaio; (iii) revisão/edição; (iv) data de entrada em vigor e responsáveis pela sua elaboração e aprovação; e (v) número de cada página e número total de páginas. Para a descrição do método incluem-se de uma forma genérica os elementos seguintes: (i) resumo ou referência aos princípios teóricos da determinação, indicando as grandezas influentes no resultado; (ii) campo de aplicação (tipo de produtos, grandeza a determinar, gama de medição, restrições, etc.); (iii) equipamento, material e reagentes; (iv) processo de calibração (utilização de padrões, ensaios de referência ou em branco, traçado da curva de calibração, etc.); (v) procedimento de ensaio (condições operatórias, condições ambientais, critérios de aceitação/rejeição, etc.); e (vi) processo de cálculo dos resultados (fórmulas, tratamentos de dados, apresentação de resultados, etc.).

Os documentos deverão, quando aplicável, incluir elementos/registos complementares sobre: (i) amostragem (colheita, preparação, conservação e acondicionamento das amostras); (ii) características do método utilizado pelo laboratório; (iii) preocupações de segurança; (iv) validação do método; (v) validação e controlo do “Software” (cálculos e apresentação de resultados); (vi) controlo de aplicações em rotina; e (vii) cálculo de Incertezas.

### 1.1.2. Avaliação Analítica

O processo de validação de métodos internos deve incluir todos os registos obtidos para o(s) ensaio(s) em questão. Deve ser adaptado a cada caso, sendo progressivamente mais exigente para as situações indicadas: (i) uma modificação menor da técnica e/ou do equipamento e/ou do produto relativamente a uma norma (ou documento normativo equivalente) existente; neste caso as alterações não levantam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados; (ii) uma modificação maior da técnica e/ou do equipamento e/ou do produto relativamente a uma norma (ou documento normativo equivalente) existente; neste caso as alterações originam dúvidas sobre a equivalência técnica dos resultados; (iii) método baseado em técnica de ensaio conhecida, cuja aplicação ao ensaio pretendido venha descrita em literatura científica, não existindo norma de ensaio correspondente; (iv) método de ensaio baseado em técnica de ensaio conhecida, cuja aplicação ao ensaio pretendido não venha descrita em literatura científica; e (v) método baseado em técnicas de ensaio, inovadoras, não descritas na literatura científica.

Geralmente, as duas primeiras situações são as mais frequentes, enquanto as duas últimas se encontram mais em laboratórios de investigação. Após a avaliação do grau de exigibilidade requerido para um método interno será necessário realizar estudos de validação antes de o colocar em rotina, durante a sua implementação ou sempre que ocorra uma alteração relevante do mesmo.

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio [2] dependem do tipo de método em causa e compreendem, geralmente, o estudo dos parâmetros seguintes: (i) gama de trabalho; (ii) linearidade; (iii) limiares analíticos (limites de detecção e quantificação); (iv) sensibilidade; (v) precisão; e (vi) exactidão.

A validação de uma dada metodologia impõe a selecção dos parâmetros mais adequados à sua validação. Por exemplo, para análises qualitativas não faz sentido determinar o limite de quantificação, a precisão, a exactidão e a linearidade/gama de trabalho. Neste tipo de análises o limite de detecção, a selectividade/especificidade e a robustez são os pontos mais importantes na validação. Em análise quantitativa, e caso o método seja aplicado em gamas vestigiais, já todos os requisitos acima mencionados são importantes. No caso de métodos quantitativos, com aplicações a gamas de concentrações elevadas, não faz sentido estudar os limiares analíticos. Para métodos inovadores, o estudo da robustez do método poderá ser um factor chave para validar o mesmo. Assim, cabe ao laboratório analisar quais os parâmetros a incluir no seu plano de validação, perante o tipo de metodologia em questão.

Independentemente dos ensaios serem de natureza qualitativa ou quantitativa, a avaliação poderá ser realizada de modo directo ou indirecto.

#### 1.1.2.1. Avaliação Indirecta

A avaliação indirecta é efectuada por determinação e evidência dos parâmetros característicos relacionados com (i) a especificidade/selectividade, (ii) com parâmetros de quantificação e (iii) com a precisão, (iv) a exactidão e (v) a robustez.

Relativamente ao ponto (i) é importante referir que a selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir o analito que se pretende determinar, em particular numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes. Para este efeito torna-se necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra. Para avaliar o grau de interferência de um dado composto poder-se-á realizar um teste de recuperação, utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. As amostras devem ser analisadas em duplicado e em condições de repetibilidade. Um método analítico pode ser considerado aplicável em termos de selectividade quando, na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as taxas de recuperação são próximas de 100%. No entanto, cada laboratório deve definir os critérios de aceitação relativos às taxas de recuperação conseguidas, com base em dados e factos credíveis.

No que diz respeito ao ponto (ii), para interpretar as informações dos estudos e ensaios efectuados de natureza quantitativa, o analista apoia-se no cálculo de vários parâmetros, entre os quais se destacam: (a) curvas de calibração; (b) limiares analíticos do método de ensaio; e (c) sensibilidade.

A calibração (a) indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Para este efeito, a calibração analítica requer métodos instrumentais de análise e a preparação de uma série de soluções padrão em que a concentração do parâmetro a dosear é conhecida. Estas soluções padrão de calibração são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar. Por fim, estabelece-se um gráfico de calibração (sinal instrumental em função da concentração). A concentração do parâmetro nas amostras determina-se por substituição na equação que define o comportamento do sinal analítico em função da concentração.

A forma algébrica da equação de uma recta é dada por:

$$y = a + b \times x \quad (\text{eq. 1.1})$$

em que  $a$  representa a ordenada na origem e  $b$  o declive da recta. O cálculo do coeficiente de correlação ( $R$ ) é usado como um dos parâmetros para avaliar uma calibração analítica. Este cálculo é efectuado com base na equação seguinte:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N \{(xi - \bar{x}) \times (yi - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (xi - \bar{x})^2 \times \{\sum_{i=1}^N (yi - \bar{y})^2\]}} \quad (\text{eq. 1.2})$$

O valor do coeficiente de correlação pode tomar valores entre -1 e +1 ( $-1 \leq R \leq +1$ ). Na Fig. 1, verifica-se que um valor de  $R = +1$  representa uma correlação positiva (recta de declive positivo) e que um valor de  $R = -1$  representa uma correlação negativa (declive negativo).

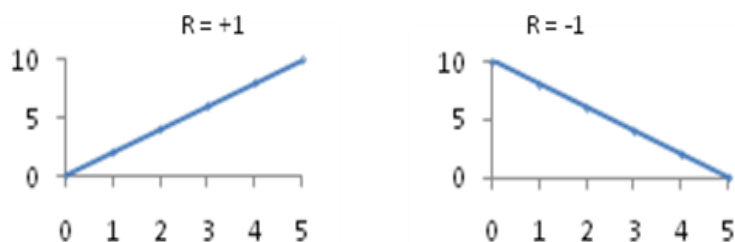


Figura 1 Correlação positiva e negativa, respectivamente.

Em análise química, dependendo dos critérios internos do laboratório e do próprio método analítico, as curvas de calibração devem, geralmente, ter valores  $R$ , em módulo, superiores a 0,995. Esta condição evidencia uma forte correlação. Para além deste parâmetro, é de grande importância avaliar a gama de trabalho e a linearidade.

A relação matemática, tipicamente linear, estabelecida entre o sinal analítico e a concentração não é válida para todos os valores de concentração. Em geral, o intervalo de concentrações para os quais o sistema respeita esta relação é chamado gama de trabalho. Esta gama de trabalho deve também incluir os níveis de concentração da amostra em estudo. Em termos práticos, ela pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. Para métodos que não envolvam o traçado de curvas de calibração, a gama de trabalho terá de ser definida previamente e poderá ser função de alguns factores como a quantidade de amostra disponível ou da boa visualização dos pontos de viragem e volumes gastos, no caso das volumetrias.

Para o teste de homogeneidade de variâncias determinam-se as variâncias associadas ao primeiro e último padrão ( $S^2_1$  e  $S^2_{10}$ ) do seguinte modo:

$$S^2_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (\text{eq. 1.3})$$

com,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (\text{eq. 1.4})$$

para  $i = 1$  e  $i = 10$ , sendo:  $i$  o número do padrão e  $j$  o número de repetições efectuadas para cada padrão. As variâncias são testadas para despistar a existência de diferenças significativas entre elas nos limites da gama de trabalho, efectuando o cálculo do valor do teste PG de acordo com:

$$\text{a) } PG = \frac{S^2_{10}}{S^2_1} \quad (\text{eq. 1.5})$$

$$\text{b) } PG = \frac{S^2_1}{S^2_{10}} \quad (\text{eq. 1.6})$$

aplicando-se a) quando  $S^2_{10} > S^2_1$  ou b) quando  $S^2_1 > S^2_{10}$ . Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher, para  $n-1$  graus de liberdade. Se  $PG \leq F$  as diferenças de variâncias não são estatisticamente significativas e a gama de trabalho está bem ajustada. Se  $PG > F$  as diferenças de variâncias são estatisticamente significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que a diferença entre as variâncias relativas ao 1º e último padrão permitam obter  $PG \leq F$ .

A linearidade pode ser avaliada através da representação gráfica da função juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação, pelo que deve ser estudada durante a fase de validação/implementação do método de ensaio, ou sempre que se justifique.

Relativamente aos parâmetros de quantificação (b) é importante identificar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ). Os conceitos de LD e de LQ devem ser entendidos conforme recomendado pela IUPAC (International Union of Pure and

Applied Chemistry). O LD corresponde ao início da gama em que é possível distinguir, com uma dada confiança estatística (normalmente 95%), o sinal do branco do sinal da amostra e como tal indicar se o analito em questão está ausente ou presente. Uma leitura inferior ao LD não significa a ausência de analito a medir; pode afirmar-se apenas que, com uma probabilidade definida, a concentração do componente em causa será inferior a um certo valor. O LQ corresponde ao início da gama em que o coeficiente de variação (incerteza relativa) do sinal se reduziu a valores razoáveis (normalmente 10%) para se poder efectuar uma detecção quantitativa.

O valor encontrado para LD deve minimizar os erros do tipo I e do tipo II. O erro do tipo I (risco  $\alpha$ ) é a probabilidade de concluir pela presença do componente em análise quando de facto não existe esse componente na amostra. O erro do tipo II (risco  $\beta$ ) é a probabilidade de concluir pela ausência do componente em análise, quando ele de facto existe. Para estes dois tipos de erro usam-se  $\alpha = \beta = 5\%$ , seguindo as recomendações da IUPAC.

Em termos quantitativos o LD é obtido por:

$$LD = X_0 + K \times \sigma_0 \quad (\text{eq. 1.7})$$

em que  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões, preparados de uma forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina; e  $\sigma_0$  representa o desvio padrão associado a  $X_0$ .

Se a probabilidade de  $X_0$  é suficientemente conhecida, e partindo do princípio que segue uma distribuição de Gauss (distribuição normal de erros), então toma-se o valor de  $K \cong 3,3$  para um nível de confiança de 99,7%.

Assim,

$$LD \cong X_0 + 3,3 \times \sigma_0 \quad (\text{eq. 1.8})$$

O LQ corresponde à mais pequena concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito com uma determinada exactidão. Na prática, corresponde ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exactidão e precisão conseguidas são satisfatórias. Segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente

de variação (razão entre o desvio padrão e a média dos valores encontrados) para estes padrões não deve exceder os 10%.

Quantitativamente, o LQ pode ser determinado por:

$$LQ = X_0 + 10 \times \sigma_0 \quad (\text{eq. 1.9})$$

em que  $X_0$  é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões, preparados de uma forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o mais possível a situação de rotina; e  $\sigma_0$  representa o desvio padrão associado a  $X_0$ .

A sensibilidade pode ser definida com o quociente entre o acréscimo do valor lido  $\Delta L$  e a variação da concentração  $\Delta C$  correspondente àquele acréscimo.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (\text{eq. 1.10})$$

Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim, a sensibilidade é definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa recta de calibração. Se a curva de calibração for definida por uma função quadrática (polinómio do 2º grau do tipo  $y = c.x^2 + d.x + e$ ), a sensibilidade será dada por  $y = 2.c.x + d$  no ponto de uma dada concentração.

A precisão, ponto (iii), é um termo geral que pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. Existem duas medidas para avaliar a dispersão: a repetibilidade e a reprodutibilidade.

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como: (i) mesmo laboratório; (ii) mesmo analista; (iii) mesmo equipamento; (iv) mesmo tipo de reagentes; e (v) curtos intervalos de tempo. O limite de repetibilidade ( $r$ ) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, normalmente de 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio ( $X_i; X_{i-1}$ ), obtidos nas condições acima referidas. Na prática, aceitam-se os resultados de duas determinações efectuadas em

condições de repetibilidade se  $|X_i - X_{i-1}| \leq r$ . Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite, dever-se-á, numa primeira fase, fazer uma análise crítica e, caso seja necessário, recorrer à repetição de ensaios segundo um plano baseado em referências bibliográficas ou normas. A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efectuados no próprio laboratório.

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, isto é, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, fazendo-se variar as condições de medição, tais como: (i) diferentes laboratórios; (ii) diferentes analistas; (iii) diferentes equipamentos; e/ou (iv) épocas diferentes. O limite de reprodutibilidade ( $r_e$ ) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica, normalmente 95%, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições acima referidas.

Relativamente à exactidão, ponto (iv), ela deve ser determinada por avaliação directa (ver 1.1.2.2). A robustez de um método de ensaio, ponto (v), mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações de factores capazes de produzir um grande efeito no resultado. Um método diz-se robusto se se revelar praticamente insensível a pequenas variações desses factores que possam ocorrer quando está a ser executado.

### 1.1.2.2. Avaliação Directa

Este tipo de avaliação visa essencialmente conhecer a exactidão dos métodos de ensaio. Esta é definida como a aproximação entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da mensurada [3]. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exactidão de uma metodologia são: (i) materiais de referência certificados; (ii) ensaio interlaboratoriais; e (iii) testes comparativos.

Relativamente ao ponto (i), é importante realçar que os materiais de referência certificados (MRCs) devem ser usados no processo de validação de um método de ensaio. Além disso, estes materiais constituem uma excelente ferramenta no controlo externo da qualidade de uma análise química.

Um MRC possui um valor de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro e uma incerteza associada. O uso dos MRCs consiste na sua análise para avaliar o desempenho do laboratório. O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e a exactidão da análise. Quando o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desse desvio e tentar eliminá-las.

Os resultados obtidos da análise de um MRC podem ser avaliados através de: (i) erro relativo; (ii) teste de hipóteses (teste t); (iii) factor de desempenho Z (*Z-score*); e (iv) erro normalizado. O erro relativo (Er) avalia a exactidão de um método de ensaio através da expressão:

$$Er = \frac{|X_{lab} - X_v|}{X_v} \times 100 \quad (\text{eq. 1.11})$$

em que  $X_{Lab}$  é valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética dos valores obtidos); e  $X_v$  valor aceite como verdadeiro. O erro relativo revela a existência de erros sistemáticos. Cabe ao laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exactidão do método em estudo, estimando o valor máximo de Er aceitável.

O teste de hipóteses (teste  $t$ ) averigua a existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada, através de um teste de hipóteses, o teste t. O valor de t é calculado segundo a expressão:

$$t = \frac{|X_{lab} - X_v| \times \sqrt{N}}{S_{X_{lab}}} \quad (\text{eq. 1.12})$$

em que  $X_{Lab}$  é a média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório na análise do MRC;  $N$  o número de amostras ensaiadas; e  $S_{X_{Lab}}$  o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório ( $X_{Lab}$ ).

Em seguida, o valor de  $t$  é comparado com o valor crítico  $t_{Lab}$  (tabelado para determinado grau de confiança e  $N-1$  graus de liberdade) e toma-se como critério de aceitação. Se  $|t| \leq t_{Lab}$ , não ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos, logo o ensaio é satisfatório. Se  $|t| > t_{Lab}$ , ficou estatisticamente evidenciada a existência de erros sistemáticos, logo o ensaio é não satisfatório.

O factor de desempenho Z (*Z-score*) constitui outra forma de avaliar o desempenho do laboratório na análise de um MRC sendo calculado pela expressão:

$$Z = \frac{|X_{lab} - X_v|}{S} \quad (\text{eq. 1.13})$$

em que  $X_{Lab}$  é o valor obtido pelo laboratório;  $X_v$  o valor aceite como verdadeiro; e  $S$  a unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC. A avaliação poderá ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação: (i) se  $|Z| \leq 2$ : Satisfatório; (ii) se  $2 < |Z| \leq 3$ : Questionável; e (iii) se  $|Z| > 3$ : Insatisfatório.

O erro normalizado (En) permite a avaliação de desempenho quando o valor verdadeiro ( $X_v$ ) não está dentro do intervalo de incerteza ( $U_{Lab}$ ) do resultado do laboratório ( $X_{lab}$ ). O En é calculado pela expressão:

$$En = \frac{|X_{lab} - X_v|}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad (\text{eq. 1.14})$$

em que  $U_{ref}$  é a incerteza associada ao valor verdadeiro. Quando  $|En| \leq 1$ ,  $U_{Lab}$  está bem estimada. Sempre que nos processos de avaliação utilizados não se verificarem as condições satisfatórias, deverá ser elaborado um plano de acções correctivas de forma a procurar as causas do sucedido, corrigi-las e reavaliar o ensaio.

No que diz respeito ao ponto (ii), existem diversos tipos de ensaios interlaboratoriais consoante os objectivos a que se destinam. Poder-se-á referir, entre outros, os ensaios de aptidão e os de normalização. O ensaio interlaboratorial de aptidão destina-se a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes, funcionando em alguns países como condição para a acreditação. Se possível deve ser rastreado a um MRC, podendo, geralmente, os participantes usarem os métodos que acharem convenientes. O ensaio interlaboratorial de normalização destina-se a estudar as características de um método de análise, nomeadamente a sua reprodutibilidade e a sua repetibilidade. Neste caso, é condição de acesso a utilização exclusiva do método em causa. Os resultados obtidos pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais em que participa devem ser objecto de uma análise cuidada, de que resulta um plano de acções correctivas. A avaliação do desempenho do laboratório participante é feita pela entidade organizadora. Em geral é usada a fórmula do Z-score (eq. 1.13).

A realização de testes comparativos, ponto (iii), baseia-se na análise das mesmas amostras por dois métodos diferentes: um deles é o método em estudo e o outro é um método comparativo, tipicamente baseado num princípio científico diferente. O método comparativo escolhido é, sempre que possível, um método de referência aplicável à amostra em estudo.

## 1.2. Qualidade dos Resultados

A qualidade dos resultados de uma análise é função da sua exactidão e precisão, ou seja, quanto mais exactos e precisos forem os resultados, melhor a sua qualidade. O conhecimento desta realidade impõe ao cálculo de incertezas e a estimativa de critérios de aceitação.

### 1.2.1. Exactidão e Precisão

A exactidão avalia a concordância entre o valor verdadeiro e o valor convencionalmente aceite como verdadeiro [4]. A precisão avalia a concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas. Uma forma de representar a exactidão e precisão analítica encontra-se na Fig. 2.

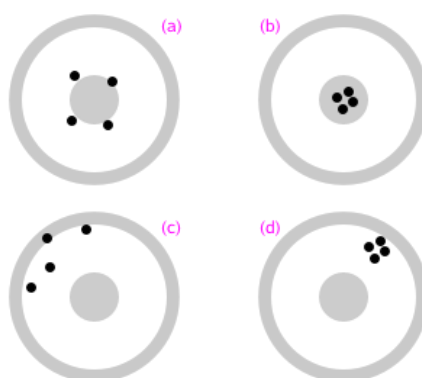


Figura 2 Exactidão e precisão.

Em (a) os resultados são exactos porque, em média, estão próximos do valor verdadeiro, mas não são precisos porque estão dispersos. Em (d) os resultados são precisos porque estão próximos entre si, mas não são exactos porque estão distantes do valor verdadeiro. Em (b) a situação ideal (precisos e exactos) e, em (c), a pior situação, isto é, nem precisos nem exactos.

A precisão pode ser avaliada em termos de repetibilidade ou de reprodutibilidade. Em termos analíticos, torna-se necessário o cálculo de uma incerteza. A exactidão encontra-se tipicamente associada ao erro decorrente do valor medido relativamente ao valor considerado verdadeiro.

### 1.2.2. Incerteza e Erro

A incerteza é o parâmetro associado ao resultado de uma medição que caracteriza a dispersão de valores que se pode razoavelmente atribuir à grandeza

medida (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*). O erro é a diferença entre o valor obtido e o valor convencionalmente aceite como verdadeiro (*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*). Neste sentido, a incerteza exprime a possibilidade de erro do resultado, enquanto o erro é a medida da exactidão do resultado. Esta diferença, pode ser facilmente visualizada na Fig. 3.



Figura 3 Valor verdadeiro e incerteza do resultado.

Quando a incerteza for correctamente estimada, ela pode ser considerada como uma medida da qualidade do resultado, isto é, quanto menor a incerteza, maior a qualidade.

### 1.2.3. Critérios de Aceitação

Os resultados devem satisfazer requisitos de qualidade para serem validados. Para este efeito tornam-se necessários a existência de critérios de aceitação/rejeição da qualidade dos resultados finais, expressos de forma numérica. Estes critérios dependem grandemente do ensaio em causa, com especial relevância para o método e a amostra em estudo.

### 1.2.4. Algarismos Significativos

Um resultado tecnicamente válido, para além de ter sido obtido seguindo uma metodologia adequada, também deve ser apresentado no boletim de análise de forma correcta e coerente. Assim, o número de algarismos significativos apresentados no resultado deve seguir um critério estabelecido, que se pode basear em 2 tipos de considerações: (i) indicações expressas na norma de análise usada; e (ii) incerteza estimada para o resultado.

### 1.2.5. Documentação

O laboratório deve indicar num capítulo do seu manual da qualidade, ou no seu procedimento de ensaio, quais os requisitos de qualidade para o resultado final e quais as acções de controlo de qualidade a efectuar para cumprir esses objectivos de qualidade.

### 1.3. Controlo da Qualidade

Qualquer análise química está sujeita a erros, pelo que é essencial, por um lado, prevenir o seu aparecimento e, por outro, controlar a sua ocorrência, de modo a garantir e melhorar a eficácia do Sistema da Qualidade (SQ) adoptado. Considerando que o objectivo do SQ é garantir e controlar a exactidão dos resultados do dia-a-dia, é necessário avaliar, pontualmente, no tempo, a exactidão dos resultados (a nível externo) e controlar continuamente a precisão (a nível interno) entre estas avaliações.

Após a fase inicial de estudo do equipamento e da técnica analítica e aprovação do método de análise, o laboratório deve exercer um controlo da sua execução, de modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm. Para ter confiança na qualidade dos resultados produzidos e na sua validação é preciso: (i) conhecer e identificar as potenciais causas de erro e tentar eliminá-las; e (ii) possuir um sistema de detecção de erros baseado no controlo do processo analítico.

Neste sentido o laboratório deve possuir um sistema de Controlo de Qualidade (CQ) dos resultados obtidos, entendendo-se CQ como o conjunto de técnicas e actividades de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade [5]. O CQ pode ser externo ou interno. O CQ externo inclui acções efectuadas pelo laboratório, mas cuja realização depende de uma intervenção, ou participação exterior ao laboratório. O CQ interno inclui acções cuja implementação depende apenas da vontade e meios do laboratório, e não de um factor externo.

#### 1.3.1. Controlo de Qualidade Externo

Estas acções são indispensáveis para o laboratório se situar na comunidade laboratorial, e têm geralmente como objectivo avaliar a exactidão dos resultados produzidos. As acções de CQ externo englobam: (i) o uso de MRCs, ou padrões equivalentes; (ii) a participação em ensaios interlaboratoriais (EIL) apropriados, normalmente de aptidão; (iii) a avaliação de desempenho; e (iv) a rastreabilidade.

Estas acções permitem evidenciar um dos objectivos da acreditação: a comparação de resultados. A periodicidade do CQ em rotina deve ser estabelecida em função da

complexidade e das análises, da sua frequência, da experiência anterior, e do nível de confiança exigido aos resultados.

Os MRCs, ponto (i), são cada vez mais um pilar no CQ de uma análise química. Entende-se por material de referência (MR) o material ou a substância com uma (ou mais) propriedade suficientemente bem estabelecida para ser usado na calibração de um equipamento, avaliação de um método de medida ou atribuição de valores a materiais [6]. O MRC é aquele em que o valor de uma (ou mais) propriedade foi certificado por um processo tecnicamente válido, sendo acompanhado ou rastreável a um certificado ou outro documento produzido pela entidade certificadora [6].

De acordo com estas definições, um MR pode ser um padrão preparado pelo laboratório ou um reagente (ou padrão) vendido por uma firma comercial. Um MRC distingue-se pelo facto do valor da concentração (ou outra grandeza) de cada parâmetro ter uma incerteza atribuída (não o grau de pureza).

Os MRCs são usados tipicamente para avaliar o desempenho do laboratório nas determinações dos parâmetros certificados através da análise desses materiais pelo próprio laboratório. Assim, o laboratório pode testar a sua competência e procurar melhorá-la até atingir um nível de qualidade adequado. Os MRC não são usados para o traçado de curvas de calibração mas sim para a sua verificação periódica.

Após a análise de um MRC, deve comparar-se o valor obtido com o valor certificado, determinando-se o erro e a exactidão da análise. Quando o valor obtido não se encontrar dentro do intervalo de incerteza indicado para o valor certificado, o laboratório deve procurar as causas desses desvios e tentar eliminá-las ou aceitá-las.

Os ensaios interlaboratoriais, ponto (ii), impõem a organização, realização e avaliação de ensaios no mesmo (ou similar) item ou material, por dois ou mais laboratórios, de acordo com as condições pré-determinadas [3]. Existem diferentes tipos de ensaios interlaboratoriais, consoante os objectivos a que se destinam. Os resultados obtidos pelo laboratório nestes ensaios devem ser objecto de uma análise cuidada.

Em termos gerais, a participação em EIL permite ao laboratório evoluir tecnicamente, dado que implica trabalhar com amostras diferentes e cujo valor verdadeiro é desconhecido. Para que os ensaios sejam conclusivos, é necessário que se estabeleçam valores de referência fiáveis e credíveis, pelo que se deve optar por EIL que tenham reconhecimento nacional, como a Relacre, ou internacional, como a Aquacheck.

Tal como referido anteriormente, a avaliação do desempenho, ponto (iii), é realizada pelo cálculo do Z-score (eq. 1.13). Esta avaliação é feita segundo a escala representada na Fig. 4. O laboratório deve ter Z-scores inferiores ou iguais a 2, mas

nem sempre é o que acontece, pelo que deve elaborar um plano de acções correctivas, que deve incluir as seguintes acções: (a) procurar as causas que expliquem o sucedido, corrigi-las, e voltar a repetir a análise para confirmar se conseguiu eliminá-las; e (b) verificar se outros resultados foram afectados e, se sim, tomar as medidas adequadas.

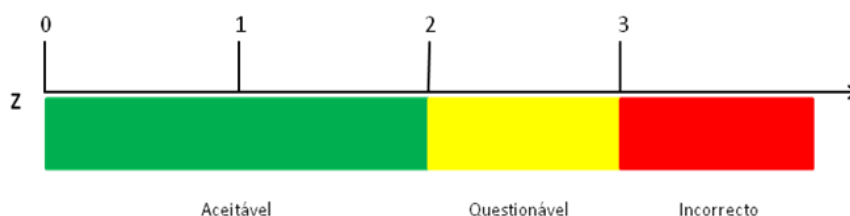


Figura 4 Avaliação do desempenho.

A rastreabilidade, ponto (iv), é a propriedade de um resultado da medição ou de um padrão, que consiste em poder relacionar-se as referências estabelecidas, geralmente a padrões nacionais ou internacionais, através de uma cadeia contínua de comparações, todas com as incertezas estimadas. A rastreabilidade das medições é de elevada importância para a aceitação dos resultados.

Para que se possa relacionar o trabalho dos diferentes laboratórios com o trabalho de um laboratório específico é necessário que exista uma cadeia hierárquica de padrões. Se a sua representação for feita baseada numa pirâmide (Fig. 5), no topo devem estar os MRCs, seguidos dos MR e na base os padrões de trabalho, aqueles que normalmente são usados na calibração dos equipamentos.



Figura 5 Hierarquia de padrões.

Para evidenciar a rastreabilidade dos ensaios efectuados, um laboratório deve comparar os seus padrões de trabalho e os MR com o MRCs. A periodicidade desta comparação depende do ensaio em si. Por exemplo, na determinação de metais é quase imprescindível comparar-se em cada análise uma vez que, a gama de trabalho em que se opera é estreita e da ordem dos  $\mu\text{g/L}$ , impondo a preparação diária de

padrões de trabalho. Esta não é a situação mais desejável, dado que o custo tornar-se-ia elevadíssimo. Em alguns casos aceita-se que alguns MR e padrões de trabalho sejam usados sem serem comparados com MRCs. Neste caso é necessário fazer-se um estudo de estabilidade dos padrões, para que as respostas dos equipamentos possam ser controladas.

### **1.3.2 Controlo de Qualidade Interno**

O laboratório deve estabelecer um sistema de CQ interno dos resultados, nomeadamente para as análises de rotina e técnicas de análise mais usadas ou susceptíveis a erros, baseado em: (i) uso de materiais de referência internos (MRI); (ii) uso de técnicas complementares de CQ de resultados; e (iii) uso de cartas de controlo estatístico.

Os MRI são materiais preparados pelo laboratório com as seguintes características: (i) pode ser uma amostra de controlo de um lote reservado para esse fim, um padrão de matriz ajustada com as amostras, ou um padrão semelhante, mas independente dos de calibração; (ii) estáveis a médio/longo prazo, de modo a permitir a comparação de lotes de MRI novos com antigos, e assim avaliar continuamente a variabilidade de resultados no tempo; (iii) a homogeneidade de cada lote de MRI ser igual ou superior à precisão exigida aos resultados; e (iv) o valor de referência do MRI deve ser atribuído tomando as precauções necessárias para garantir a sua exactidão.

Deve recorrer-se a cartas de controlo estatístico para apresentar, de uma forma fácil, clara e eficiente, os resultados das acções de CQ. Assim, devem ser registados em cartas de controlo os resultados obtidos na análise de MRI, brancos, padrões de calibração, repetição de amostras, desvio entre duplicados, recuperação de adições, e/ou dados referentes a parâmetros instrumentais ou de calibração. A selecção do tipo de cartas (individuais, médias, amplitudes, cumulativas, etc.) a usar deve ser feita tendo em conta as características que se pretendem controlar.

#### **1.3.2.1 Duplicados**

A análise de duplicados serve essencialmente para detectar erros acidentais e para controlar a repetibilidade da medição. Por rotina, cada laboratório estipula a periodicidade dos duplicados, por exemplo, efectuados de 20 em 20 amostras, ou sempre que o número destas seja inferior a 20. O recurso a duplicados é recomendado em análises que envolvam várias etapas e fontes de erro, para amostras de difícil homogeneização ou para treino de novos analistas.

Devem ser estabelecidos critérios de aceitação entre duplicados. Tipicamente, numa primeira fase, enquanto o histórico não é suficiente, não devem ser aceites duplicados cuja diferença seja superior a 10%. Após existirem dados suficientes, dever-se-á elaborar uma carta de aceitação para estes; nesta situação, normalmente, os limites estabelecidos são inferiores a 10%.

### **1.3.2.2 Amostras “Cegas”**

As amostras denominadas “cegas” chegam ao laboratório devidamente codificadas e apenas quem introduz os seus dados no sistema informático sabe a sua proveniência. Quando dá entrada no laboratório para ser analisada, os analistas julgam tratar-se de uma amostra vulgar, desconhecendo a sua inclusão, por exemplo, num EIL. Recorre-se ao uso destas amostras para conhecer a precisão dos resultados diários em amostras de rotina e para avaliar o desempenho dos analistas.

### **1.3.2.3 Ensaio de Recuperação**

Os ensaios de recuperação são adequados para a avaliação dos critérios de exactidão para as mesmas matrizes e baseiam-se na relação percentual entre a concentração determinada mediante a aplicação do procedimento analítico e o nível de fortificação. Tipicamente, os valores aceitáveis para estes ensaios podem variar entre 80 e 120%.

### **1.3.3 Cartas de Controlo**

As cartas de controlo fazem parte do controlo interno da qualidade. São um dos meios mais eficientes para visualizar alterações nos resultados produzidos ao longo do tempo e detectar erros. Foram introduzidas pelo fundador do moderno controlo estatístico do processo, Walter Shewhart, no final dos anos 30.

As cartas de controlo permitem a distinção entre causas comuns de variação e causas especiais de variação. As primeiras são inerentes ao processo, constituindo a variabilidade natural do processo, como por exemplo, as vibrações quase imperceptíveis das máquinas, não podendo ser facilmente eliminadas sem haver alterações fundamentais no próprio processo. As causas ditas especiais correspondem a maiores variações quando comparadas com as anteriores, como por exemplo, erros do operador, podendo e devendo ser detectadas e eliminadas do processo através da intervenção humana sempre que tal contribua para a melhoria do processo. Refira-se que a distinção entre estes dois tipos de causas de variabilidade depende do contexto, podendo uma causa comum no presente ser considerada uma

causa especial no futuro. Um sistema no qual a variação se deve apenas a causas comuns é designado como estando sob controlo estatístico. Por outro lado, se as causas de variação se devem à presença de causas especiais, diz-se que o processo está fora de controlo.

A carta de controlo é uma representação gráfica de valores (Fig. 6). É medida uma determinada característica da qualidade, com base em elementos do processo seleccionados aleatoriamente. Se a característica for quantitativa, isto é, se puder ser medida e expressa por um número, como por exemplo, a temperatura ou o diâmetro, utilizam-se cartas de controlo por variáveis. Neste caso são exemplos as cartas de controlo para a médias e amplitudes (carta  $\bar{X}$ , R), para médias e desvio padrão (carta  $\bar{X}$ , s) e para valores individuais (ex: amplitude móvel).

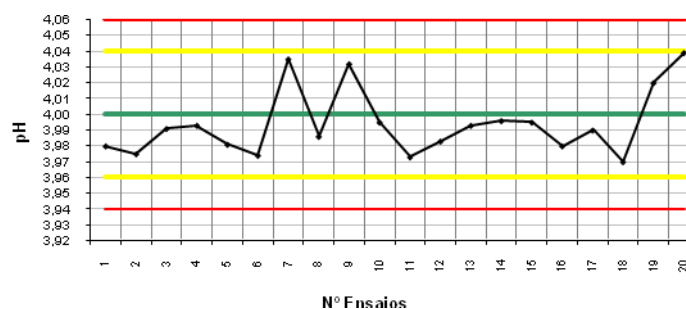


Figura 6 Exemplo de uma carta de valores individuais para o tampão 4 de pH.

Dentro das cartas para atributos podem ser consideradas as seguintes: cartas para defeitos, que por sua vez se dividem em: (i) cartas para número de não conformidades (cartas tipo np) e proporção de defeitos (cartas tipo p) e (ii) cartas para não conformidades, que por sua vez se dividem em cartas para número de não conformidades (cartas tipo c) e não conformidades por unidade (cartas tipo u). De acordo com o que se pretende medir, há que escolher o tipo mais adequado, para que o método analítico esteja sob controlo estatístico (Tabela 1).

As cartas devem conter limites de controlo, tais como os representados na Fig. 6. Incluem-se aqui o limite central (LC), onde se situa a média do processo, os limites superiores e inferiores de aviso (LSA e LIA) situados a  $\pm 2\sigma$ , representados a amarelo, e os limites superiores e inferiores de controlo (LSC e LIC) ou de acção, situados a  $\pm 3\sigma$ , representados a vermelho. Os responsáveis pelo controlo da qualidade do laboratório devem definir como os analistas devem actuar no caso de existirem pontos fora dos limites de controlo.

Tabela 1 Tipo de cartas de controlo.

| Aspectos relevantes     | Cartas de controlo  |  |  |
|-------------------------|---|--|--|
| Parâmetros estatísticos | $\bar{X}, R; \bar{X}, s;$<br>Valores individuais;<br>CUSUM, EWMA  | % de nr de não conformidades $p$<br>Nr de não conformidades $np$   | Não conformidades por unidade $u$<br>Nr de não conformidades $c$                             |
| Tipo de dados           | Variáveis   | Atributos  | Atributos  |
| Aplicação típica        | Controlo de características de forma individualizada.   | Controlo de defeitos no processo.  | Controlo de defeitos no processo ou produto.   |
| Vantagens               | Melhor utilização da informação;<br>Informação detalhada sobre a média e a variação do processo.  | Informação facilmente disponível;<br>Cartas fáceis de entender;<br>Imagem global da qualidade do processo. | Informação facilmente disponível.  |
| Desvantagens            | Cartas difíceis de entender (é necessária mais formação);<br>Tendência para a confusão entre limites de controlo e limites da especificação;<br>Não podem ser usadas com dados do tipo "aceite" "não aceite". | Não fornece informação detalhada para controlo das características de forma individualizada.               | Não fornece informação detalhada para controlo das características de forma individualizada. |

As cartas de controlo são utilizadas em duas fases distintas, designadas por a fase I e por fase II. Na fase I, utilizam-se um conjunto de dados históricos ou de dados recolhidos do processo. Na carta de controlo de médias é usual um conjunto de 20 a 25 sub-grupos de 4 ou 5 elementos (tamanho da amostra) para se verificar se o processo está sob controlo estatístico, e estimar os parâmetros do processo. Trata-se de uma fase onde se tenta colocar o processo sob controlo estatístico, procurando-se sinais de possíveis causas especiais de variação, detectando-as e eliminando-as, podendo os limites de controlo ser recalculados várias vezes. Na fase II (de normal funcionamento do processo), com o processo sob controlo estatístico, são recolhidas amostras do processo em tempo real. Nesta fase, a distribuição sob controlo é assumida como completamente conhecida.

A interpretação das cartas de controlo requer informação estatística. Nas Figuras 7 a 14 identificam-se alguns casos particulares. Há diversos testes de desvios, para detectar pontos fora de controlo estatístico (representados a vermelho).

Para a elaboração de cartas de médias, são necessários, pelo menos, 10 ensaios prévios, para posteriormente se calcular a média e o respectivo desvio padrão e se

proceder ao registo dos valores a controlar nas análises. Em cada carta representam-se vários pontos de controlos, geralmente entre 30 e 50.

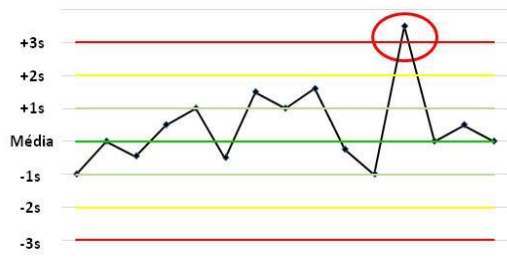


Figura 7 1 ponto fora de  $\pm 3\sigma$ ; a probabilidade normal de acontecer é de 0,3%.

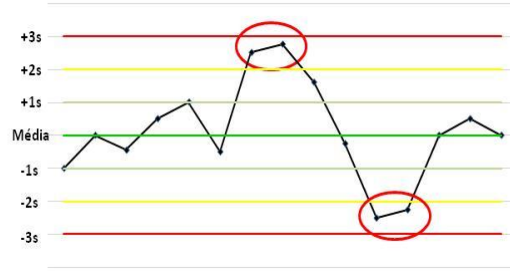


Figura 8 2 pontos em 3 pontos consecutivos fora de  $\pm 2\sigma$ ; a probabilidade normal de acontecer foi ultrapassada.



Figura 9 4 pontos em 5 pontos consecutivos fora de  $\pm 1\sigma$ ; a probabilidade normal de acontecer foi ultrapassada.

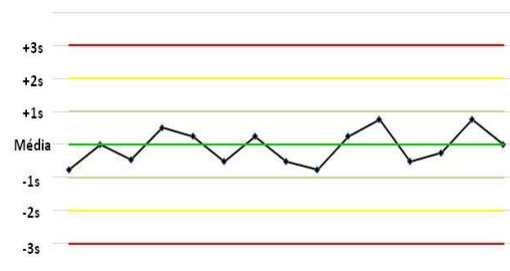


Figura 10 15 pontos consecutivos dentro de  $\pm 1\sigma$ ; o desvio padrão actual é inferior ao teórico.

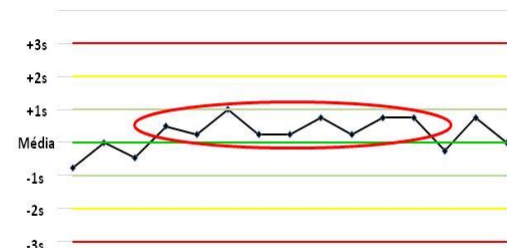


Figura 12 9 pontos consecutivos de um dos lados da média; existe um desvio sistemático relativamente ao valor estabelecido.



Figura 11 8 pontos consecutivos fora de  $\pm 1\sigma$ ; existem duas distribuições em vez de uma só.



Figura 14 6 pontos consecutivos a subir ou a descer; existe uma tendência não aleatória.



Figura 13 14 pontos consecutivos alternando a subir e a descer; existe uma série temporal que afecta os dados.

As cartas de controlo podem representar a variação temporal de vários parâmetros. A escolha desses parâmetros deve ter em conta a análise que se vai efectuar. Os materiais de referência internos podem ser representados nas cartas de controlo e

permitem ao analista verificar o seu desempenho, a estabilidade de resposta do equipamento, as condições de arranque, o estado dos reagentes, etc.. A representação de parâmetros das curvas de calibração como o declive e a ordenada na origem permite saber se as oscilações das calibrações afectam os resultados. A análise de brancos e a sua representação em cartas de controlo permite ao analista verificar se há ou não contaminações na análise. A representação dos sinais instrumentais permite obter informações úteis acerca do equipamento num dado ensaio; por exemplo, em absorção atómica dever-se-á ter em conta o sinal instrumental do 1º padrão da curva, para se prosseguir com a corrida e posteriormente se aceitarem os resultados.

Quando se detectam falhas há que se proceder à sua identificação, análise e correcção. Normalmente, existe um procedimento que especifica o que deve ser feito. Por exemplo, se se verificar que um dos controlos está fora de especificação, dever-se-ão repetir as amostras anteriores e as posteriores a este. Poderá acontecer que a quantidade de amostra seja insuficiente. Neste caso, o laboratório deve contactar o cliente, explicar a situação e solicitar o envio de nova amostra. É pois muito importante que as cartas sejam actualizadas diariamente, para se poderem detectar e corrigir de imediato este tipo de falhas.

#### **1.4. Incertezas**

A incerteza do resultado de uma medida reflecte a falta de conhecimento exacto do valor da grandeza. O resultado da medida é por isso uma estimativa do valor da grandeza, devido à incerteza proveniente de efeitos aleatórios e de correcções imperfeitas para eliminar os efeitos sistemáticos.

Os laboratórios acreditados devem estimar a incerteza dos ensaios, no entanto esta deve ser reportada apenas quando relevante. A estimativa da incerteza apenas permite apreciar a confiança a atribuir aos resultados dos ensaios, não devendo ser relacionada com a competência do laboratório.

Há vários tipos de abordagens, sendo mais usadas: (i) a abordagem “passo a passo”; (ii) a abordagem baseada em informação interlaboratorial ou supra-laboratorial; e (iii) a abordagem baseada em dados da validação e/ou controlo da qualidade do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial ou supra-analítico.

Os laboratórios poderão usar qualquer uma destas metodologias ou outras para além das apresentadas, desde que demonstrem que são tecnicamente válidas e aplicáveis aos métodos em estudo. A escolha da metodologia de cálculo será função

da informação e recursos disponíveis, bem como da qualidade necessária da estimativa da incerteza tendo em conta o objectivo do ensaio.

A quantificação da incerteza da medição é baseada em dados de validação e/ou do controlo interno da qualidade do método. Este último é bastante usado e consiste na utilização de parâmetros do desempenho global do método, estimados em ambiente intralaboratorial, para quantificar grande parte da incerteza associada ao ensaio. Habitualmente, a aplicação desta abordagem consiste na combinação das incertezas associadas à precisão e à exactidão do método, com fontes de incerteza relevantes que são mantidas constantes na sequência da realização dos ensaios experimentais necessários à quantificação da precisão e exactidão do ensaio [7].

#### **1.4.1 Quantificação da Incerteza Associada à Precisão**

Em ensaios químicos a precisão é uma componente maioritária da incerteza global pelo que deve ser devidamente avaliada em todo o âmbito de aplicação do método. Para que a incerteza associada à precisão seja o mais realista possível é recomendável que esta seja avaliada em condições de precisão intermédia, condições estas que permitem reflectir eventuais variações do desempenho do método em função de alterações de parâmetros experimentais que habitualmente são mantidos constantes no mesmo dia de trabalho.

A precisão intermédia dum método pode ser quantificada de diversas formas, de entre as quais se destacam as seguintes: (i) desvio padrão de resultados replicados de uma amostra ou padrão de controlo, obtidos em condições de precisão intermédia; (ii) amplitude média relativa ou absoluta de resultados replicados de diversas amostras; e (iii) desvio padrão estimado a partir dos limites de controlo de uma carta de controlo de valores individuais baseados em resultados replicados obtidos em condições de precisão intermédia (equivalente à primeira).

Consoante a amplitude da gama de aplicação do método, em termos de níveis de concentração, a incerteza associada à precisão é combinada com as outras fontes de incerteza, como uma incerteza absoluta ou relativa.

Quando o método é aplicável numa gama alargada de concentrações deve estimar-se a incerteza padrão relativa associada à precisão. Por outro lado, quando o método é aplicável apenas numa gama estreita de concentrações, quantifica-se a precisão do método como uma incerteza padrão absoluta, combinando-se esta fonte com as restantes fontes de incerteza como componentes de uma expressão aditiva. Neste caso, as componentes de incerteza devem ser apresentadas e combinadas nas mesmas unidades - as unidades da medição. A incerteza padrão absoluta associada à

precisão é estimada directamente pelo desvio padrão absoluto que quantifica a precisão do método. Este desvio padrão pode igualmente ser estimado com base em resultados de ensaios replicados ou com base na amplitude média de duplicados.

A quantificação da precisão intermédia pode ser estimada através de replicados de uma amostra ou padrão. Esta metodologia de quantificação da incerteza associada à precisão consiste em seleccionar uma amostra, ou no caso de análises destrutivas, um conjunto de amostras idênticas, ou um padrão, e efectuar  $n$  medições, fazendo variar, entre análises, todos os parâmetros experimentais que afectam o desempenho do método (ex: condições ambientais, condições instrumentais, operadores, etc.). Se os ensaios forem efectuados em dias diferentes assume-se que varia aleatoriamente grande parte dos parâmetros experimentais não controlados que afectam o desempenho do método. As medições efectuadas devem incluir todas as etapas analíticas consideradas na definição da mensurada. É recomendável que se efectuem pelo menos 15 medições [2]. Apesar de esta metodologia só permitir estimar a precisão do método num nível de concentração e considerando um tipo de matriz, pode ser útil para avaliar o impacto de alterações das condições de ensaio no desempenho do método analítico. A incerteza é calculada a partir do desvio padrão dos resultados replicados. É recomendável que se detectem e eliminem, de forma fundamentada, possíveis valores aberrantes destes dados.

A precisão também pode ser calculada reunindo resultados replicados de diversas ( $t$ ) amostras ou padrões [8]. Neste caso, as  $t$  amostras ou padrões têm de ser analisados em replicado as mesmas  $n$  vezes.

#### **1.4.2 Quantificação da Incerteza Associada à Exactidão**

O erro de uma medição é a diferença entre o resultado da medição e o valor verdadeiro da mensurada [9]. Este erro resulta da combinação do erro sistemático, que ocorre em todas as medições, com o erro aleatório que possui uma dimensão que varia de ensaio para ensaio. O erro sistemático de uma medição pode ser estimado, com uma incerteza desprezável, pela diferença entre a média de resultados de múltiplos ensaios replicados e o valor de verdadeiro da mensurada, uma vez que é minimizado o erro aleatório da medição. Alguns exemplos de itens de referência que podem ser usados para estimar o erro sistemático do ensaio são: (i) MRCs; (ii) amostras fortificadas; ou (iii) amostras analisadas por um método de referência.

Em química analítica, a recuperação do método permite quantificar a exactidão do mesmo, podendo ser calculado em termos de recuperação entre o resultado e o valor

de referência. Quanto mais próximo de 1 for a recuperação, melhor é a exactidão do método.

A metodologia utilizada para quantificar a exactidão do método, depende dos recursos disponíveis e do tipo de método de ensaio em causa. A expressão de resultados com incerteza, pode ser feita da seguinte forma:

$$Y = [y \pm u(y)] \quad (\text{unidades}) \quad (\text{eq. 1.15})$$

em que  $y$  é estimativa do valor da grandeza; e  $u(y)$  a incerteza de  $y$  com determinado nível de confiança, que deve ser especificado. A incerteza reportada é tipicamente uma incerteza expandida, calculada usando um factor de expansão  $k$  igual a 2, o que permite associar ao resultado um nível de confiança aproximadamente igual a 95%.

## **1.5. Apresentação de Resultados de Análises Químicas**

### **1.5.1. Validação Técnica de Resultados**

Os resultados apresentados nos Boletins de Análise devem ser sujeitos a uma validação técnica por um, ou mais, elementos, devidamente identificados e qualificados. O pessoal designado para efectuar a validação técnica de resultados deve estar familiarizado com os respectivos métodos de ensaio, e estar apto, nomeadamente, a: (i) executar e supervisionar os ensaios em causa; (ii) conhecer os pontos fracos ou críticos do método, designadamente as condições de aplicabilidade e restrições, bem como as interferências; (iii) avaliar os resultados do controlo da qualidade; e (iv) apresentar correctamente os resultados obtidos.

### **1.5.2. Apresentação Técnica de Resultados**

Os resultados devem ser apresentados nos boletins de análise de forma tecnicamente clara e correcta, fornecendo toda a informação relevante. Deve ser ponderado quer o número de dígitos usados, quer as capacidades de quantificação do laboratório.

Devem existir regras ou critérios para seleccionar o número de algarismos significativos apresentados. Esta escolha: (i) deve ser coerente com as directivas expressas na norma de ensaio ou documento normativo, caso existam, ou com as instruções dadas pelo cliente, desde que tecnicamente correctas; (ii) caso os resultados sejam apresentados com a respectiva incerteza, deve ser seguida a metodologia respectiva; e (iii) deve seguir o princípio de que apenas o último algarismo significativo esteja afectado de dúvida.

Para estabelecer quais os dígitos afectados de dúvida, devem ser consideradas as situações seguintes e escolhida a mais restritiva: (i) caso seja efectuada a estimativa da incerteza dos resultados, o primeiro dígito afectado pela incerteza considera-se em dúvida; (ii) os dígitos concordantes obtidos na análise de MRC ou em ensaios de aptidão, ou em ensaios de recuperação; (iii) a variabilidade observada (ou estabelecida como aceitável) para os resultados do laboratório, avaliada pela concordância de dígitos nos duplicados, ou nos padrões de controlo, ou de verificação da calibração; e (iv) a capacidade de resolução do equipamento, ou o LD do método quando usado pelo laboratório, não devendo ser apresentadas casas decimais inferiores a estes valores.

Os resultados devem ser reportados apenas quando estejam dentro da gama de interpolação da curva de calibração, devendo ser apresentados como inferior ao primeiro padrão, ou superior ao último (consoante for aplicável), sempre que saiam fora da gama de calibração mais de 10%.

Os resultados inferiores ao LQ devem ser apresentados indicando inequivocamente que são inferiores ao referido limite, e qual o valor numérico estabelecido para o referido limite.

Tal como referido inicialmente, o Centro de Qualidade Hídrica do INSA; delegação do Porto, apresenta, ainda, os métodos relativos às determinações de boro, de HAPs e da turvação por validar. A validação destes métodos será, por isso, abordada de seguida. Alguns conceitos usados ao longo deste trabalho foram definidos no Anexo A deste documento.

## 2. Determinação do Boro

O boro é um elemento com propriedades não metálicas, muito duro (9,3 na escala de Mohr). Conhecem-se dois isótopos estáveis ( $^{10}\text{B}$  e  $^{11}\text{B}$ ) e nove instáveis, dos quais o de maior semi-vida tem uma duração de 0,77 segundos. O boro constitui 0,001% da crosta terrestre, onde aparece sempre na forma combinada. A presença do boro nos macro-compartimentos do planeta Terra pode quantificar-se do modo seguinte: (i) crosta terrestre:  $2,6 \times 10^{17}$  Kg; (ii) oceanos:  $5,82 \times 10^{15}$  Kg; e (iii) plantas:  $7,36 \times 10^{10}$  Kg. O boro não se encontra nunca na natureza no estado elementar, dada a sua elevada reactividade. Encontra-se, por isso, em formas combinadas, nomeadamente boratos de sódio ou de cálcio, ácido bórico, poliboratos e outros derivados similares. Os boratos também podem ser extraídos de depósitos de origem vulcânica. Os principais minérios são, além do bórax (borato de sódio hidratado), a quernite, uma forma de borato menos hidratada, e a colemanita (borato de cálcio hidratado). O bórax é o ácido tetrabórico que é comercializado sob a forma do seu sal hidratado de sódio, cuja fórmula química é  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ . Esses compostos de boro encontram-se em rochas e em águas naturais, normalmente e teores muito baixos.

O boro é usado na indústria atômica, nomeadamente para absorver electrões e neutrões e em metalurgia, como oxidante. Alguns compostos de boro são, também, utilizados como propulsores de foguetões e como aceleradores de processos industriais, na fabricação de perfumes e na preparação de remédios. Encontram-se

também boratos nos detergentes, onde podem funcionar como branqueadores. Utilizam-se igualmente no fabrico de esmaltes e em pinturas sobre o vidro. São possíveis teores elevados em águas poluídas, quando existe alguma forma de contaminação industrial importante.

O boro tem uma grande afinidade pelo sistema nervoso, pelo que o seu teor deverá ser mantido e controlado a níveis muito reduzidos. A toxicidade dos derivados do boro é muito variável, havendo alguns que são tóxicos por via digestiva, outros por via respiratória e, alguns outros até, por via cutânea.

É um micronutriente essencial ao desenvolvimento das plantas, cuja acção fisiológica não é completamente conhecida, mas cuja carência origina doenças em culturas agrícolas importantes. Como exemplo, pode citar-se o caso da maromba na videira e a clorose na luzerna. A carência do boro é combatida pela adição de bórax, de adubos contendo aquele elemento ou através de pulverizações foliares com soluções de ácido bórico. A aplicação destes produtos em culturas agrícolas pode constituir uma fonte de contaminação ambiental que pode atingir águas brutas e, por essa via, as águas de consumo [10].

Normalmente, os derivados de boro presentes na água de consumo não são apresentados como perigosos para a saúde. Um adulto de 70 quilos pode ingerir diariamente 6 mg, sem inconvenientes sanitários evidentes. Os valores limite de exposição admitidos para efeitos de saúde profissional são de 1 mg/m<sup>3</sup> para o boreto desidratado. O limite legal em águas para consumo, segundo o Decreto-Lei 306/2007, é de 1 mg/L. Não existem informações concretas respeitantes à eliminação do boro nos sistemas de tratamento usuais. No caso da sua existência, haverá que recorrer aos tratamentos de eliminação típicos e provocar a sua precipitação e/ou absorção.

## **2.1. Metodologias Analíticas**

Para salvaguardar a qualidade da água que chega ao consumidor torna-se necessário garantir que o limite legal do boro é respeitado. Esta condição impõe o controlo deste parâmetro analítico. Na literatura é possível encontrar alguns métodos para este efeito: métodos ópticos e métodos electroanalíticos.

Os métodos ópticos recorrem à interacção entre a matéria e a radiação electromagnética, em toda a gama do espectro, desde os raios X até às microondas. Os métodos ópticos são, por isso, baseados em fenómenos de óptica clássica. De um modo geral, classificam-se de acordo com a natureza da interacção em curso [11], nomeadamente, absorção, emissão, difracção, refração, dispersão, reflexão e polarização. Nos trabalhos publicados encontram-se artigos com a descrição da

determinação de boro por técnicas de espectroscopia de emissão atômica em amostras de chás e café [12], fluorescência em amostras de águas [13], [14], e produtos farmacêuticos [13], ultra-violeta visível (UV/Vis) em amostras de matrizes complexas de água [15] e Espectroscopia de absorção atômica em amostras de leite e mel [17].

O recurso a técnicas baseadas em radiações electromagnéticas deixa antever algumas dificuldades analíticas, inerentes à coloração, turvação ou índice de refração das amostras [11]. Além disso, a utilização e a manutenção de equipamentos como a espectroscopia atômica são dispendiosas.

Nos métodos electroanalíticos, a informação sobre a solução em estudo é obtida pela medida de uma propriedade de natureza eléctrica. Estes métodos apresentam algumas vantagens relativamente a outros métodos instrumentais. As medidas são, na sua maioria, selectivas para um determinado elemento e o equipamento requerido é pouco dispendioso. Para além disso, estes métodos permitem obter informação quantitativa para quantidades de analito, muitas vezes, vestigiais. Podem, também, fornecer informação sobre a estequiometria e constantes de equilíbrio, processos de transferência de massa, velocidade e reversibilidade de reacções, etc..

São diversas as estratégias instrumentais no campo electroanalítico, dando origem a múltiplas técnicas, como a potenciometria, a voltametria, a amperometria, etc.. A voltametria [16] foi uma das técnicas utilizadas na literatura para a determinação do boro numa amostra de água; esta técnica utilizou um eléctrodo de mercúrio de gota pendente. Genericamente, comparando com os restantes métodos na Tabela 2, destacam-se os limites de quantificação superiores da metodologia voltamétrica. Comparando com a determinação por UV/Vis, a voltametria apresenta a vantagem de consumir menos reagentes e ser, por conseguinte, menos poluente.

O método utilizado no INSA segue a metodologia descrita no Rodier [18]. A determinação do boro é feita por espectrometria de absorção molecular (EAM), utilizando um espectrofotómetro UV/Vis. Em meio ácido, o boro forma com a H-Azometina uma coloração amarela, que possibilita o doseamento espectrofotométrico a um comprimento de onda de 420 nm. Os iões geralmente encontrados na água não interferem nesta metodologia. O ferro, molibdénio e o zircónio interferem apenas em grandes quantidades (>300 mg/L em soluções de boro para analisar), algo que não é muito comum. Neste trabalho é recomendada a utilização de material de plástico, no sentido de prevenir possíveis contaminações, uma vez que o material de laboratório normalmente utilizado é formado por boro silicato.

Tabela 2 Determinação do Boro.

| Técnica       | Amostra                        | Características genéricas  | Parâmetros analíticos                                | REF. Ano     |
|---------------|--------------------------------|--|--|--------------|
| ICP – AES     | Chás e café                    | Pré-tratamento por digestão em microondas;<br>Correcção da matriz com Índio (325,609 nm) e cobre (324,754 nm);<br>Linhas de emissão do boro 249,773; 249,678 e 208,954 nm.   | LD: 0,0067-0,0206 mg/L                               | [12]<br>2003 |
| Fluorescência | Águas e produtos farmacêuticos | Aumento de fluorescência do ácido cromotrópico ( $\lambda_{excitação} = 313$ nm e $\lambda_{emissão} = 360$ nm) por complexação com ácido bórico; sistema de análise por injeção sequencial.   | LD: 13 $\mu$ g/L;<br>LR: 40-200 $\mu$ g/L            | [13]<br>2004 |
| Fluorescência | Águas                          | Método flurimétrico utilizando a azometina-H;<br>Linha de emissão do boro 249,773 nm;<br>Correcção da matriz com Índio (325,609 nm) e cobre (324,754 nm);<br>$\lambda_{excitação} = 416$ nm e $\lambda_{emissão} = 486$ nm;<br>Condições ópticas da amostra pH=10, 45°C e 20 mL de volume. | LR: 0,1184-2,534 mg/g                                | [14]<br>2007 |
| UV/Vis.       | Matrizes complexas de água     | Solução de “curcumin” para reagente de desenvolvimento de cor;<br>Absorvância medida a 550 nm.   | LD: 5 ng/g;<br>LR: 5-450 $\mu$ g/L                   | [15]<br>2004 |
| Voltametria   | Água e água do mar             | Eléctrodo de mercúrio de gota pendente;<br>Pico anódico -0,47 V, pH=7.   | LD: 15 $\mu$ g/L;<br>LR: 0-500 $\mu$ g/L             | [16]<br>2006 |
| EAA           | Leite e mel                    | Atomizador: câmara de grafite;<br>Lampâda de cátodo: 30mA e 249,7 nm;<br>Pré-tratamento da amostra: SPE.   | LD: 0,03 $\mu$ g/g (mel);<br>0,08 $\mu$ g/mL (leite) | [17]<br>2009 |

ICP – AES – Espectroscopia de emissão atômica acoplado de plasma (“optical emission spectrometry with inductively coupled plasma”); LD – Limite de detecção; LR – Intervalo linear;  $\lambda$  – Comprimento de onda; SIA – Análise sequencial de injeção; UV/Vis. – Ultra-violeta visível; EAA – Espectrofotómetro de absorção atômica; SPE – Extração em fase sólida

## 2.2. Parte Experimental

### 2.2.1. Material e Aparelhos Utilizados

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 25,00 a 100,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 1,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a uma pipeta automática Socorex, modelo P1000 de volume regulável. As pesagens foram realizadas numa balança Kern 770, com precisão igual a 0,00001g.

Para a preparação da solução de azometina foi necessário promover a dissolução do sólido correspondente, para o qual foi usado um banho de ultra-sons termostatizado, da marca Selecta, modelo ultrasons-H.

A determinação do boro por Espectrofotometria de Absorção Molecular foi realizada num espectrofotómetro UV/Vis, Shimadzu, modelo Pharmaspec UV-1700. As cuvetes utilizadas para a determinação do boro foram cuvetes de quartzo de 1 cm. A aquisição e tratamento de dados foram efectuados através do software UV Probe versão 2.10.

### 2.2.2. Reagentes

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi água desionizada. Todos os reagentes utilizados – acetato de amónio (VWR); ácido etilenodiaminotetracético, sal dissódico (EDTA- $\text{Na}_2$ , Merck); ácido acético glacial (Merck); H-azometina (Fluka); e ácido ascórbico (Panreac) – foram de qualidade p.a., sem qualquer purificação adicional.

### 2.2.3. Soluções

Todas as soluções foram preparadas em água desionizada. As soluções padrão, de concentrações compreendidas entre 0,2 e 2,0 mg/L foram preparadas por diluição rigorosa de uma solução padrão comercial de boro com uma concentração de 1000 mg/L (Merck). A preparação da solução padrão de controlo foi preparada a partir de uma solução padrão comercial de 1000 mg/L de boro, independente da utilizada para a curva de calibração.

### 2.2.4 Preparação de Soluções não Padrão

Para a preparação da solução tampão pesou-se 50 g de acetato de amónio e 1,4 g de EDTA- $\text{Na}_2$ . Dissolveu-se o acetato de amónio em 100 mL de água desionizada e adicionou-se o EDTA- $\text{Na}_2$  e, lentamente, 25 mL de ácido acético glacial.

Para a preparação da solução de azometina, 10g/L, foi necessário pesar 0,5 g de H-azometina e 1 g de ácido ascórbico. Em balão volumétrico de 50 mL dissolveram-se, em

água desionizada, a H-azometina e o ácido ascórbico. Esta solução foi preparada diariamente.

## **2.2.5 Preparação de Padrões**

### **2.2.5.1. Preparação das Soluções Padrão de Calibração**

Para a preparação da solução padrão de 20 mg/L de boro mediram-se 2 mL de uma solução padrão comercial de 1000 mg/L de boro, para um balão de 100 mL e perpez-se o volume com água desionizada.

As soluções padrão de calibração apresentavam uma gama de trabalho de 0,2-2,0 mg/L de boro. Estas soluções foram preparadas a partir da solução padrão de 20 mg/L de boro. Para este efeito, mediram-se 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; e 5,00 mL da solução padrão de 20 mg/L, para um balão de 50 mL e perpez-se o volume com água desionizada. As concentrações obtidas foram iguais a, respectivamente, 0,2; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; e 2,0 mg/L.

### **2.2.5.2. Preparação da Solução Padrão de Controlo**

A solução padrão de 20 mg/L de boro foi preparada de modo equivalente ao indicado no ponto anterior, com excepção de que a solução padrão utilizada para este efeito não foi a solução designada por solução padrão comercial mas sim uma solução padrão de controlo, da mesma concentração.

A solução padrão para LQ, de 0,2 mg/L de boro, foi preparada a partir da solução padrão de 20 mg/L anterior, por medição de 0,50 mL desta para um balão de 50 mL, tendo-se completado o volume com água desionizada.

Para a preparação da solução padrão de controlo de 1 mg/L de boro, mediram-se 2,5 mL da solução padrão de 20 mg/L de boro para um balão de 50 mL e perpez-se o volume com água desionizada.

### **2.2.5.3. Ensaio de Recuperação**

Mediram-se 2,5 mL da solução padrão de 20 mg/L de boro para um balão de 50 mL e perpez-se com uma amostra aleatória.

## **2.2.6. Recolha e Conservação da Amostra**

As amostras foram recolhidas em frasco de polietileno (volume mínimo 1000 mL). A análise correspondente foi efectuada num período inferior a 28 dias. Para este efeito, a amostra foi acidificada aquando da sua chegada ao laboratório com HNO<sub>3</sub>, até pH<2.

### 2.2.5. Procedimento Analítico

Pipetaram-se 10 mL de cada uma das soluções padrão e das amostras para um balão de 25 mL ou 10 mL de água desionizada, para fazer o branco. Juntou-se a cada balão 2,5 mL de solução de azometina e agitou-se vigorosamente. Adicionou-se 2,5 mL da solução tampão e agitou-se cuidadosamente. Aguardou-se 2 horas ao abrigo da luz e a uma temperatura entre 20 e 25 °C.

Procedeu-se à leitura em espectrofotómetro, contra ensaio em branco, a um comprimento de onda de 420 nm e em cuvetes de quartzo de 1 cm.

Validou-se a sessão de trabalho recorrendo ao plano de controlo interno.

## 2.3. Resultados e Discussões

### 2.3.1 Validação do Método

Para validar o método foi necessário: (i) identificar a gama de trabalho; (ii) fazer o estudo do limite de quantificação; (iii) fazer o estudo da linearidade; (iv) fazer o estudo de precisão e exactidão; (v) fazer o estudo da sensibilidade e (vi) incerteza associada aos resultados do método de ensaio.

#### 2.3.1.1. Gama de Trabalho

Para identificar a gama de trabalho foram traçadas 10 curvas de calibração, com concentrações compreendidas entre 0,2 e 2,0 mg/L de Boro. Estas calibrações foram realizadas sem qualquer periodicidade obrigatória, tendo-se preparado as soluções padrão no próprio dia. O registo de mais do que uma calibração no mesmo dia foi efectuado com base em novas soluções padrão, i.e., cada calibração foi traçada com soluções padrão preparadas apenas para esse efeito. O número de soluções padrão foi sempre igual a 6 (ver exemplo Anexo B-1).

Os resultados obtidos foram indicados na Fig. 15. Nesta figura são indicados os valores de concentração obtidos para o primeiro e último padrão. Para os valores obtidos foi aplicado o teste PG, no sentido de garantir homogeneidade de variâncias. Os resultados da análise estatística confirmaram este requisito ao apresentarem valores de F iguais a 2,41 e inferiores ao valor de PG crítico (5,35), sugerindo que a gama de trabalho estava bem ajustada.

| Sinal Instrumental (Absorvância) |                                     |  |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|
|                                  | 1.º Padrão de Calibração (0,2 mg/L) | Último Padrão de Calibração (2,0 mg/L) |
| Data                             |                                     |  |
| 09-07-2008                       | 0,215                               | 1,993                                  |
| 19-08-2008                       | 0,236                               | 2,003                                  |
| 29-08-2008                       | 0,208                               | 1,939                                  |
| 25-09-2008                       | 0,220                               | 1,989                                  |
| 25-09-2008                       | 0,188                               | 2,005                                  |
| 26-09-2008                       | 0,194                               | 1,960                                  |
| 26-09-2008                       | 0,207                               | 2,012                                  |
| 29-09-2008                       | 0,197                               | 1,990                                  |
| 30-09-2008                       | 0,198                               | 1,992                                  |
| 01-10-2008                       | 0,202                               | 1,980                                  |

| Teste F: Homogeneidade de variâncias |             |             |
|--------------------------------------|-------------|-------------|
|                                      | Variável 1  | Variável 2  |
| Média                                | 1,9863      | 0,2065      |
| Variância                            | 0,000484011 | 0,000200944 |
| Observações                          | 10          | 10          |
| gl                                   | 9           | 9           |
| F                                    | 2,408681228 |             |
| P(F<=f) uni-ca                       | 0,103232646 |             |
| F crítico uni-α                      | 5,351125765 |             |

Figura 15 Gama de trabalho.

### 2.3.1.2. Estudo do Limite de Quantificação

Após a validação da gama de trabalho, estudou-se o LQ. Este limite foi calculado para o primeiro padrão da curva de calibração, tendo-se utilizado para este efeito um padrão diferente daquele utilizado na curva de calibração. Inicialmente estabeleceu-se como critério de aceitação 10% da concentração teórica. Após registo de 20 leituras entendeu-se que o critério de aceitação passaria a ser média  $\pm 2$  x desvio padrão. A partir do valor do LQ foi calculado o LD.

Os resultados obtidos foram indicados na Fig. 16. Nesta figura foram indicados os valores de absorvância obtidos para o padrão de LQ (0,2 mg/L). Com os valores obtidos foi calculada a média e o respectivo desvio padrão. O LQ assim obtido foi igual a  $0,203 \pm 2 \times 0,0105$  mg/L, com uma precisão de 5,2% e erro relativo de 1,6%. O limite de detecção foi de 0,060 mg/L.

### 2.3.1.3. Estudo da Linearidade

O estudo da linearidade foi baseado em três curvas de calibração. Estas três curvas foram escolhidas entre aquelas traçadas para o estudo da gama de trabalho. O critério de aceitação nesta selecção foi o melhor coeficiente de correlação (R), em que o valor escolhido teria de ser superior a 0,9990.

As curvas de calibração anteriores apresentaram coeficientes de correlação quadrático entre 0,997 e 0,999. As calibrações escolhidas (Fig. 17) apresentaram coeficientes de correlação iguais a 0,9995; 0,9996 e 0,9997. Todas as curvas que tiveram um  $R^2$  superior a 0,995 foram aceites.

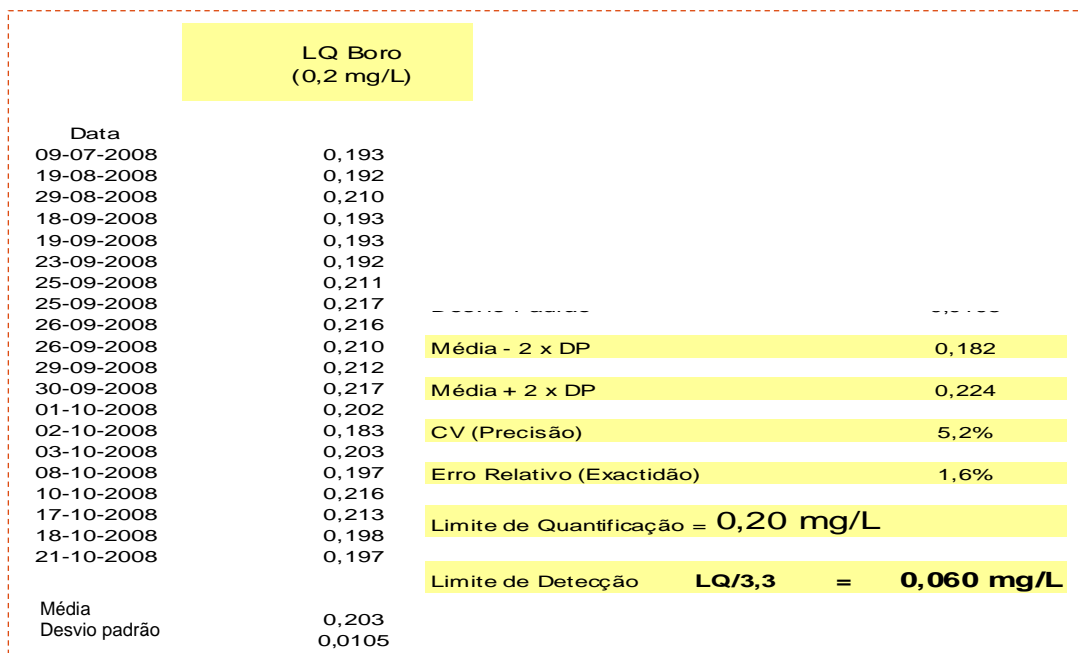


Figura 16 Estudo do limite de quantificação.

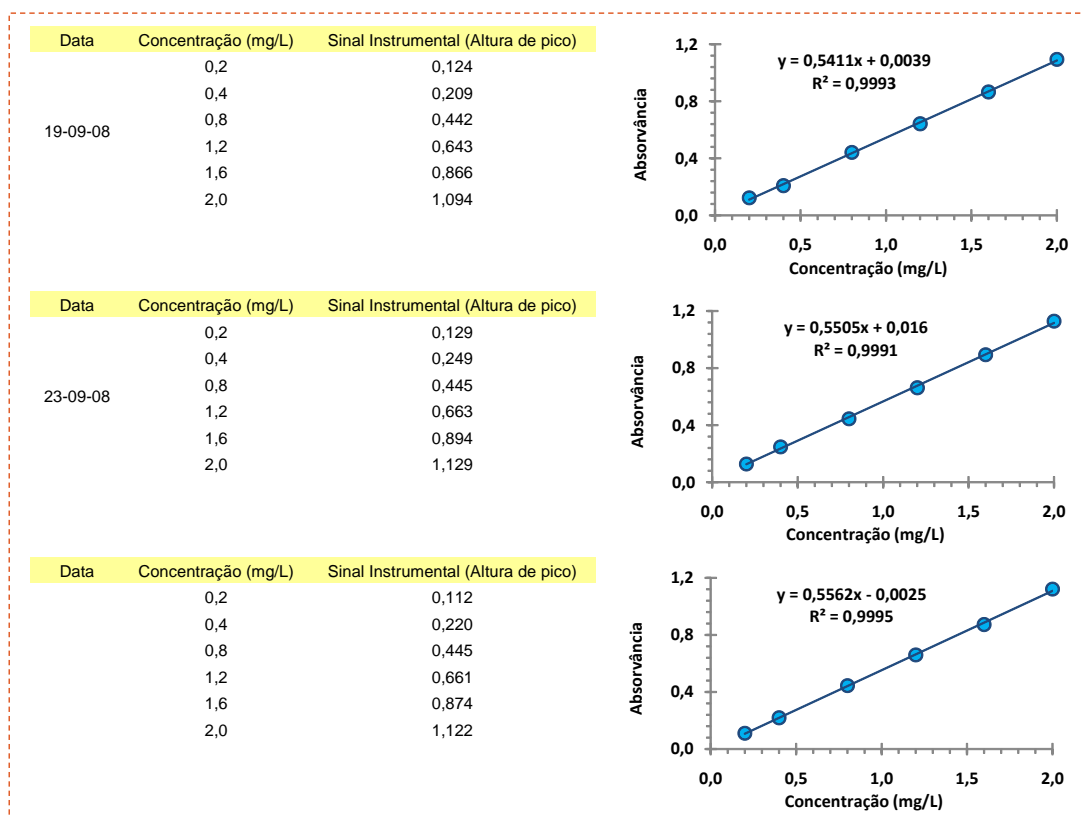


Figura 17 Estudo da linearidade.

### 2.3.1.4. Estudo de Precisão e Exactidão

Para estudar a precisão e a exactidão foram utilizados três padrões: o de menor concentração, o de maior concentração e o de concentração intermédia. Estes padrões foram analisados com base nas curvas de calibração correspondentes e as concentrações

obtidas foram utilizadas nos cálculos desvio padrão e de erro relativo. Os resultados de concentração obtidos foram expressos sob a forma de média  $\pm 2 \times$  desvio padrão.

Os valores utilizados neste estudo foram obtidos a partir de calibrações (Fig.18). Para o padrão de 0,200 mg/L os valores de concentração obtidos foram compreendidos entre 0,187 e 0,236 mg/L. O valor médio correspondente foi igual a 0,202 mg/L, associado ao desvio padrão 0,0126. O coeficiente de variação e o erro relativo correspondente foram, respectivamente, 6,22 e 0,95 %. Os valores de concentração obtidos para o padrão de calibração intermédio de 1,000 mg/L, foram compreendidos entre 0,962 e 1,040 mg/L. Com uma média de 1,003 e um desvio padrão de 0,0240. O valor de precisão e de exactidão foram de 2,40 e 0,31 % respectivamente. Para o último padrão de calibração de 2,000 mg/L foram obtidos valores de concentração entre 1,909 e 2,012 mg/L. O valor médio correspondente foi de 1,982 mg/L e o desvio padrão de 0,0261. Para a precisão e exactidão foram obtidos valores de 1,32 e 0,92 %, respectivamente. Os valores de erro relativo e de coeficiente de variação obtidos para os três padrões estudados foram aceites, dado que estes foram inferiores a 10 %.

|                           |            | 1.º Padrão de Calibração (0,2 mg/L) | Padrão de calibração Intermédio (1,0 mg/L) (média de cada sessão de trabalho) | Último Padrão de Calibração (2,0 mg/L) |
|---------------------------|------------|-------------------------------------|---|--|
|                           | Data       |                                     |   |  |
| 1                         | 09-07-2008 | 0,215                               | 0,975   | 1,993                                  |
| 2                         | 19-08-2008 | 0,236                               | 0,975   | 2,003                                  |
| 3                         | 29-08-2008 | 0,208                               | 1,029   | 1,939                                  |
| 4                         | 25-09-2008 | 0,220                               | 1,023   | 1,989                                  |
| 5                         | 25-09-2008 | 0,188                               | 0,962   | 2,005                                  |
| 6                         | 26-09-2008 | 0,194                               | 1,032   | 1,960                                  |
| 7                         | 26-09-2008 | 0,207                               | 1,021   | 2,012                                  |
| 8                         | 29-09-2008 | 0,197                               | 0,968   | 1,990                                  |
| 9                         | 30-09-2008 | 0,198                               | 0,986   | 1,992                                  |
| 10                        | 01-10-2008 | 0,202                               | 1,022   | 1,980                                  |
| 11                        | 02-10-2008 | 0,188                               | 0,992   | 1,909                                  |
| 12                        | 03-10-2008 | 0,189                               | 0,995   | 1,963                                  |
| 13                        | 08-10-2008 | 0,192                               | 1,004   | 1,954                                  |
| 14                        | 10-10-2008 | 0,217                               | 1,010   | 1,999                                  |
| 15                        | 17-10-2008 | 0,202                               | 1,020   | 1,971                                  |
| 16                        | 18-10-2008 | 0,195                               | 1,004   | 2,011                                  |
| 17                        | 21-10-2008 | 0,187                               | 1,040   | 1,982                                  |
| 18                        | 03-11-2008 | 0,201                               | 1,002   | 2,001                                  |
| 19                        | 06-11-2008 | 0,198                               | 0,999   | 1,979                                  |
| 20                        | 10-11-2008 | 0,204                               | 1,003   | 1,999                                  |
| Média                     |            | 0,202                               | 1,003   | 1,982                                  |
| Desvio Padrão             |            | 0,0126                              | 0,0240  | 0,0261                                 |
| CV (Precisão)             |            | 6,22%                               | 2,40%   | 1,32%                                  |
| Erro Relativo (Exactidão) |            | 0,95%                               | 0,31%   | 0,92%                                  |

Figura 18 Estudo da precisão e exactidão.

### 2.3.1.5. Estudo da Sensibilidade

O estudo da sensibilidade foi feito a partir do valor do declive, das várias rectas de calibração traçadas com concentrações compreendidas entre 0,2 e 2,0 mg/L de Boro. Os resultados de declive obtidos foram expressos sob a forma de média  $\pm$  2 x desvio padrão.

Os valores do declive obtidos foram indicados na Fig. 19. O valor médio correspondente foi igual a 0,5507, associado ao desvio padrão 0,0219. O valor de erro relativo foi aceite, dado que este foi inferior a 10 %.

|                     | Data       | Declive   |
|---------------------|------------|-----------|
| 1                   | 09-07-2008 | 0,5578    |
| 2                   | 19-08-2008 | 0,5410    |
| 3                   | 29-08-2008 | 0,5264    |
| 4                   | 18-09-2008 | 0,5429    |
| 5                   | 19-09-2008 | 0,5867    |
| 6                   | 23-09-2008 | 0,5503    |
| 7                   | 25-09-2008 | 0,5282    |
| 8                   | 26-09-2008 | 0,5564    |
| 9                   | 26-09-2008 | 0,5770    |
| 10                  | 29-09-2008 | 0,5893    |
| 11                  | 30-09-2008 | 0,5923    |
| 12                  | 01-10-2008 | 0,5648    |
| 13                  | 02-10-2008 | 0,5394    |
| 14                  | 03-10-2008 | 0,5325    |
| 15                  | 08-10-2008 | 0,5250    |
| 16                  | 10-10-2008 | 0,5304    |
| 17                  | 17-10-2008 | 0,5467    |
| 18                  | 18-10-2008 | 0,5381    |
| 19                  | 21-10-2008 | 0,5383    |
| 20                  |            |           |
| Média               |            | 0,5507    |
| Desvio Padrão       |            | 0,0219    |
| Média - 2 x DP      |            | 0,5070    |
| Média + 2 x DP      |            | 0,5945    |
| Desvio relativo (%) |            | 7,9 < 10% |

Figura 19 Estudo da sensibilidade.

### 2.3.1.6. Incerteza Associada aos Resultados do Método de Ensaio

A incerteza associada aos resultados do método foi calculada relativamente a um padrão de controlo preparado com uma concentração de 1 mg/L, testado ao longo das calibrações anteriores. A partir destes valores foram calculadas as incertezas associadas à precisão do método de ensaio ( $u_{PC}$ ), aos dados de recuperação ( $u_{rec}$ ) e a partir destas incertezas foram calculadas as incertezas combinada ( $u_{Comb,}$ ) expandida ( $U_{exp}$ ) e relativa ( $U_{rel}$ ) [19].

Os valores das incertezas obtidas foram indicados na Fig. 20. O valor médio e o desvio padrão obtidos para o padrão de controlo foram 1,00 e 0,027 mg/L, estes resultados deram

origem a um  $u_{PC}$  igual 0,027. O valor médio e o desvio padrão para a recuperação obtidos foram, respectivamente, 0,99 e 0,031 mg/L. A incerteza associada aos dados de recuperação foi de 0,006. A partir destes valores obtiveram-se  $u_{Comb}$  igual 0,027,  $U_{exp}$  de 0,055 e uma incerteza relativa de 5,5%. Neste sentido, os valores médios dos resultados analíticos devem estar associados a um erro estimado em 5,5 %.

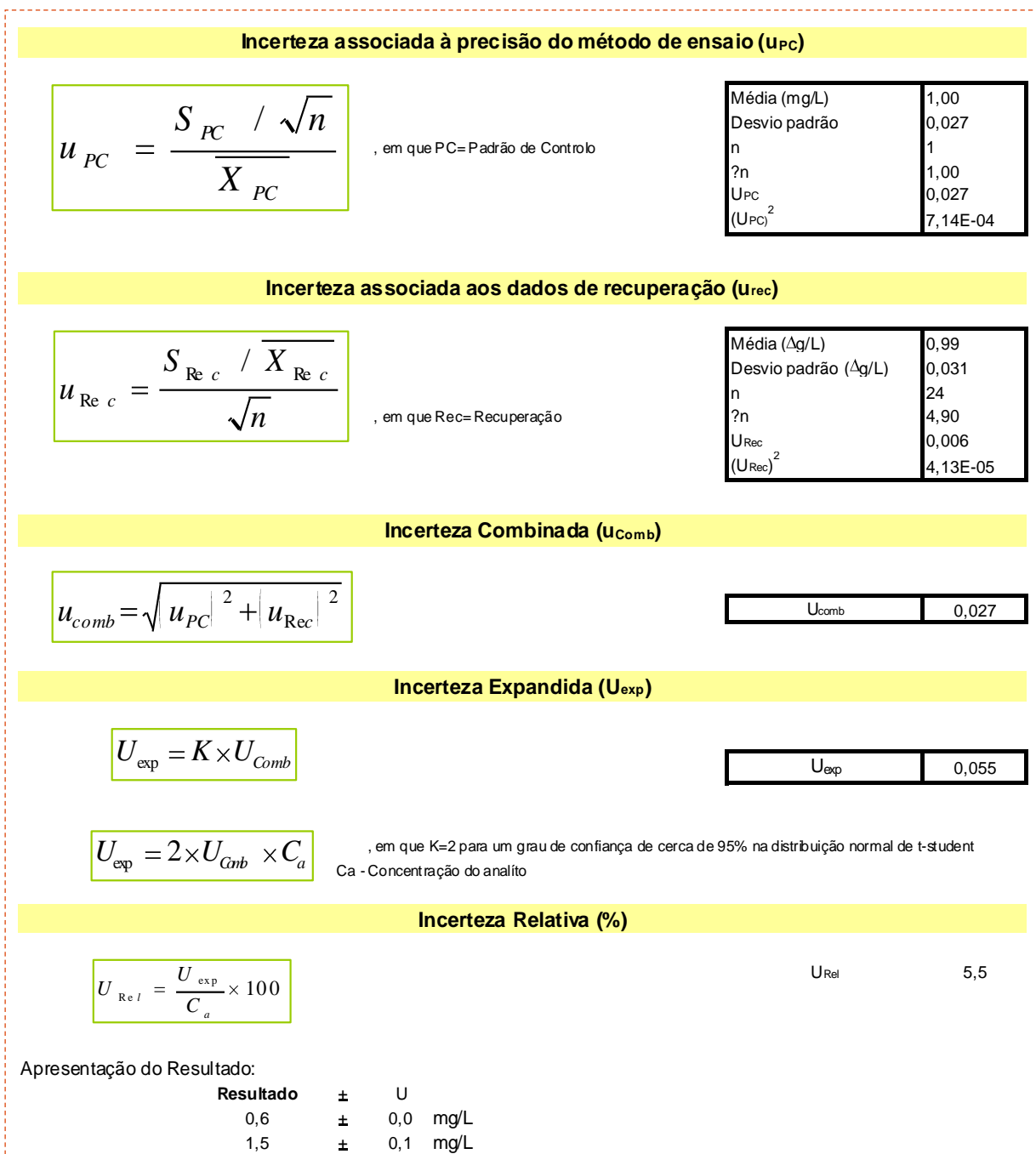


Figura 20 Incerteza associada aos resultados do método de ensaio.

### 2.3.2 Plano de Controlo Interno

Após a validação do método é estabelecido um plano de controlo interno da qualidade, aplicado às análises de rotina do laboratório. Este controlo visa estabelecer regras no sentido de garantir a qualidade dos resultados do método, facilitando também as actividades laboratoriais de rotina do analista. O plano definido para o procedimento de determinação do boro encontra-se indicado no Anexo B-2.

### 2.3.3. Controlo de Rotina

De forma a garantir a fiabilidade dos resultados, estabelecidos numa perspectiva de rotina, o laboratório tem implementada a elaboração de cartas de médias e de amplitudes e carta de duplicados da amostra.

#### 2.3.3.1 Carta de Média e de Amplitudes

Para representar as cartas de controlo de médias e de amplitudes para o padrão de 1,00 mg/L foi necessário identificar os limites da carta. Estes limites foram calculados com base no padrão intermédio de boro dessa concentração (Fig. 21). Para que este ensaio se considerasse completo seria necessária a realização de 40 curvas de calibração. No entanto, as amostras que deram entrada no laboratório foram insuficientes para este efeito. Por outro lado, este procedimento permitiu apenas obter informação complementar, já que neste ensaio foi utilizado um padrão de controlo, o que permitiu definir um critério de aceitação (10 % do seu valor teórico).

A título de exemplo, foram estimados os valores de LSA, LIA, LSC e LIC com base nos resultados obtidos até à data. A média e a amplitude calculadas para este efeito foram iguais a 1,002 mg/L e 0,028 u.a.a., respectivamente. Os limites de aviso para a média seriam LSA igual a 1,0371 mg/L e LIA igual a 0,9676 mg/L e os limites de controlo seriam LSC igual a 1,0544 mg/L e LIC igual a 0,9503 mg/L. Os limites de aviso para amplitudes seriam: LSA igual a 0,0695 u.a.a.e LIA igual a 0 u.a.a.e os limites de controlo seriam LSC igual a 0,0904 u.a.a. e LIC igual a 0 u.a.a. As cartas de controlo correspondentes encontram-se representadas nas Fig. 22 e Fig. 23.

| Data       | Padrão Intermédio Boro 1,0 mg/L |       |       |         | Máximo | Mínimo | Amplitude                   | Média | Amplitudes |        |        |     | Médias |        |        |        |        |
|------------|---------------------------------|-------|-------|---------|--------|--------|-----------------------------|-------|------------|--------|--------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|
|            | LSC                             | LSA   | LC    | LIC/LIA |        |        |                             |       | LSC        | LSA    | LC     | LIC | LIA    |        |        |        |        |
| 09-07-2008 | 0,968                           | 0,981 |       |         | 0,981  | 0,968  | 0,013                       | 0,975 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 19-08-2008 | 0,977                           | 0,973 |       |         | 0,977  | 0,973  | 0,004                       | 0,975 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 29-08-2008 | 1,045                           | 1,012 |       |         | 1,045  | 1,012  | 0,033                       | 1,029 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 18-09-2008 | 0,987                           | 1,043 |       |         | 1,043  | 0,987  | 0,056                       | 1,015 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 19-09-2008 | 0,949                           | 1,001 |       |         | 1,001  | 0,949  | 0,052                       | 0,975 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 23-09-2008 | 0,989                           | 1,001 |       |         | 1,001  | 0,989  | 0,012                       | 0,995 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 25-09-2008 | 1,030                           | 1,015 |       |         | 1,030  | 1,015  | 0,015                       | 1,023 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 25-09-2008 | 0,959                           | 0,964 |       |         | 0,964  | 0,959  | 0,005                       | 0,962 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 26-09-2008 | 1,017                           | 1,046 |       |         | 1,046  | 1,017  | 0,029                       | 1,032 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 26-09-2008 | 1,035                           | 1,006 |       |         | 1,035  | 1,006  | 0,029                       | 1,021 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 29-09-2008 | 0,984                           | 0,951 |       |         | 0,984  | 0,951  | 0,033                       | 0,968 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 30-09-2008 | 0,998                           | 0,974 |       |         | 0,998  | 0,974  | 0,024                       | 0,986 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 01-10-2008 | 1,003                           | 1,041 |       |         | 1,041  | 1,003  | 0,038                       | 1,022 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 02-10-2008 | 0,987                           | 0,996 |       |         | 0,996  | 0,987  | 0,009                       | 0,992 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 03-10-2008 | 0,994                           | 0,996 |       |         | 0,996  | 0,994  | 0,002                       | 0,995 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 08-10-2008 | 0,986                           | 1,022 |       |         | 1,022  | 0,986  | 0,036                       | 1,004 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 10-10-2008 | 1,017                           | 1,003 |       |         | 1,017  | 1,003  | 0,014                       | 1,010 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 17-10-2008 | 1,022                           | 1,017 |       |         | 1,022  | 1,017  | 0,005                       | 1,020 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 18-10-2008 | 1,011                           | 0,997 |       |         | 1,011  | 0,997  | 0,014                       | 1,004 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 21-10-2008 | 1,055                           | 1,025 | 1,035 | 1,044   | 1,055  | 1,025  | 0,030                       | 1,040 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 10-02-2009 | 0,995                           | 0,94  | 0,942 |         | 0,995  | 0,940  | 0,055                       | 0,959 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 06-03-2009 | 1,052                           | 0,995 |       |         | 1,052  | 0,995  | 0,057                       | 1,024 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 20-03-2009 | 0,929                           | 0,997 |       |         | 0,997  | 0,929  | 0,068                       | 0,963 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 22-04-2009 | 0,924                           | 0,969 | 0,974 | 0,964   | 0,974  | 0,924  | 0,050                       | 0,958 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
| 28-05-2009 | 1,122                           | 1,113 |       |         | 1,122  | 1,113  | 0,009                       | 1,118 | 0,0904     | 0,0695 | 0,0277 | 0   | 1,0544 | 1,0371 | 1,0024 | 0,9503 | 0,9676 |
|            |                                 |       |       |         |        |        | <b>Média das Amplitudes</b> | 0,028 |            |        |        |     |        |        |        |        |        |
|            |                                 |       |       |         |        |        | <b>Média das médias</b>     | 1,002 |            |        |        |     |        |        |        |        |        |

Figura 21 Valores para cálculo dos limites de aviso e de controlo das cartas de controlo.

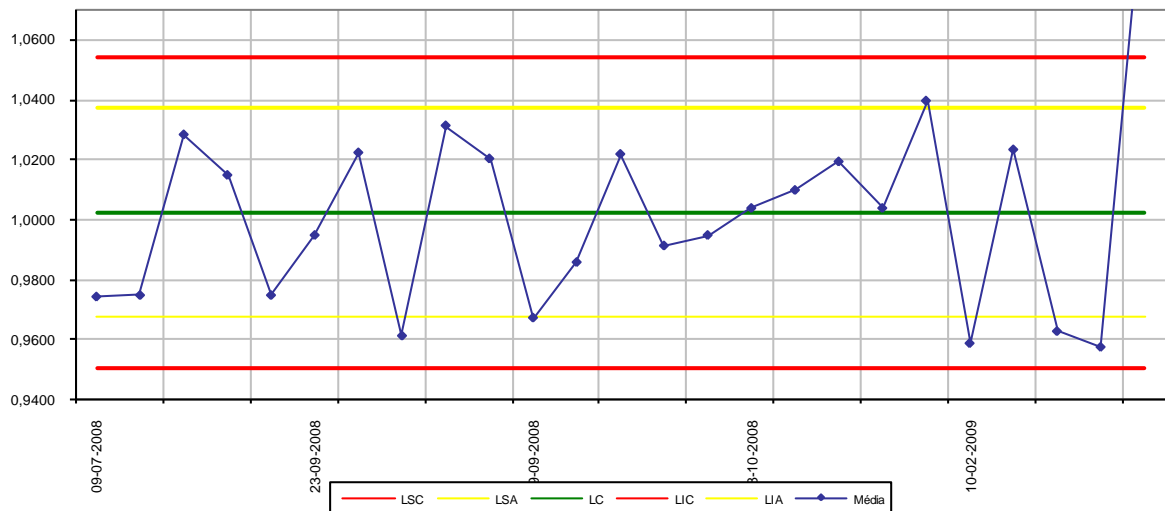


Figura 22 Carta de médias.

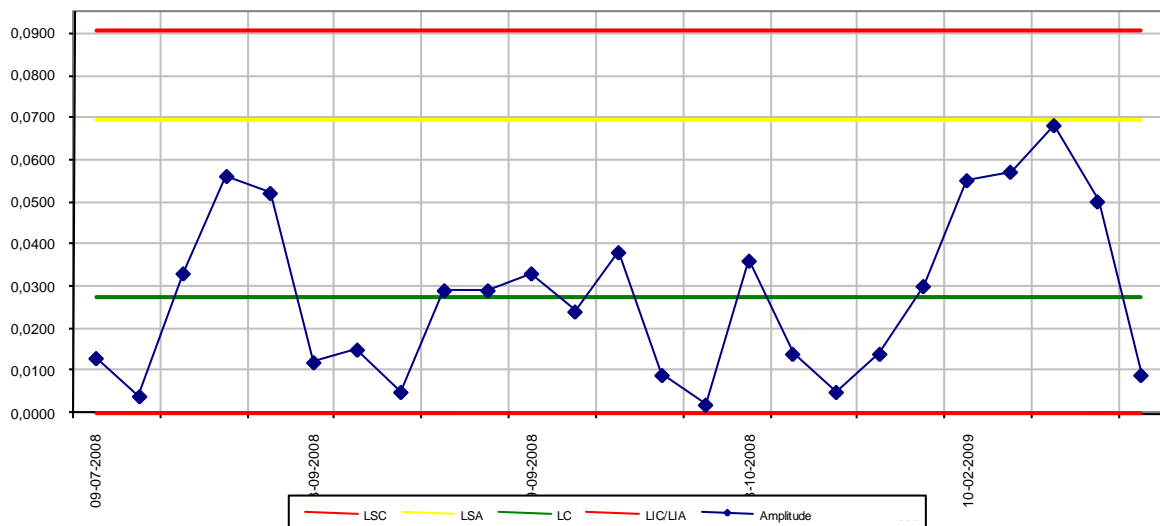


Figura 23 Carta de amplitudes.

### 2.3.3.2. Carta de Controlo de Duplicados de Amostra

Para representar a carta de controlo de duplicados de amostra foi necessário registar os valores de amplitude relativa para cada amostra (Fig. 24). Para que este ensaio se considerasse completo seria necessária a análise de 40 amostras. No entanto, as amostras que deram entrada no laboratório foram apenas 24, sendo claramente insuficientes para este efeito.

A Fig. 24 representa, por isso, o conjunto de pontos obtidos e não especifica os limites de aviso e os limites de controlo. Esta carta estará completa apenas quando derem entrada no laboratório o número de amostras suficiente. O critério de aceitação de duplicados de amostra foi igual a 10 % entre os dois valores.



total e nitratos. Para que estes aspectos fossem considerados seria necessário efectuar uma avaliação similar simultânea em todos os parâmetros analisados no laboratório.

Tabela 3 Consumo de reagentes para a determinação de boro.

| Reagentes                            | Massa (g) ou Volume (mL) | Custo (€) |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------|
| Acetato de amónio                    | 50 g                     | 3,65      |
| EDTA Na <sub>2</sub>                 | 1,4 g                    | 0,62      |
| Ácido acético glacial                | 25 mL                    | 0,34      |
| H - Azometina                        | 0,5 g                    | 3,56      |
| Ácido ascórbico                      | 1 g                      | 0,07      |
| Padrão comercial boro<br>(1000 mg/L) | 4 mL                     | 0,81      |



### 3. Determinação dos HAPs

Os HAPs constituem uma família extensa de compostos caracterizada por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados (Fig. 25). As propriedades físico-químicas dos HAPs são, em grande parte, determinadas pelos seus sistemas de duplas conjugadas, que variam com o número de anéis e portanto, com suas massas moleculares. São muito pouco solúveis em água, mas a sua solubilidade aumenta quando em presença de agentes tensio-ativos, do tipo dos detergentes aniônicos.

Os HAPs e os seus derivados são formados pela combustão incompleta de material orgânico. Neste sentido, a complexidade e composição de misturas de HAPs dependem das suas fontes emissoras. Em geral essas misturas são muito complexas, contendo uma grande variedade de HAPs em diferentes níveis de concentração.

De uma maneira geral, os HAPs são poluentes orgânicos de grande persistência ambiental e encontram-se associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cancro no homem. Muitos deles são capazes de reagir, após transformações metabólicas com o ADN, tornando-se carcinogénicos e potenciais mutagénicos.

Os HAPs que predominam em águas são os seguintes: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno e o indeno(1,2,3-cd)pireno.

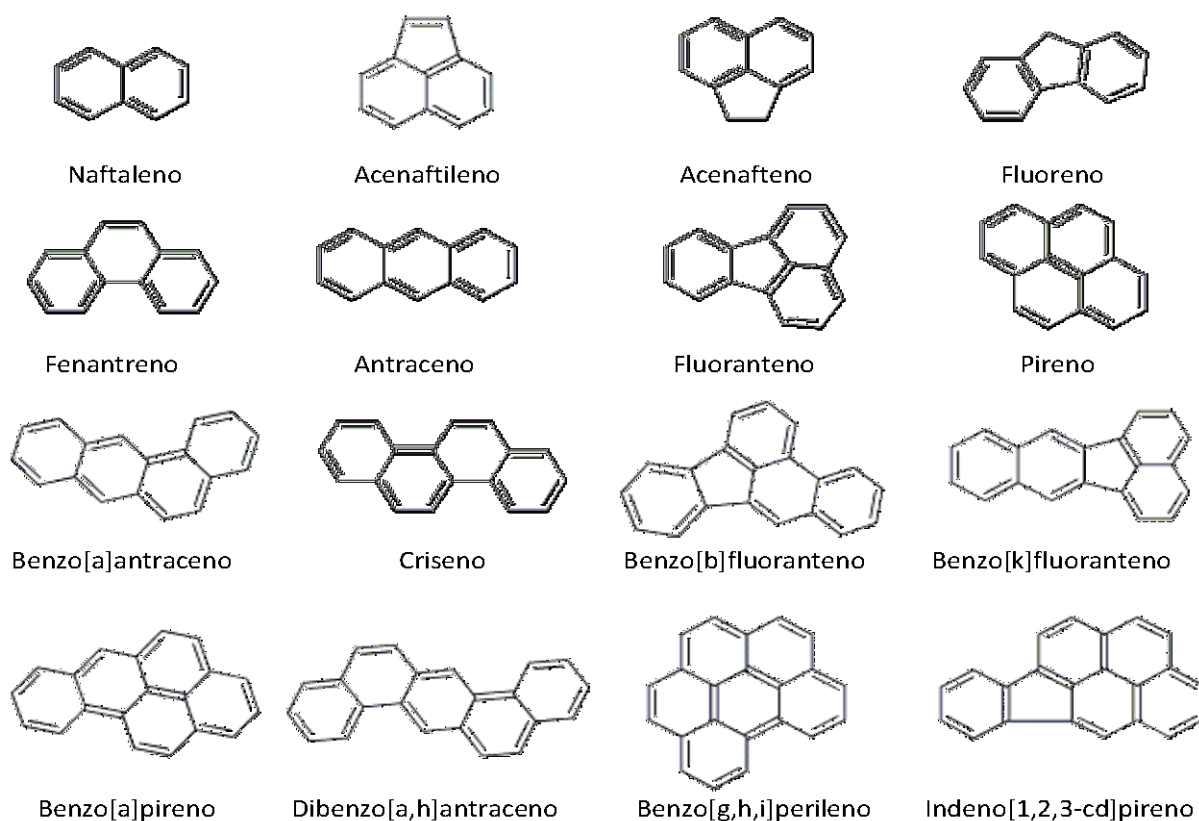


Figura 25 Estruturas dos HAPs mais importantes.

A fonte predominante dos HAPs é a combustão incompleta da matéria orgânica. Os HAPs são emitidos por fontes naturais e antropológicas (resultantes da actividade humana). A contribuição das fontes naturais é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas. As fontes antropológicas representam o principal processo de produção de HAPs e dizem respeito a: (i) pirólise de madeira para produção de carvão; (ii) operações de transporte e refinação do petróleo; (iii) incineração de resíduos domésticos e industriais; (iv) queimas de matéria orgânica de campos e florestas; (v) geração de energia via queima de combustíveis fósseis; (vi) pirólise de querosene para a formação de benzeno, tolueno e outros solventes orgânicos; (vii) emissão de motores de veículos (particularmente a diesel); (viii) fumo do tabaco; (ix) cozinhados; e (x) incêndios. Há ainda evidência de que os HAPs podem ser formados directamente da biossíntese de microorganismos e plantas.

Os HAPs antropológicos podem dividir-se em hidrocarbonetos de origem pirolítica (queima incompleta de combustíveis fósseis e derivados) e hidrocarbonetos de origem petrolífera (petróleo e derivados). As regiões marinhas próximas aos centros urbanos e industrializados são as mais afectadas pelas contribuições dos HAPs petrolíferos e

pirolíticos. Os HAPs pirolíticos comparados aos HAPs petrolíferos caracterizam-se pela baixa solubilidade na água e por ter um baixo grau de alquilação. Os HAPs pirolíticos são lentamente degradados na atmosfera e portanto, são introduzidos nos sedimentos sem grandes alterações.

A queima de combustíveis como petróleo e seus derivados, carvão, madeira, gás de carvão, etc, produz HAPs e muitos outros poluentes atmosféricos. A quantidade e os tipos de HAPs formados dependem das condições específicas do processo e do tipo de combustível, sendo que processos mais eficientes emitem menores quantidades de HAPs.

Os HAPs antropogénicos podem ainda ser divididos em fontes de emissão móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis destaca-se o motor de combustão interno como o principal emissor destas substâncias para o ambiente. Este tipo de motor é o mais comum em diversos veículos de transporte de cargas e passageiros. Em áreas urbanas esta é a principal fonte de emissão de HAPs para a atmosfera. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia eléctrica e calor e aquelas ligadas à actividade industrial (produção de alumínio) e de incineração, podendo emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta.

A emissão protagonizada pelos veículos a motor tem uma grande importância devido à complexidade e quantidade, cada vez maior, de material que é lançado na atmosfera. O material particular emitido por veículos a diesel, por exemplo, é constituído principalmente de carbono elementar que actua como superfície de condensação de HAPs e de outros compostos aromáticos.

As vias de exposição podem ser o ar, os alimentos, o solo e a água. A inalação de partículas presentes no ar com HAPs é uma importante via de exposição a estes compostos. O fumo do tabaco é uma fonte de contaminação do ar com HAPs carcinogénicos. Um indivíduo que fume 1 maço de cigarros sem filtro por dia, vai estar exposto ao dobro de HAPs carcinogénicos em relação a quem usa filtro.

Os alimentos são, normalmente, a principal fonte de exposição em pessoas que não estão expostas diariamente ao fumo do tabaco, ou seja, os não fumadores. Os HAPs já foram detectados em alimentos brutos e processados. O grau de contaminação depende do modo como os alimentos são processados, preservados e armazenados. Eles são principalmente detectados nas carnes fumadas, peixe, fruta, vegetais de folhas (espinafres e alface), óleos e gorduras vegetais. Os animais aquáticos, como mexilhões e ostras, que tendem a acumular HAPs, podem, eventualmente, representar outra forma de aporte destes compostos aos seres humanos e a outros animais. Em alimentos processados, a presença de HAPs está

associada ao alimento ou ainda a alguma etapa de processamento, como é o caso da defumação, fritura ou assadura dos alimentos.

Os HAPs são também encontrados à superfície dos solos. Estes compostos são adsorvidos para as folhas das plantas e depois são transferidos para o solo das florestas. Tanto em florestas como solos rurais, os valores encontrados são idênticos, mas nas áreas metropolitanas estes valores já são muito mais elevados devido à queima de combustíveis fósseis. Os valores em áreas industriais são mais elevados.

De acordo com a Agência Internacional para Pesquisas do Cancro (IARC) os HAPs com poder carcinogénico que podem aparecer na água são os benzofluorantenos, benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno. Destes, o benzo[a]pireno (BaP), é considerado o mais cancerígeno. Segundo a *U.S. Environmental Protection Agency* (U.S. EPA), o BaP em quantidades superiores a 0,2 µg/L na água potável causa problemas à saúde. A exposição prolongada a concentrações superiores a 2 µg/L causa um efeito potencial no desenvolvimento de cancro. Na maioria das águas e sedimentos, o BaP resiste ao ataque por microorganismos ou substâncias químicas reactivas, podendo, contudo, evaporar ou ser degradado por exposição à luz solar. O BaP bioconcentra-se em organismos aquáticos que não o metabolizam, incluindo o plâncton, as ostras e alguns peixes.

Devido à baixa solubilidade e elevada afinidade para a matéria particular, os HAPs não são, normalmente, encontradas na água em elevadas concentrações. A maior fonte de contaminação dos HAPs em água potável é o coaltar que é usado para proteger os canos da água potável da corrosão. Esta situação faz com que os valores de HAPs na nossa água aumentem. Deste modo os valores na nossa comida aumentam também devido à água que usamos para a confeccionar, para além do uso de utensílios contaminados com coaltar ou até da própria comida poder estar contaminada. A maioria dos HAPs encontrados nas águas e solos são resultado da deposição atmosférica [20]. Na Fig. 26 é possível ver-se o transporte dos HAPs pelas diferentes fontes de exposição.

De acordo com as considerações anteriores, a legislação portuguesa impõe limites legais para os HAPs em água de consumo. De acordo com o Decreto-Lei 306/2007 o valor paramétrico é de 0,1 µg/L para a soma dos teores de benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno.

Para a recuperação de águas contaminadas com HAPs deve considerar-se que estes compostos se associam às substâncias orgânicas poluentes presentes em suspensão na água. Neste sentido, o recurso a tratamentos de coagulação/floculação com filtração, juntamente com outros tratamentos como a adsorção sobre carvão

activado, ou a oxidação pelo cloro ou pelo ozono permitem reduzir, aos níveis desejados, a contaminação por estes compostos [10].

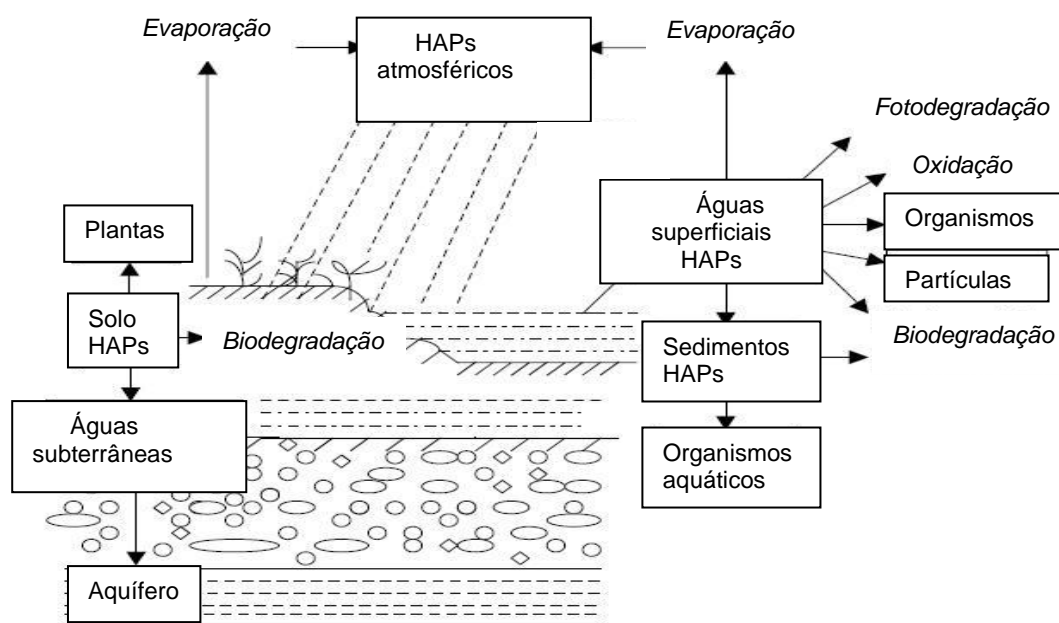


Figura 26 Transporte dos HAPs pelas diferentes fontes de exposição.

### 3.1. Metodologias Analíticas

Para salvaguardar a qualidade da água que chega ao consumidor torna-se necessário garantir que os limites legais de HAPs são respeitados. Esta condição impõe o controlo deste parâmetro analítico. Na literatura é possível encontrar várias metodologias para este efeito, essencialmente baseadas em cromatografia (Tabelas 4 e 5) ou luminiscência (Tabela 6).

A cromatografia é uma técnica separativa que pode ser líquida ou gasosa, de acordo com o estado físico da fase móvel utilizada. Ela é essencialmente um método físico de separação em que os componentes a separar são distribuídos entre duas fases, uma estacionária e outra móvel. Tal como o próprio nome indica, a fase estacionária é aquela que se encontra fixa, ancorada numa coluna, e a fase móvel é a que se movimenta, contactando intimamente com a fase estacionária ao longo da trajetória desse movimento. A separação ocorre em resultado de processos repetidos de adsorção e dessorção durante o movimento dos componentes da amostra, ao longo da fase estacionária, e a separação é devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra.

Os métodos cromatográficos são morosos, envolvendo períodos de tempo longos no tratamento das amostras e no traçado da curva de calibração, dispendiosos, devido à pureza elevada dos reagentes utilizados e ao elevado custo do equipamento e da manutenção associada, e tóxicos para o meio ambiente (as fases móveis são geralmente solventes orgânicos).

Genericamente, os métodos baseados em técnicas separativas fornecem resultados analíticos de boa precisão e exactidão. Numa perspectiva da sua aplicação ao controlo de rotina, é importante referir a necessidade de estabelecer alguns procedimentos, que podem ser complexos, antes de se proceder à introdução das soluções a ensaiar no sistema separativo. São exemplos a desgaseificação e filtração, e longos períodos de condicionamento da coluna de separação apropriada, etc. O equipamento envolvido é, também, dispendioso e requer pessoal especializado para o seu funcionamento.

Analisando a Tabela 4 e 5 podemos dizer que, relativamente ao pré-tratamento da amostra, os métodos cromatográficos requerem essencialmente a técnica de *solid phase (micro)extraction*. Este pré-tratamento tem como objectivo eliminar espécies interferentes e pré-concentrar os HAPs. De uma forma geral os ensaios podem ser morosos chegando a atingir cerca de 65 minutos.

Os detectores de cromatografia líquida são essencialmente de fluorescência e UV/Vis. Estes últimos não permitem atingir os limites de detecção e limites de quantificação que os métodos de fluorescência alcançam (Tabela 4). Os detectores de cromatografia gasosa são essencialmente de espectrofotometria de massa. Estes detectores têm a vantagem de permitirem a identificação dos compostos, mas representam elevado custo de manutenção para um laboratório de rotina.

A base generalizada da análise espectrofotométrica de absorção é a medida da fracção de radiação que é absorvida ao longo de uma gama muito alargada de espectro electromagnético. Muitos sistemas químicos podem ser excitados pela radiação electromagnética e reemitir ao mesmo tempo a outro comprimento de onda. Estes sistemas denominam-se por fotoluminescentes, dentro dos quais se poderão distinguir os fluorescentes e os fosforescentes. Estes dois tipos de mecanismos são produzidos por mecanismos diferentes, cessando na fluorescência a emissão logo após a interrupção da incidência da radiação, ao contrário da fosforescência em que aquela perdura durante um curto intervalo de tempo, depois de a radiação incidente ter sido interrompida. A radiação emitida pode situar-se na zona do visível, ultravioleta, ou noutras gamas mais energéticas do espectro, como a do raio X.

Tabela 4 Determinação dos HAPs por cromatografia líquida (LC).

| HAPs  | Pré-tratamento amostra | Fase móvel                                   | Detector      | tr (min) | Parâmetros Analíticos                                       | REF. Ano     |
|---|------------------------|--|---------------|----------|---|--------------|
| (1), (3), (6), (7) e (17)   | DLLME - SFO            | Mistura metanol-<br>água<br>(75:25)          | UV/Vis.       | 4-10     | LD: 45-1100 ng/L;<br>LR: 100-50000 ng/L                     | [21]<br>2009 |
| (1), (3), (4), (5), (6), (7), (8),<br>(9), (10), (11), (12), (13), (14),<br>(15) e (16)       | SPE -<br>LETRSS        | Mistura metanol -<br>água                    | Fluorescência | 9-47     | LD: 0,8-60,0 ng/L;<br>LR: 3,0-1000 ng/L                     | [22]<br>2009 |
| (1), (3), (4), (5), (6), (7), (8),<br>(9), (10), (11), (12), (13), (14),<br>(15), (16) e (18) | LLE                    | Acetonitrilo-água em<br>gradiente            | Fluorescência | ---      | LD: 0,017-0,13 ng/L;<br>LQ: 0,056-0,43 ng/L                 | [23]<br>2009 |
| (1), (2), (4), (5), (6), (7), (8),<br>(9), (11) e (12)  | SPE                    | Mistura metanol-<br>água                     | UV/Vis.       | 6-32     | LD: 0,005-0,058 ng/L;<br>LR: 0,04-100 ng/L                  | [24]<br>2007 |
| (1), (3), (4), (5), (6), (7), (8),<br>(9), (10), (11), (12), (13), (14),<br>(15) e (16)       | LLE                    | Acetonitrilo-água em<br>gradiente            | Fluorescência | -        | LD: 0,033-0,13 ng/L;<br>LQ: 0,11-0,43 ng/L                  | [25]<br>2008 |
| (1), (3), (6), (8) e (19)   | SPE                    | Mistura acetonitrilo-<br>água (75-80%) (V/V) | UV/Vis.       | 6-18     | LD: 0,005-0,040 µg/L;<br>LR: 0,5-10 µg/L                    | [26]<br>2005 |
| (1), (5), (6), (7), (11), (12), (13)<br>e (15)  | SPE                    | Mistura metanol-<br>água (95:5)              | UV/Vis.       | 4-25     | LD: 0,9-58,6 ng/L;<br>LR: 10-53000 ng/L                     | [27]<br>2006 |
| (7), (9), (11), (12), (13),<br>(14),(15) e (16)   | SBSE                   | Mistura acetonitrilo-<br>água                | Fluorescência | 5-35     | LD: 0,5-7,3 ng/L;<br>LQ: 1,0-22,0 ng/L;<br>LR: 1,0-175 ng/L | [28]<br>2004 |
| (1); (3); (4); (5); (6); (7); (8);<br>(9); (10); (11); (12); (13); (14);<br>(15) e (16)       | SBSE                   | Mistura acetonitrilo-<br>água                | Fluorescência | 4-22,5   | LD: 0,2-2,0 ng/L;<br>LR: 0,2-200 ng/L                       | [29]<br>2001 |

tr – Tempo de retenção; LD – Limite de detecção; LQ – Limite de quantificação; LR – Intervalo linear; DLLME – SFO – Microextração dispersiva líquido-líquido baseado em “solidification of floating organic droplet”; UV/Vis. – Ultra-violeta visível; SPE – Extração em fase sólida; LETRSS – “Laser-excited time-resolved shpol “skii spectroscopy”; LLE – Extração líquido-líquido; SBSE – Extração “stir bar sorptive”; Naftaleno (1); Acenaftileno (2); Acenafteno (3); Fluoreno (4); Fenantreno (5); Antraceno (6); Fluoranteno (7); Pireno (8); Benzo(a)antraceno (9); Criseno (10); Benzo(b)fluoranteno (11); Benzo(k)fluoranteno (12); Benzo(a)pireno (13); Dibenzo(a,h)antraceno (14); Benzo(g,h,i)perileno (15); Indeno(1,2,3-cd)pireno (16); Difenil (17); Benzo(e)pireno (18); Bifenil (19).

Tabela 5 Determinação dos HAPs por cromatografia gasosa (GC).

| HAPs   | Pré-tratamento amostra | Fase móvel | Detector | tr (min)      | Parâmetros Analíticos  | REF. Ano     |
|--|------------------------|------------|----------|---------------|--|--------------|
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8); (9); (10); (11); (12); (13); (14); (15) e (16)   | MSPE                   | ---        | MS       | 4-19          | LD: 0,8-36 µg/L;<br>LR: 10-800 µg/L                                  | [30]<br>2009 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8) e (10)  | HLLC                   | Nitrogénio | FID      | 9-40          | LD: 0,02-0,18 µg/L;<br>LR: 0,1-400 µg/L                              | [31]<br>2008 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8); (9); (10); (11); (12); (13); (14); (15) e (16)   | MASE                   | Hélio      | MS       | 7,1-36,5      | LD: 0,003-0,040 µg/L;<br>LQ: 0,010-0,133 µg/L ;<br>LR: 0,05-100 µg/L | [32]<br>2007 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8); (9); (10); (11); (12); (13); (14); (15); (16); (17); (18); (19); (20); (21); (22); (23); (24); (25); (28) e (29) | SPME                   | Hélio      | MS       | 26,0-<br>79,9 | LD: 0,00007-0,00076 µg/L;<br>LQ: 0,00010-0,00098 µg/L                | [33]<br>2007 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8); (9); (10); (11); (12); (13); (14); (15) e (16)   | CFME                   | Hélio      | MS       | 5,5-28,5      | LD: 0,001-0,01 µg/L;<br>LR: 0,05-15 µg/L                             | [34]<br>2007 |
| (1); (4); (6); (7) e (8)   | SPME                   | Hélio      | MS       | 6,2-12,1      | LD: 4-5pg/mL;<br>LR: 10-5000 pg/mL                                   | [35]<br>2006 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8); (9); (10); (13); (15); (26); (27); (28) e (29)   | DLLME                  | Hélio      | FID      | 9-28          | LD: 0,007-0,030µg/L;<br>LR: 0.02-200 µg/L                            | [36]<br>2006 |
| (4); (6); (7); (8) e (10)  | MEPS                   | ---        | MS       | 8,8-13,4      | LD: 0,001-0,005 µg/L<br>LQ: 0,005 µg/L                               | [37]<br>2006 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (6); (7); (8); (9); (10); (11); (12); (13); (14); (15) e (16)   | SPME                   | Hélio      | MS       | 10-65         | LD: 0,001-0,029 µg/L;<br>LR: 0,01-10 µg/L                            | [38]<br>2004 |
| (1); (2); (3); (4); (5); (7); (8) e (10)   | SPME                   | Hélio      | FID-MS   | 16-26         | LD: 0,05-0,16 µg/L ;<br>LR: 0,5-100 µg/L                             | [39]<br>2005 |
| (1); (3); (4); (5); (6); (7) e (8)   | HSME                   | Hélio      | FID      | 7-32          | LD: 4-41 µg/L;<br>LR: 10-480 µg/L                                    | [40]<br>2003 |

tr – Tempo de retenção; LD – Limite de detecção; LQ – Limite de quantificação; LR – Intervalo linear; MSPE – Extração magnética em fase sólida; HLLC – Extração homogénea líquido-líquido; MASE – “Membrana – assisted solvent extraction”; SPME – Microextração em fase sólida; CFME – Microextração em fluxo contínuo; DLLME – Microextração dispersiva líquido-líquido; MEPS – “Microextraction in a packed syringe”; HSME – “Headspace solvent microextraction”; MS – Espectrofotómetro de massa; FID – Detecção ionização em chama; Naftaleno (1); Acenaftileno (2); Acenafteno (3); Fluoreno (4); Fenantreno (5); Antraceno (6); Fluoranteno (7); Pireno (8); Benzo(a)antraceno (9); Criseno (10); Benzo(b)fluoranteno (11); Benzo(k)fluoranteno (12); Benzo(a)pireno (13); Dibenzo(a,h)antraceno (14); Benzo(g,h,i)perileno (15); Indeno(1,2,3-cd)pireno (16); 2-metilnaftaleno (17); 1,2-dimetilnaftaleno (18); 1-metilfluoreno (19); Dibenzotiofeno (20); 1-metilfenantreno (21); 2-metilnaftaleno (22); Benzo (b)fluoreno (23); Benzodifenilenosulfuro (24); Trifenileno (25); Benzofluoreno (26); Benzo(e)acefenantileno (27); Benzo(e)pireno (28); Perileno (29).

Tabela 6 Determinação dos HAPs por métodos ópticos de luminescência.

| HAPs                | Técnica        | Características genéricas  | Parâmetros analíticos                           | REF. Ano     |
|---------------------|----------------|--|---|--------------|
| (1); (2); (3) e (4) | Fluorescência  | O pré-tratamento da amostra foi feita com SDS e partículas de alumina com pH2;<br>Os HAPs foram determinados selectivamente pela análise do SFS;<br>Intervalo de comprimento de onda entre a excitação e a emissão 29-98 nm. | LD: 0,3-1 ng/L;<br>LR: 1-150 ng/L               | [41]<br>2009 |
| (3)                 | Fosforescência | Sensor óptico por imobilização de HAPs numa resina não iónica em suporte sólido.   | LD: 12 ng/L;<br>LQ: 39 ng/L;<br>LR: 12-200 ng/L | [42]<br>2005 |

SDS – Dodecilsulfato de sódio; SFS – “Synchronous fluorescence scan”; LD – Limite de detecção; LQ – Limite de quantificação; LR – Intervalo linear; Pireno (1); Benzo(k)fluoranteno (2); Benzo(a)pireno (3); Perileno(4);

A intensidade de radiação fluorescente permite determinar quantitativamente vestígios de muitas espécies orgânicas e inorgânicas, tendo o método limites de detecção muito baixos, geralmente na ordem dos  $\mu\text{g/L}$ . Contudo esta técnica não é tão aplicada como os métodos de absorção porque só um número mínimo de sistemas emite radiações fluorescentes. A fosforescência é ainda menos utilizada sob o ponto de vista analítico, por motivos semelhantes.

Os métodos baseados em luminescência permitem atingir limites de detecção por vezes inferiores aos métodos cromatográficos, embora careçam da selectividade típica dos métodos separativos.

## 3.2. Parte Experimental

### 3.2.1. Material e Aparelhos Utilizados

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 10,00 a 100,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 1,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a duas pipetas automáticas, uma Eppendorf, modelo P100 e uma Socorex, modelo P1000, ambas de volume regulável.

A determinação dos HAPs por cromatografia líquida foi realizada num HPLC Prominence, modelo CTO-20 A, com detecção fluorimétrica (Shimadzu, modelo RF-10AXL). A coluna era Prominence, modelo CTO-20 A. Para a injeção das amostras foi utilizada um seringa graduada de 100  $\mu\text{L}$  Hamilton, modelo 710 SNR.

A preparação da amostra foi realizada com o sistema de extracção em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*).

A aquisição e tratamento de dados foram efectuados através do software LC Solution.

### 3.2.2. Reagentes

A água utilizada foi água ultra-pura, com uma resistividade igual ou superior a 15  $\text{M}\Omega$  a 25°C. Todos os reagentes utilizados – acetonitrilo (Riedel-deHäen); padrão misto de HAPs de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma); padrão individual de indeno de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma); padrão individual de benzo (K) fluranteno de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma) padrão individual de benzo (b) fluranteno de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma); e padrão individual de benzo (ghi) perileno de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma) – foram de qualidade p.a., sem qualquer purificação adicional.

### **3.2.3. Soluções**

Todas as soluções foram preparadas em acetonitrilo. As soluções padrão, de concentrações compreendidas entre 0,1 e 25 µg/L, foram preparadas por diluição rigorosa de um padrão misto de HAPs de 100 µg/L. A preparação dos padrões individuais com uma concentração de 20 µg/L, foi efectuada por diluição rigorosa dos padrões individuais com uma concentração de 100 µg/L.

### **3.2.4 Preparação de Padrões**

#### **3.2.4.1. Preparação das Soluções Padrão de Calibração**

Para a preparação da solução padrão misto de 100 µg/L de HAPs mediram-se 250 µL de uma solução padrão misto de 10 µg/mL de HAPs, para um balão de 25 mL e fez-se o volume com acetonitrilo.

As soluções padrão de calibração apresentavam uma gama de trabalho de 0,1-25 µg/L de HAPs. Estas soluções foram preparadas a partir da solução padrão de 100 µg/L de HAPs. Para este efeito, mediram-se 6,25; 5,00; 3,75; 2,50; e 1,25 mL da solução padrão misto de 100 µg/L, para um balão de 25 mL e fez-se o volume com acetonitrilo. Mediram-se também 1,00; 0,50 e 0,1 mL da solução padrão misto de 25 µg/L, para um balão de 25 mL e fez-se o volume com acetonitrilo. As concentrações obtidas foram iguais a, respectivamente, 25; 20; 15; 10; 5; 1; 0,5; e 0,1 µg/L.

#### **3.2.4.2. Preparação das Soluções Padrões Individuais**

Para a preparação das soluções dos padrões individuais de 100 µg/L mediram-se 25 µL de cada solução padrão individual, para um balão de 25 mL e fez-se o volume com acetonitrilo. As soluções de trabalho dos padrões individuais apresentavam uma concentração de 20 µg/L. Estas soluções foram preparadas a partir das soluções dos padrões individuais de 100 µg/L preparadas anteriormente. Para este efeito mediram-se 5 mL de cada solução padrão individual para um balão de 25 mL e fez-se o volume com acetonitrilo.

### **3.2.5. Pré-Tratamento das Soluções Padrão**

Para dar resposta às necessidades legais foi necessário ajustar a curva de calibração a uma região de concentração com resposta linear adequada. De acordo com a legislação actual o Decreto-Lei 306/2007, o método deve ser capaz de detectar

concentrações individuais de HAPs inferiores a 0,01 µg/L. Para este efeito testou-se um sistema de SPE baseado numa metodologia descrita na literatura [43]. Este pré-tratamento encontra-se ainda em fase de desenvolvimento.

### 3.3. Resultados e Discussão

Considerando que a presente metodologia ainda não se encontrava estabelecida no laboratório, procedeu-se inicialmente à optimização do procedimento cromatográfico com vista à determinação de HAPs em águas. Os parâmetros optimizados neste contexto foram os seguintes: temperatura do forno (30° a 40 °C), comprimento de onda do detector (280-389; 280-420; 260-430 e 290-505 nm,  $\lambda_{\text{excitação}}-\lambda_{\text{emissão}}$ ), caudal (1,0 a 1,2 mL/min), concentração da fase móvel acetonitrilo/água (35:65; 40:60; 45:55; 50:50 e 60:40) eluída em gradiente e tempo de ensaio (20 a 60 min.). As condições seleccionadas foram 30 °C, 290-505 nm, 1,0 mL/min, acetonitrilo/água (40:60) até 16 min. e (100:0) até 20 min. de tempo de ensaio. Este tempo de ensaio foi necessário para garantir a eluição de benzo (K) fluoranteno, benzo (b) fluoranteno, benzo (ghi) perileno e indeno. Estas condições encontram-se no Anexo C-1.

Nas condições seleccionadas, injectaram-se cada uma das 8 soluções padrão mistas e das 4 soluções individuais no HPLC, com concentrações compreendidas entre 0,1 a 25 µg/L. Cada solução padrão foi lida em duplicado e o tempo que decorria entre cada injeção era igual a, pelo menos, 20 minutos. Do cromatograma fornecido pelo aparelho foram registados os tempos de retenção e as áreas de cada composto eluído. Procedeu-se à representação gráfica das calibrações dos componentes benzo (b) fluranteno (benzo b), benzo (K) fluranteno (benzo k), benzo (ghi) perileno (benzopireno) e indeno. Estas calibrações encontram-se no Anexo C-2.

Tendo em conta a legislação actual, as características da curva de calibração conseguida não são adequadas à determinação de HAPs em águas. Neste sentido, optou-se por implementar um procedimento de pré-tratamento de amostra que fosse capaz de promover a concentração dos HAPs nas amostras. Para isso utilizou-se um sistema de SPE descrito na literatura para este efeito [43].

Na presente data, o sistema continua ainda em estudo, pelo que não foi possível alcançar os limites de quantificação necessários ao cumprimento da legislação.

## 4. Determinação da Turvação

A turvação ou turbidez da água é devida à presença em suspensão de materiais diversos, finamente divididos, tais como o limo, argilas, grãos de areia, colóides, plâncton, matéria orgânica, etc.. Podem ocorrer turvações nas redes devido à libertação de depósitos existentes nas canalizações, na sequência de processos de corrosão, ou por acidentes verificados no decurso do tratamento. A turvação será tanto menor quanto mais eficiente for o tratamento da água bruta utilizada, constituindo, por isso, um meio de controlo rápido e útil da eficiência do tratamento.

O consumidor reage, negativa e espontaneamente, à presença de substâncias presentes em suspensão na água, rejeitando-a liminarmente. Uma água pode, porém, ser turva sem que daí resultem riscos para a saúde. Contudo, esse facto é indicador de que a qualidade da água é duvidosa, ou de que algo correu mal ao nível do tratamento e produção de água de consumo, factos que o consumidor não aceita facilmente.

Não são as partículas em suspensão que originam, em geral, riscos sanitários, mas sim as bactérias, cistos, parasitas e vírus que neles se podem fixar, sendo, desse modo, protegidos da acção dos desinfectantes, eventualmente aplicados. Por outro lado, a matéria orgânica pode neutralizar os desinfectantes aplicados, facilitando a sobrevivência dos microrganismos e o seu eventual crescimento numa fase posterior, nos depósitos e/ou nas redes de distribuição. Alguns dos subprodutos que se podem

formar neste processo podem, além disso, conduzir à formação de compostos carcinogénicos, como sucede, por exemplo, no caso dos organoclorados. Podem ainda formar-se, na sequência dessa turvação e dos processos subsequentes, aromas e sabores desagradáveis, que afectam a qualidade da água.

A turvação da água tem várias consequências possíveis, de ordem sanitária e de ordem ecológica. A importância sanitária da turvação (i) prende-se com questões estéticas, (ii) afecta a filtrabilidade; e (iii) dificulta a desinfecção. A importância ecológica decorre da (i) alteração/redução da penetração da luz na água; e da (ii) ocorrência de fenómenos de superfície, relacionados com a tensão superficial da água [10].

De acordo com o Decreto-Lei 306/2007, o limite legal de turvação na água de consumo é de 4 NTU, em que NTU significa unidade nefelométrica de turbidez (do inglês, *nephelometric turbidity unit*). A turvação da água pode ser eliminada por filtração da água bruta, ou, mais eficientemente, por coagulação/floculação/sedimentação/filtração. Uma boa desinfecção da água tratada não poderá ser efectuada em águas cuja a turbidez exceda 1 NTU.

#### 4.1. Metodologias Analíticas

Na literatura não aparecem metodologias para a determinação da turvação em águas. As análises de turvação publicadas destinam-se a outros fins, nomeadamente para determinar a radiação solar [44], determinar a época de residência de partículas suspensas no estuário de um rio [45], determinar a turvação atmosférica [46] e determinar o tamanho da partícula e do cristal no espectro dos pigmentos de  $\text{TIO}_2$  [47].

O método utilizado no INSA segue a metodologia do Rodier [18]. Este método tem como objectivo a determinação de turvação por turbidimetria. O método baseia-se na medida óptica da dispersão da luz ao atravessar a água a analisar.

A sujidade das células de vidro utilizadas na medição, poderá interferir, pelo que devem estar cuidadosamente limpas. Poderá ser lavado com ácido clorídrico ou com detergente. As bolhas de ar também poderão interferir com as medições, mas essa interferência pode ser minimizada por uma manipulação cuidadosa das amostras.

## **4.2. Procedimento Experimental**

### **4.2.1. Material e Aparelhos Utilizados**

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 100,00 mL. Para as medições de volumes rigorosos foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. As pesagens foram realizadas numa balança Kern 770, com precisão igual a 0,00001g.

A determinação da turvação foi realizada num turbidímetro, Hach, modelo 2100 N Turbidimeter. Para a determinação da turvação foram utilizadas células de vidro de 25 mL. Os resultados leram-se no turbidímetro e registaram-se os valores de turvação, dados pelo equipamento. Através do programa EXCEL da Microsoft Office determinaram-se as equações das rectas de calibração.

### **4.2.2. Reagentes**

A água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi água ultra-pura, com uma resistividade igual ou superior a 15 M $\Omega$  a 25°C.

Todos os reagentes utilizados – hexametilenotetramina (Panreac); e sulfato de hidrazina (Merck) – foram de qualidade p.a., sem qualquer purificação adicional.

### **4.2.3. Soluções**

Todas as soluções foram preparadas em água ultra-pura: solução de formazina de 4000 NTU; padrão comercial (HACH) entre <0,1 – 4000 NTU e padrões de gelex (HACH) branco; 1,8; e 18 NTU.

### **4.2.4. Calibração do Equipamento**

Para a calibração interna do equipamento (efectuada de 6 em 6 meses ou sempre que se achar necessário) usaram-se padrões HACH entre <0,1 – 4000 NTU. Após efectuarmos a recta de calibração mediram-se e registaram-se os valores de turvação. Para a validação da recta de calibração do equipamento registou-se o valor do padrão comercial da HACH de 200 NTU, cujo critério de aceitação foi 200 $\pm$ 10 NTU.

## 4.2.5 Preparação de Padrões

### 4.2.5.1. Soluções Padrão de Calibração

Para a preparação da solução de formazina 4000 NTU dissolveram-se 10,0 g de hexametenotetramina em água ultra-pura e diluíram-se a 100 mL (solução A); dissolveram-se 1,0 g de sulfato de hidrazina em água ultra-pura e diluíram-se a 100 mL (solução B). Misturaram-se 5 mL da solução A e 5 mL da solução B. Esta solução foi considerada estável durante 1 mês.

Diluiu-se a solução de 4000 NTU com água ultra-pura para obter as soluções padrão compreendidas na gama de trabalho 0,2-20 NTU. Estas soluções foram estáveis durante uma semana.

Tabela 7 Soluções padrão compreendidas na gama de trabalho 0,2-20 NTU.

| Solução inicial (NTU) | Volume a pipetar para balão de 100 mL | Solução final (NTU) |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------|
| 4000                  | 1                                     | 40                  |
| 40                    | 50                                    | 20                  |
| 40                    | 25                                    | 10                  |
| 10                    | 40                                    | 4                   |
| 10                    | 20                                    | 2                   |
| 10                    | 10                                    | 1                   |
| 10                    | 8                                     | 0,8                 |
| 10                    | 6                                     | 0,6                 |
| 10                    | 4                                     | 0,4                 |
| 10                    | 2                                     | 0,2                 |

### 4.2.5.2. Soluções Padrão de Gelex

Os padrões gelex foram usados para fazer a validação de recta de calibração. Após efectuar a recta de calibração mediram-se e registaram-se também os valores de turvação em NTU, dos padrões de gelex (mediram-se 10-20 vezes de cada padrão de gelex e estabeleceu-se o valor médio de cada padrão e os critérios de aceitação média  $\pm 3 \times$  desvio padrão). Sempre que se efectuou uma nova recta, mediram-se apenas 3 vezes os padrões de gelex, no sentido de determinar o valor médio, cujo valor deveria respeitar os critérios estabelecidos anteriormente. Em cada sessão de trabalho a recta de calibração foi validada com um padrão de gelex. Quando este se

encontrava fora dos limites estabelecidos pelo critério de aceitação – média  $\pm 3$  x desvio padrão –, procedeu-se a uma nova calibração.

#### **4.2.5.3. Solução Padrão de Controlo do LQ**

Da solução padrão de turvação 4000 NTU, independente da utilizada na curva de calibração analítica, pipetaram-se 1 mL para balão de 100 mL, completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se (solução padrão de 40 NTU).

Da solução padrão turvação 40 NTU, pipetaram-se 5 mL para balão de 100 mL, completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se (solução padrão de 2 NTU).

Da solução padrão turvação 2 NTU, pipetaram-se 10 mL para balão de 100 mL, completou-se o volume com água ultra-pura e homogeneizou-se (solução padrão de 0,2 NTU).

#### **4.2.6. Recolha e Conservação da Amostra**

A amostra foi recolhida num frasco de polietileno ou vidro (volume mínimo de 100 mL). A determinação foi efectuada num período inferior a 24 horas. Para este efeito a amostra foi refrigerada a 4 °C.

#### **4.2.7. Procedimento Analítico**

A análise das amostras iniciou-se pela sua agitação. Transferiu-se, posteriormente, a amostra para uma célula de vidro de 25,0 mL e deixou-se repousar dentro do equipamento durante 5 minutos. Numa fase final efectuou-se a leitura da água em análise. Validou-se a sessão de trabalho recorrendo ao plano de controlo interno.

### **4.3. Resultados e Discussões**

#### **4.3.1 Validação do Método**

Para validar o método foi necessário fazer o (i) estudo da gama de trabalho; (ii) estudo da sensibilidade; (iii) estudo do controlo de brancos; (iv) estudo da precisão e exactidão; (v) estudo da linearidade; (vi) estudo do limite de quantificação e limite de detecção; (vii) estudo dos valores de padrão de controlo gelex 1,8 NTU; (viii) estudo dos valores de padrão de controlo gelex 18 NTU; e (ix) a incerteza associada aos resultados do método de ensaio.

### 4.3.1.1. Gama de Trabalho

A gama de trabalho foi identificada através de 10 curvas de calibração, com concentrações compreendidas entre 0,200 e 20,0 NTU. Estas calibrações foram realizadas em períodos aleatórios, tendo-se preparado as soluções padrão no próprio dia. O número de soluções padrão foi sempre igual a 9 (ver exemplo Anexo D-1).

Os resultados obtidos foram indicados na Fig. 27. Nesta figura foram fornecidos os valores de concentração em NTU obtidos para o primeiro e último padrão. Nestes valores foi aplicado o teste PG, no sentido de garantir homogeneidade de variâncias. Os resultados da análise estatística confirmaram este requisito ao apresentarem valores de F iguais a 5,12 e inferiores ao valor de PG crítico (5,35), sugerindo que a gama de trabalho estava bem ajustada.

|            | 1.º Padrão de Calibração (0,2 NTU) | Último Padrão de Calibração (20 NTU) |
|------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Data       |                                    |                                      |
| 17-03-2009 | 0,324                              | 19,0                                 |
| 18-03-2009 | 0,310                              | 19,1                                 |
| 19-03-2009 | 0,321                              | 19,0                                 |
| 28-04-2009 | 0,345                              | 19,0                                 |
| 05-05-2009 | 0,278                              | 19,1                                 |
| 07-05-2009 | 0,310                              | 19,1                                 |
| 14-05-2009 | 0,312                              | 19,1                                 |
| 21-05-2009 | 0,330                              | 19,0                                 |
| 04-06-2009 | 0,302                              | 19,0                                 |
| 02-07-2009 | 0,360                              | 19,0                                 |

Teste F: duas amostras para variâncias

|                | 20 NTU      | 0,2 NTU     |
|----------------|-------------|-------------|
| Média          | 19,04       | 0,3192      |
| Variância      | 0,00266667  | 0,000520844 |
| Observação     | 10          | 10          |
| gl             | 9           | 9           |
| F              | 5,119890776 |             |
| P(F<=f) uni-   | 0,011590309 |             |
| F crítico uni- | 5,351128861 |             |

Figura 27 Estudo da gama de trabalho.

### 4.3.1.2. Estudo da Sensibilidade

Os critérios de aceitação para o declive foram definidos a partir de rectas de calibração obtidas ao longo de uma semana, traçadas com concentrações compreendidas entre 0,200 e 20,0 NTU de turvação. Neste estudo foram também incluídos os critérios de aceitação para a ordenada na origem. Os resultados de declive e da ordenada na origem obtidos foram expressos sob a forma de média  $\pm 2$  x desvio padrão. Para comprovar estes valores foram realizados estudos das curvas de calibração de modo semanal e mensal. O estudo semanal foi realizado

consecutivamente ao longo de 5 dias úteis (Fig. 28), tendo-se obtido valores que cumpriam os critérios de aceitação, estabelecidos após o estudo diário. O estudo mensal foi efectuado com a frequência de 1 leitura por semana, até completar as 4 semanas. Os valores obtidos cumpriram, também, os critérios de aceitação definidos após o estudo diário.

Os valores do declive e da ordenada na origem obtidos foram indicados na Fig. 28. O valor médio do declive foi igual a 0,9750, associado ao desvio padrão 0,0192. O valor médio da ordenada na origem foi de 0,0923, com um desvio padrão de 0,0140.

| Data          | Declive  | Ordenada na origem |
|---------------|----------|--------------------|
| 16-03-2009    | 0,9899   | 0,1013             |
| 17-03-2009    | 0,9544   | 0,0925             |
| 18-03-2009    | 0,9557   | 0,1090             |
| 19-03-2009    | 0,9959   | 0,0857             |
| 20-03-2009    | 0,9793   | 0,0729             |
| Média         | 0,9750   | 0,0923             |
| Desvio Padrão | 1,92E-02 | 1,40E-02           |
| Média - 2x DP | 0,9366   | 0,064              |
| Média + 2x DP | 1,0134   | 0,120              |

Figura 28 Critérios de aceitação para o declive e para ordenada na origem.

#### 4.3.1.3. Estudo do Controlo de Brancos

Para fazer o estudo do controlo de brancos registaram-se os valores em NTU dos padrões “branco” em cada análise, i.e., o padrão branco de Hach (< 0,1 NTU). Após registo de 15 ensaios entendeu-se que o critério de aceitação seria média  $\pm$  2 x desvio padrão. Para a precisão e a exactidão estabeleceu-se como critério de aceitação que os valores destes tiveram que ser menores de que 10 %.

Os resultados obtidos foram indicados na Fig. 29. Esta figura contém os valores em NTU obtidos para o padrão branco. Com os valores obtidos foi calculada a média e o desvio padrão, iguais a 0,087 e 0,001 NTU, respectivamente. Para a precisão e exactidão obtiveram-se valores de 1,0 e 8,8 %.

| Turvação (NTU) |       |                     |       |
|----------------|-------|---------------------|-------|
| Nº Ensaio      |       |                     |       |
| 1              | 0,087 |                     |       |
| 2              | 0,085 |                     |       |
| 3              | 0,086 |                     |       |
| 4              | 0,087 |                     |       |
| 5              | 0,087 |                     |       |
| 6              | 0,086 |                     |       |
| 7              | 0,085 |                     |       |
| 8              | 0,086 |                     |       |
| 9              | 0,087 |                     |       |
| 10             | 0,085 |                     |       |
| 11             | 0,087 | Média - 2 x DP      | 0,085 |
| 12             | 0,085 |                     |       |
| 13             | 0,087 | Média + 2 x DP      | 0,088 |
| 14             | 0,087 |                     |       |
| 15             | 0,087 | CV (Precisão)       | 1,0%  |
| Média          | 0,087 | Desvio relativo (%) | 8,8%  |
| Desvio padrão  | 0,001 |                     |       |

Figura 29 Estudo do controle de brancos.

#### 4.3.1.4. Estudo de Precisão e Exactidão

Para estudar a precisão e a exactidão foram utilizados três padrões, de 0,200; 4,00; e 20,0 NTU. Os valores obtidos na cada análise de cada padrão foram utilizados nos cálculos do desvio padrão e do erro relativo. Os valores em NTU obtidos foram expressos sob a forma de média  $\pm$  2 x desvio padrão. Os valores utilizados neste estudo foram obtidos a partir de 10 ensaios (Fig. 30).

|                           | Padrão de 0,2 NTU | Padrão de 4 NTU | Padrão de 20 NTU |
|---------------------------|-------------------|-----------------|------------------|
| Data                      |                   |                 |                  |
| 17-03-2009                | 0,243             | 3,77            | 19,8             |
| 18-03-2009                | 0,210             | 3,91            | 19,9             |
| 19-03-2009                | 0,215             | 4,15            | 19,8             |
| 20-03-2009                | 0,219             | 4,01            | 19,9             |
| 21-04-2009                | 0,238             | 3,78            | 19,9             |
| 05-05-2009                | 0,214             | 3,49            | 19,9             |
| 07-05-2009                | 0,207             | 3,91            | 19,9             |
| 14-05-2009                | 0,192             | 4,05            | 19,8             |
| 04-06-2009                | 0,231             | 4,00            | 20,1             |
| 02-07-2009                | 0,213             | 3,97            | 19,9             |
| Média                     | 0,22              | 3,90            | 19,9             |
| Desvio Padrão             | 1,52E-02          | 0,19            | 0,07             |
| CV (Precisão)             | 7,0%              | 4,8%            | 0,4%             |
| Erro Relativo (Exactidão) | 9,1%              | 2,4%            | 0,5%             |

Figura 30 Estudo de precisão e exactidão

Para o padrão de 0,200 NTU os valores obtidos foram compreendidos entre 0,192 e 0,243 NTU. O valor médio correspondente foi igual a 0,220 NTU, associado ao desvio padrão 0,0152 NTU. O coeficiente de variação e o erro relativo correspondentes foram, respectivamente, 7,0 e 9,1 %. Os valores obtidos para o padrão de 4,00 NTU foram compreendidos entre 3,49 e 4,15 NTU, com uma média de 3,90 e um desvio padrão de 0,19 NTU. Os valores de precisão e de exactidão calculados foram iguais a 4,8 e 2,4 % respectivamente. Para o padrão de 20,0 NTU foram obtidos valores entre 19,8 e 20,1 NTU. O valor médio correspondente foi de 19,9 NTU e o desvio padrão de 0,07 NTU. Para a precisão e a exactidão foram obtidos valores de 0,4 e 0,5 %, respectivamente. Os valores de erro relativo e de coeficiente de variação obtidos para os três padrões estudados foram aceites, dado que foram sempre inferiores a 10 % (critério de aceitação).

#### 4.3.1.5. Estudo da Linearidade

O estudo da linearidade foi baseado em três curvas de calibração. Estas três curvas foram escolhidas entre aquelas traçadas para o estudo da gama de trabalho (Fig. 31).

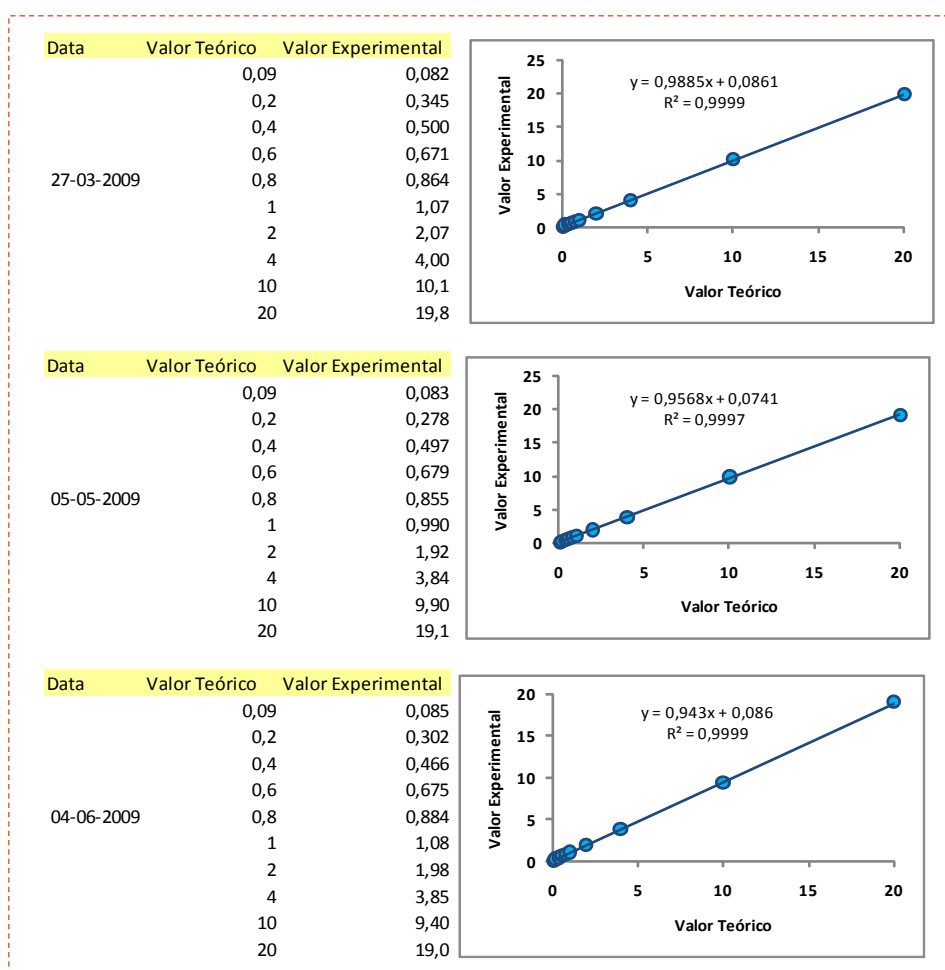


Figura 31 Estudo da linearidade.

O critério de aceitação neste estudo foi o melhor coeficiente de correlação, em que o valor escolhido foi  $> 0,9990$ . As curvas de calibração apresentaram coeficientes de correlação entre  $0,9990$  e  $0,9998$  e as calibrações escolhidas (Fig. 31) apresentaram coeficientes de correlação iguais a  $0,9996$ ;  $0,9997$  e  $0,9998$ , tendo-se aceite todas as curvas com coeficiente de correlação quadrático superior a  $0,995$ .

#### 4.3.1.6. Estudo do Limite de Quantificação

O LQ foi calculado a partir da leitura do primeiro padrão. O critério de aceitação para o LQ foi  $10 \times$  desvio padrão, tendo-se estimado inicialmente o valor de LQ a partir de 15 leituras. O valor de LD foi deduzido a partir deste, considerando-o como  $3 \times$  desvio padrão. Para confirmar os valores obtidos foi feita uma estatística de regressão aos valores registados na recta de calibração. A estatística de regressão confirmou que LQ seria  $10 \times$  o erro padrão a dividir pelo declive (variável  $x_1$ ) e que o LD seria  $3 \times$  (o erro padrão a dividir pelo declive que foi multiplicado por 10) (Fig. 32).

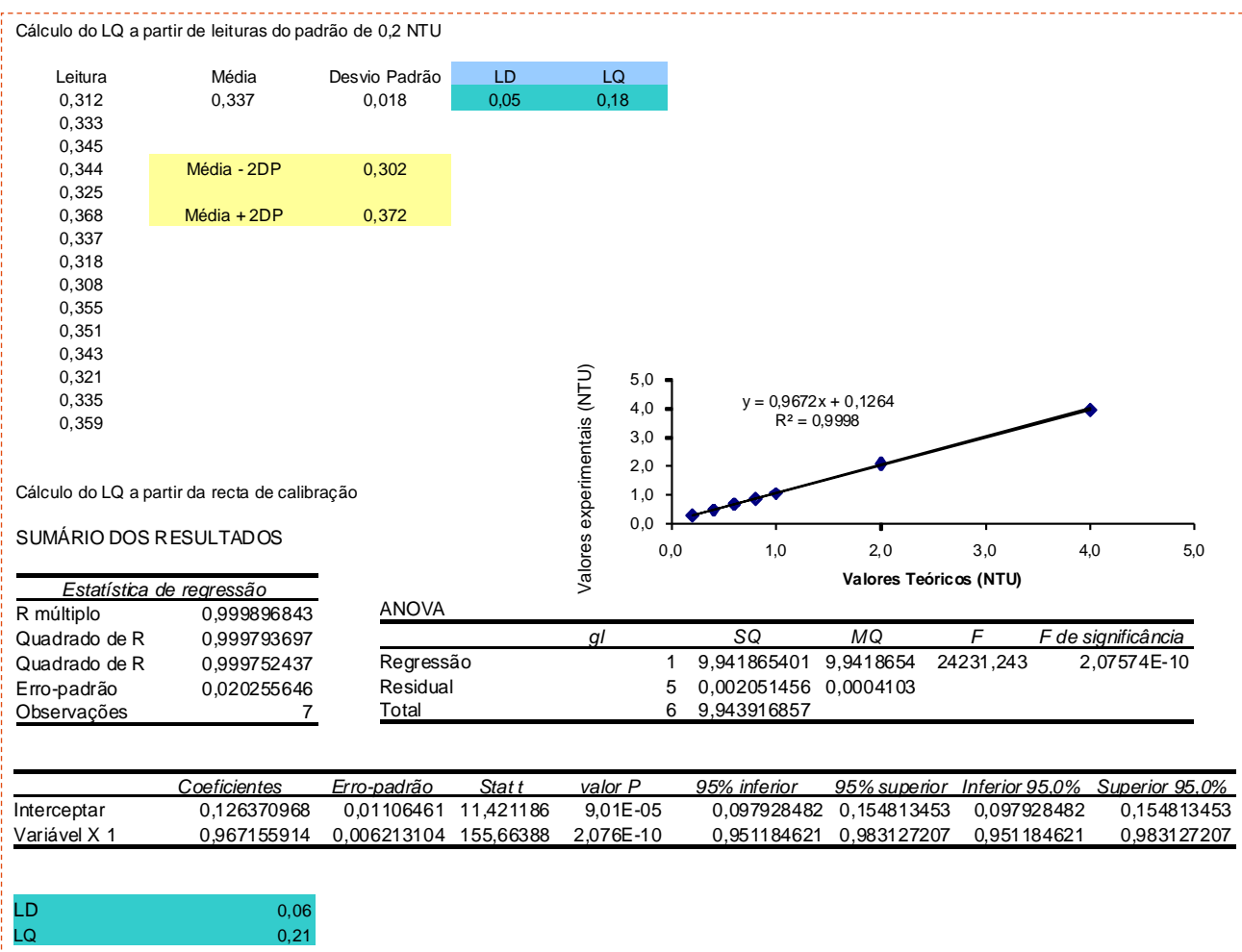


Figura 32 Estudo do limite de quantificação.

Os resultados obtidos foram indicados na Fig. 32. Esta figura apresenta os valores em NTU registados para o padrão de concentração igual a 0,2 NTU. Com estes valores foi calculado o LD, igual a 0,05 NTU; o LQ também foi calculado e foi igual a 0,18 NTU. Os valores obtidos para o LD e para o LQ, após estatística de regressão, foram de 0,06 e 0,21 NTU, respectivamente. Estes valores confirmaram, por isso, o critério de aceitação estabelecido, pelo que os valores obtidos a partir do equipamento para o LQ estavam compreendidos entre 0,302 e 0,372 NTU.

#### 4.3.1.7. Controlo dos Padrões de Gelex 1,8 NTU

Para fazer o estudo do padrão de controlo gelex 1,8 NTU foi necessário efectuar 20 leituras deste padrão após a calibração analítica. O critério de aceitação estabelecido para este padrão foi de média  $\pm 3$  x o desvio padrão.

Os valores obtidos foram indicados na Fig. 33. Com estes valores foram calculados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação. O valor de concentração assim obtido para o padrão de gelex foi igual a  $1,896 \pm 3 \times 0,018$  NTU e o coeficiente de variação igual a 0,93 %.

| Turvação (NTU) | Média | DP    | Média - 3DP | Média + 3DP | CV(%) |
|----------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|
| 1,88           | 1,896 | 0,018 | 1,843       | 1,948       | 0,93% |
| 1,87           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,92           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,88           |       |       |             |             |       |
| 1,89           |       |       |             |             |       |
| 1,88           |       |       |             |             |       |
| 1,88           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,92           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,88           |       |       |             |             |       |
| 1,88           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,88           |       |       |             |             |       |
| 1,91           |       |       |             |             |       |
| 1,87           |       |       |             |             |       |

| Critérios   |      |
|-------------|------|
| Média +3 DP | 1,95 |
| Média - 3DP | 1,84 |

Figura 33 Estudo dos valores padrão de controlo gelex 1,8 NTU.

#### 4.3.1.8. Controlo do Padrão de Gelex 18 NTU

Para fazer o estudo do padrão de controlo gelex 18 NTU foi necessário fazer 20 leituras deste padrão após a calibração analítica. O critério de aceitação estabelecido para este padrão foi de média  $\pm 3 \times$  o desvio padrão.

Os valores obtidos (Fig. 34) foram utilizados para o cálculo da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação. O padrão de concentração obtido para o padrão de gelex foi igual a  $20,4 \pm 3 \times 0,112$  NTU, associado a um coeficiente de variação de 0,55 %.

| Turvação (NTU) | Média | DP    | Média - 3DP | Média + 3DP | CV(%) |
|----------------|-------|-------|-------------|-------------|-------|
| 20,5           | 20,4  | 0,112 | 20,1        | 20,7        | 0,55% |
| 20,5           |       |       |             |             |       |
| 20,4           |       |       |             |             |       |
| 20,4           |       |       |             |             |       |
| 20,3           |       |       |             |             |       |
| 20,3           |       |       |             |             |       |
| 20,5           |       |       |             |             |       |
| 20,6           |       |       |             |             |       |
| 20,2           |       |       |             |             |       |
| 20,3           |       |       |             |             |       |
| 20,5           |       |       |             |             |       |
| 20,4           |       |       |             |             |       |
| 20,2           |       |       |             |             |       |
| 20,4           |       |       |             |             |       |
| 20,5           |       |       |             |             |       |
| 20,3           |       |       |             |             |       |
| 20,3           |       |       |             |             |       |
| 20,3           |       |       |             |             |       |
| 20,4           |       |       |             |             |       |
| 20,5           |       |       |             |             |       |

| Critérios   |      |
|-------------|------|
| Média +3 DP | 20,7 |
| Média - 3DP | 20,1 |

Figura 34 Estudo dos valores padrão de controlo gelex 18 NTU.

#### 4.3.1.9. Incerteza Associada aos Resultados do Método de Ensaio

O cálculo da incerteza associada aos resultados do método requereu a determinação prévia da incerteza associada à precisão, da incerteza associada à exactidão, do cálculo do *t*-student, da incerteza combinada, da incerteza expandida e da incerteza relativa. Para o cálculo da incerteza associada à precisão utilizamos os valores dos duplicados das amostras e para o cálculo da incerteza associada à

exactidão utilizamos os ensaios interlaboratoriais. A partir destas incertezas foram calculadas as incertezas combinada ( $u_{Comb}$ ), expandida ( $U_{exp}$ ) e relativa [19].

Os valores obtidos foram indicados na Fig. 35. O valor da incerteza associada à precisão ( $u_{PC}$ ) e à recuperação ( $u_{Rec}$ ) foi de 0,0382 e de 0,00098, respectivamente. A partir destes valores foram calculados os valores de  $u_{Comb}$ , de  $U_{exp}$  e da incerteza relativa. Os valores obtidos foram iguais a 0,0489; 0,10 e 10 %, respectivamente.

Neste sentido, os resultados obtidos após a análise de cada amostra estavam associados a um erro de 10 % do valor obtido.

### 1-Incerteza associada à precisão

Utilizamos para o estudo valores de duplicados

| Data          | x1   | x2   | (x1+x2)/2 | ABS(X1 - X2) | Ri relativo    |
|---------------|------|------|-----------|--------------|----------------|
| 17-01-08      | 1,21 | 1,18 | 1,20      | 0,03         | 0,02510        |
| 22-01-08      | 0,79 | 0,84 | 0,82      | 0,05         | 0,06135        |
| 25-01-08      | 1,76 | 1,75 | 1,76      | 0,01         | 0,00570        |
| 29-01-08      | 2,03 | 2,05 | 2,04      | 0,02         | 0,00980        |
| 11-02-08      | 0,83 | 0,82 | 0,83      | 0,01         | 0,01212        |
| 12-02-08      | 1,33 | 1,40 | 1,37      | 0,07         | 0,05128        |
| 13-02-08      | 2,34 | 2,42 | 2,38      | 0,08         | 0,03361        |
| 18-02-08      | 0,82 | 0,89 | 0,86      | 0,07         | 0,08187        |
| 25-02-08      | 1,01 | 0,97 | 0,99      | 0,04         | 0,04040        |
| 05-03-08      | 2,37 | 2,50 | 2,44      | 0,13         | 0,05339        |
| 06-03-08      | 2,05 | 2,13 | 2,44      | 0,13         | 0,05339        |
| 07-03-08      | 0,69 | 0,73 | 2,09      | 0,08         | 0,03828        |
| 10-03-08      | 1,23 | 1,17 | 0,71      | 0,04         | 0,05634        |
| 12-03-08      | 1,06 | 1,10 | 1,20      | 0,06         | 0,05000        |
| 18-03-08      | 1,80 | 1,87 | 1,08      | 0,04         | 0,03704        |
| 27-03-08      | 0,51 | 0,53 | 1,84      | 0,07         | 0,03815        |
| 08-04-08      | 0,83 | 0,78 | 0,52      | 0,02         | 0,03846        |
| 09-04-08      | 0,76 | 0,83 | 0,81      | 0,05         | 0,06211        |
| 21-04-08      | 1,17 | 1,20 | 0,80      | 0,07         | 0,08805        |
| 21-04-08      | 3,41 | 3,35 | 1,19      | 0,03         | 0,02532        |
| <b>Soma/n</b> |      |      |           |              | <b>0,04309</b> |

incerteza da precisão = s 0,038198773 valor relativo

### 2-Incerteza associada à exactidão

Utilizamos para o estudo os valores do ensaios interlaboratoriais, com base nas dispersões das recuperações

| Data    | val ref | val lab        | recuperação     | Nº Total particp | %insatisfatorio | Nº médio de lab result satisfat. | s ref | (n-1) | RSD^2    | (n-1)*RSD^2 | RSD pond   |
|---------|---------|----------------|-----------------|------------------|-----------------|----------------------------------|-------|-------|----------|-------------|------------|
| 2004-06 | 0,23    | 0,21           | 0,9130          | 64               | 0,02            | 63                               | 0,08  | 62    | 0,120983 | 7,4670699   | 0,26468531 |
| 2005-02 | 0,35    | 0,37           | 1,0571          | 58               | 0,02            | 57                               | 0,12  | 56    | 0,117551 | 6,564049    |            |
| 2006-02 | 1,3     | 1,25           | 0,9615          | 67               | 0,45            | 37                               | 0,1   | 36    | 0,005917 | 0,2121302   |            |
| 2008-05 | 0,17    | 0,16           | 0,9412          | 78               | 0,19            | 63                               | 0,02  | 62    | 0,013841 | 0,8606228   |            |
|         |         | <b>DesvPad</b> | <b>0,062524</b> |                  |                 | <b>Média</b>                     |       | 55    | 0,1      | 216         | 15,103872  |
|         |         | <b>Média</b>   | <b>0,968225</b> |                  |                 |                                  |       |       |          |             |            |

Cálculo da incerteza associada à recuperação:

$$\left( \frac{s_{R_m}}{\sqrt{n}} \right)^2 = 0,0009773$$

Figura 35 Incerteza associada aos resultados do método de ensaio.

Cálculo da incerteza associada ao valor de referência do interlaboratorial:

$$u(C_{ref}) = \frac{s'_{reproduzibilidade}}{\sqrt{n}}$$

$s_{reproduzibilidade}$  é o desvio padrão relativo ponderado  
 $n$  é o número médio de participantes

$$u(C_{ref}) = 0,035723463$$

Cálculo da incerteza associada á exactidão:

$$\frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m} = \sqrt{\left(\frac{s'_{R_m}}{\sqrt{n}}\right)^2 + \left(\frac{s'_{reproduzibilidade}}{\sqrt{n}}\right)^2}$$

$$\frac{u(\bar{R}_m)}{\bar{R}_m} = 0,04747079$$

### 3-Teste t

$$t = \frac{|1 - \bar{R}|}{u_{ref}}$$

$$t_{calcul.} = 0,6694$$

Procurar na tabela de t de Student ,para 4 (n-1) graus de liberdade e 95% de confiança o t crítico

$$t_{critico} = 2,776$$

### Incerteza Combinada ( $u_{comb}$ )

$$u_{comb} = \sqrt{u_{PC}^2 + u_{Rec}^2}$$

|            |        |
|------------|--------|
| $u_{comb}$ | 0,0489 |
|------------|--------|

### Incerteza Expandida ( $U_{exp}$ )

$$U_{exp} = K \times U_{Comb}$$

|           |      |
|-----------|------|
| $U_{exp}$ | 0,10 |
|-----------|------|

$$U_{exp} = 2 \times U_{Comb} \times C_a$$

, em que K=2 para um grau de confiança de cerca de 95% na distribuição normal de t-student  
 $C_a$  - Concentração do analito

A incerteza foi calculada de acordo com os documentos EURACHEM e o Nordtest Report

### Incerteza Relativa (%)

$$U_{Rel} = \frac{U_{exp}}{C_a} \times 100$$

|           |     |
|-----------|-----|
| $U_{Rel}$ | 10% |
|-----------|-----|

Apresentação do Resultado:

| Resultado | ± | U    |     |
|-----------|---|------|-----|
| 0,2       | ± | 0,02 | NTU |
| 0,9       | ± | 0,09 | NTU |
| 1,5       | + | 0,15 | NTU |
| 6,6       | + | 0,65 | NTU |

Figura 35 (continuação) Incerteza associada aos resultados do método de ensaio.



#### 4.3.4. Análise Técnico-Económica

Após a validação do método, considerou-se também importante avaliar os custos associados a esta metodologia. Esta informação pode contribuir para definir uma periodicidade adequada à realização desta análise.

O número de amostras que entram no laboratório para determinação da turvação é superior ao número de amostras para determinação do boro. Neste sentido, este balanço foi estimado para uma calibração com 9 padrões e para a análise de 11 amostras. O custo estimado em reagentes foi indicado na Tabela 8. O tempo consumido neste procedimento origina um gasto de cerca de cerca de 9 € com pessoal técnico. Tendo em conta apenas estes aspectos, o custo de cada amostra seria de cerca de 0,82 €. Este custo poderia decrescer pelo aumento do número de amostras em análise, mas este número depende sempre das solicitações que chegam ao laboratório.

Dando cumprimento aos requisitos de natureza ambiental, os resíduos deste trabalho são encaminhados para uma empresa apropriada, após separação selectiva. Para o procedimento considerado estimou-se a produção de cerca de 1675 mL de resíduos. O tratamento destes resíduos custaria cerca de 9 €. Neste sentido, o custo por amostra passaria a ser superior a 1,64 €.

Tal como para a determinação do boro, para este estudo não foram considerados consumos de água e de luz já que estes não apresentavam contadores separados dos restantes consumos realizados no laboratório. Os gastos gerais do edifício ou com material de laboratório corrente também não foram considerados pela ausência de valores específicos para o laboratório em causa. O custo de aquisição dos padrões de gelex, dos padrões de Hach e do turbidímetro também não foram considerados, uma vez que estes produtos já não são comercializados.

Tabela 8 Consumo de reagentes para a determinação da turvação.

| Reagentes      | Massa (g) ou Volume (mL) | Custo (€) |
|----------------|--------------------------|-----------|
| $C_6H_{12}N_4$ | 10 g                     | 0,26      |
| $N_2H_6SO_4$   | 1 g                      | 0,23      |

## 5 Conclusões e Sugestões para Trabalho Futuro

O presente trabalho conduziu à validação de dois parâmetros em águas de consumo Humano: o boro determinado por espectrofotometria de absorção molecular e a turvação por turbidimetria. A metodologia de determinação de HAPs por HPLC não foi validada, uma vez que esta se encontra em desenvolvimento para que possa dar resposta aos requisitos legais deste parâmetro em águas de consumo.

Relativamente à metodologia de determinação do boro, os resultados indicaram que se deve trabalhar numa gama de trabalho de 0,2 a 2,0 mg/L. O LQ (padrão de 0,2 mg/L) deve apresentar valores entre 0,182 e 0,224 mg/L. A calibração analítica deve apresentar valores de  $R^2$  superiores a 0,995 e o declive deve variar entre 0,5070 e 0,5945. A exactidão e a precisão foram calculadas para os padrões de 0,2; 1,0 e 2,0 mg/L. Para o primeiro padrão a exactidão foi de 0,95 % e a precisão foi de 6,22 %, para o padrão intermédio a exactidão foi de 0,31 % e a precisão foi de 2,40 % e para o último padrão os valores de exactidão e precisão foram de 0,92 e 1,32 %, respectivamente. Os valores médios dos resultados analíticos devem estar associados a um erro de 5,5 %. Em cada ensaio laboratorial, o padrão de controlo (padrão de 1,0 mg/L) deve ter valores menores do que 10 % do seu valor teórico e os duplicados da amostra não devem variar mais do que 10 %. As cartas de controlo aguardam mais amostras para que possam ser concluídas.

Relativamente à metodologia para determinação da turvação, os resultados obtidos sugeriram que a gama de trabalho corresponda ao intervalo 0,200 a 20,0 NTU. A

curva analítica deve apresentar declives entre 0,9366 e 1,0134, valores de ordenada na origem entre 0,064 e 0,120 e valores de  $R^2$  superiores a 0,995. Relativamente aos padrões, o padrão de branco tem que ser menor de 0,1 NTU e os padrões de gelex de 1,8 NTU e de 18 NTU devem variar entre 1,84 e 1,95 NTU e 20,1 e 20,7 NTU, respectivamente. O LQ (padrão de 0,2 NTU) deve ter valores entre 0,302 e 0,372 NTU. Para calcular a exactidão e a precisão foram usados os padrões de 0,200; 4,00 e 20,0 NTU. Para o primeiro padrão a exactidão e a precisão foram de 9,1 e 7,0 %, respectivamente; para o padrão intermédio a exactidão foi de 2,4 % e a precisão foi de 4,8 % e para o último padrão os valores de exactidão e precisão foram de 0,5 e 0,4 %, respectivamente. Os resultados obtidos após análise de cada amostra têm que ser associados a um erro de 10 % do valor obtido e os duplicados da amostra têm que estar compreendidos entre o LSC de 12% e o LIC de 0 %.

A análise técnico-económica para a determinação de boro e da turvação indicou, respectivamente, um custo de 18 e de 1,64 € por amostra. Esta análise carece de avaliações posteriores, que incluam vários parâmetros cuja contabilização não foi possível.

A validação das metodologias anteriores pode considerar-se uma mais-valia, para o Centro de Qualidade Hídrica do INSA. Esta validação segue, aliás, uma estratégia do laboratório, que prima pela utilização de métodos de ensaio que satisfaçam as necessidades do cliente e que sejam apropriados para os ensaios que realiza.

A introdução de métodos de ensaio desenvolvidos pelo laboratório para seu próprio uso deve, no entanto, ser uma actividade planeada. Os planos devem ser actualizados periodicamente, pelo que este é um procedimento que deve ser levado a cabo futuramente.

A metodologia da determinação dos HAPs carece, também, de desenvolvimento apropriado. Num futuro próximo seria importante estabelecer a metodologia correspondente, para cumprir os requisitos legais. Esta etapa passará, provavelmente, pela utilização de sistemas de tratamento de amostra que permitam a sua pré-concentração. Para este efeito propõe-se o uso de sistemas de extracção em fase sólida.

Outras actividades futuras poderão relacionar-se com a validação de outros parâmetros determinados no laboratório.

## 6. Bibliografia

- [1] NP EN ISO 17025:2005, “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”, 2ª edição, versão portuguesa.
- [2] Guia Relacre 13, “Validação de métodos internos de ensaio em análise química”.
- [3] Guia ISO/CEI 43, 1984, “Development and operation of laboratory proficiency testing”, International Organization for Standardization, Genève.
- [4] VIM, 2005, “Vocabulário Internacional de Metrologia – Termos Fundamentais e Gerais”, 3ª edição.
- [5] ISO 8402, 1994, “Quality management and quality assurance – Vocabulary”, International Organization for Standardization, Genève.
- [6] Guia ISO/CEI 30, 1981 “Terms and definitions used in connection with reference materials”, International Organization for Standardization, Genève.
- [7] ISO, (GUM), 1995, “Guide to the expression of uncertainty in measurement”, Geneva, Switzerland.
- [8] ISO 5725:1994 (Parts 1 - 6), “Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results”
- [9] ISO, 1993, “International vocabulary of basic and general terms in metrology”, Geneva, Switzerland.

- [10] Mendes, B, Oliveira, JFS, 2008, "Qualidade da água para consumo humano", Lidel, pp 154-158, 297-301 e 479-484.
- [11] Gonçalves, ML, 1996, "Métodos Instrumentais para Análise de Soluções", Fundação Calouste Gulbenkian, 3ª edição.
- [12] Krejcová, A, Cernohorsky, T, 2003, "The determination of boron in tea and coffee by ICP–AES method", Food Chemistry 82, pp 303-308.
- [13] Economou, A, Themelis, DG, Bikou,H, Tzanavaras PD, Rigas, PG, 2004, "Determination of boron in water and pharmaceuticals by sequential-injection analysis and fluorimetric detection", Analytica Chimica Acta 510, pp 219-224.
- [14] Seyhan, S, Seki, Y, Yurdakoc, M, Merdivan, M, 2007, "Application of iron-rich natural clays in C<sub>3</sub> amlica, Turkey for boron sorption from water and its determination by fluorimetric-azomethine-H method", Journal of Hazardous Materials 146, pp 180-185.
- [15] Thangavel, S, Dhavile, SM, Dash, K, Chaurasia, SC, 2004, "Spectrophotometric determination of boron in complex matrices by isothermal distillation of borate ester into curcumin", Analytica Chimica Acta 502, pp 265-270.
- [16] Sahin, I, Nakiboglu, N, 2006, "Voltammetric determination of boron by using Alizarin Red S", Analytica Chimica Acta 572, pp 253-258.
- [17] García, IL, Vinas, P, Romero, RR, Córdoba, MH, 2009, "Preconcentration and determination of boron in milk, infant formula, and honey samples by solid phase extraction-electrothermal atomic absorption spectrometry", Spectrochimica Acta Part B 64, pp 179-183.
- [18] Rodier, J, Brazin, C, Broutin, JP, Chambon, P, Champsour, H, Rodi, L, 1996, "L'analyse de L'eau – eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer", Dunod, Cap.4 pp 67-79 e Cap. 9 pp 178-179.
- [19] Magnusson, B, Näykki, T, Hovind, H, Krysell, M, 2004, " Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories", Nordtest, Edition 2, pp 1-41.
- [20] [http://pt.wikipedia.org/wiki/Hidrocarbonetos\\_Arom%C3%Alticos\\_-Polic%C3%ADclicos](http://pt.wikipedia.org/wiki/Hidrocarbonetos_Arom%C3%Alticos_-Polic%C3%ADclicos), acedido a 31 de Outubro de 2008.
- [21] Xu, H, Ding, Z, Lili, LV, Song, D, Feng, YQ, 2009, "A novel dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples", Analytica Chimica Acta 636, pp 28-33.

- [22] Wang, H, Yu, S, Campiglia, AD, 2009, "Solid-phase nano-extraction and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples", *Analytical Biochemistry* 385, pp 249-256.
- [23] Brum, DM, Netto, ADP, 2009, "Polycyclic aromatic hydrocarbons in Tripuí River, Ouro Preto, MG, Brazil", *Journal of Hazardous Materials* 165, pp 447-453.
- [24] Wang, WD, Huang, YM, Shu, WQ, Cao, J, 2007, "Multiwalled carbon nanotubes as adsorbents of solid-phase extraction for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters coupled with high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A* 1173, pp 27-36.
- [25] Brum, DM, Cassella, RJ, Netto, ADP, 2008, "Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection", *Talanta* 74, pp 1392-1399.
- [26] Oliferova, L, Statkus, M, Tsysin, G, Shpigun, O, Zolotov, Y, 2005, "On-line solid-phase extraction and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using fluorocarbon polymer sorbents", *Analytica Chimica Acta* 538, pp 35-40.
- [27] Liang, HD, Han, DM, Yan, XP, 2006, "Cigarette filter as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water", *Journal of Chromatography A* 1103, pp 9-14.
- [28] Falcón, GMS, Grande, BC, Gándara, JS, 2004, "Stirring bar sorptive extraction in the determination of PAHs in drinking waters", *Water Research* 38, pp 1679-1684.
- [29] Popp, P, Bauer, C, Wennrich, L, 2001, "Application of stir bar sorptive extraction in combination with column liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples", *Analytica Chimica Acta* 436, pp 1-9.
- [30] Liu, Y, Li, H, Lin, JM, 2009, "Magnetic solid-phase extraction based on octadecyl functionalization of monodisperse magnetic ferrite microspheres for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples coupled with gas chromatography-mass spectrometry", *Talanta* 77, pp 1037-1042.

- [31] Tavakoli, L, Yamini, Y, Ebrahimzadeh, H, Shariati, S, 2008, "Homogeneous liquid–liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system", *Journal of Chromatography A* 1196-1197, pp 133-138.
- [32] Rodil, R, Schellin, M, Popp, P, 2007, "Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and beverages using membrane-assisted solvent extraction in combination with large volume injection–gas chromatography–mass spectrometric detection", *Journal of Chromatography A* 1163, pp 288-297.
- [33] González, VF, Grana, EC, Lorenzo, SM, Mahía, PL, Rodríguez, DP, 2007, "Solid-phase microextraction–gas chromatographic–tandem mass spectrometric analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons Towards the European Union water directive 2006/0129 EC", *Journal of Chromatography A* 1176, pp 48-56.
- [34] Liu, Y, Hashi, Y, Lin, JM, 2007, "Continuous-flow microextraction and gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in water", *Analytica Chimica Acta* 585, pp 294-299.
- [35] Hsieh, YN, Huang, PC, Sun, IW, Whang, TJ, Hsu, CY, Huang, HH, Kuei, CH, 2006, "Nafion membrane-supported ionic liquid–solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples", *Analytica Chimica Acta* 557, pp 321-328.
- [36] Rezaee, M, Assadi, Y, Hosseini, MRM, Aghaee, E, Ahmadi, F, Berijani, S, 2006, "Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction", *Journal of Chromatography A* 1116, pp 1-9.
- [37] Beqqali, AE, Kussac, A, Rehim, MA, 2006, "Fast and sensitive environmental analysis utilizing microextraction in packed syringe online with gas chromatography–mass spectrometry. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water", *Journal of Chromatography A* 1114, pp 234-238.
- [38] King, AJ, Readman, JW, Zhou, JL, 2004, "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta* 523, pp 259-267.
- [39] Mohammadi, A, Yamini, Y, Alizadeh, N, 2005, "Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Journal of Chromatography A* 1063, pp 1-8.

- [40] Feizabadi, SS, Yamini, Y, Bahramifar, N, 2003, "Headspace solvent microextraction and gas chromatographic determination of some polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples", *Analytica Chimica Acta* 489, pp 21-31.
- [41] Saitoh, T, Itoh, H, Hiraide, M, 2009, "Admicelle-enhanced synchronous fluorescence spectrometry for the selective determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water", *Talanta*.
- [42] Castillo, AS, Sánchez, JFF, Carretero, AS, Gutiérrez, AF, 2005, "Solid-surface phosphorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons and selective determination of benzo(a)pyrene in water samples", *Analytica Chimica Acta* 550, pp 53-60.
- [43] Lai, JP, Niessner, R, Knopp, D, 2004, "Benzo[a]pyrene imprinted polymers: synthesis, characterization and SPE application in water coffee samples", *Analytica Chimica Acta* 522, pp 137-144.
- [44] Chaâbane, M, Masmoudi, M, Medhioub, K, 2004, "Determination of Linke turbidity factor from solar radiation measurement in northern Tunisia", *Renewable Energy* 29, pp 2065-2076.
- [45] Ciffroy, P, Reyss, JL, Siclet, F, 2003, "Determination of the residence time of suspended particles in the turbidity maximum of the Loire estuary by  $^7\text{Be}$  analysis", *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 57, pp 553-568.
- [46] Gueymard, C, Vignola, F, 1998, "Determination of atmospheric turbidity from the diffuse-beam broadband irradiance ratio", *Solar Energy* 63, pp 135-146.
- [47] Jalava, JP, Taavitsainen, VM, Haario, H, Lamberg, L, 1998, "Determination of particle and crystal size distribution from turbidity Spectrum of  $\text{TiO}_2$  pigments by means of t-matrix", *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer* 60, pp 399-409.
- [48] NP EN ISO 9001:2000, "Sistemas de Gestão da Qualidade", 2ª edição, versão portuguesa.
- [49] NP EN ISO 45020: 2001, "Termos gerais e suas definições respeitantes à normalização e actividades correlacionadas".
- [50] Guia LAB/G03, 1995, "Guia para a aceitação de métodos de ensaio internos em laboratórios de ensaio". Instituto Português da Qualidade, Lisboa.



Anexos



# Anexo A

---

*Aspectos Gerais*

## Anexo A-1

### Definições Utilizadas

**Ensaio** Determinação de uma ou mais características de acordo com um procedimento [48].

**Método de Ensaio:** Procedimento técnico definido para a realização de um ensaio [49].

**Método Normalizado:** Método de ensaio que segue o indicado numa norma de ensaio ou documento normativo equivalente. Assume-se que, estes métodos foram devidamente validados, estão sujeitos a actualização periódica, e são reconhecidos pela comunidade laboratorial nacional ou internacional [50]. Incluem-se neste tipo de métodos, métodos internacionalmente reconhecidos, tais como os Standard Methods, para os quais devem ser verificados os parâmetros fundamentais de validação, nas condições de execução e para os fins específicos de cada laboratório, de forma a evidenciar a fiabilidade dos resultados obtidos.

**Método Interno:** Método de ensaio que não segue uma norma de ensaio (nacional ou internacional) ou documento normativo equivalente. Excluem-se desta situação as traduções e as reformatações (sem alteração do conteúdo técnico) de normas existentes [49]. Incluem-se nesta definição, os métodos adaptados/modificados, cujo conteúdo técnico deriva de Normas, mas que não segue as mesmas na íntegra.

**Norma de Ensaio:** Norma que define métodos de ensaio, por vezes acompanhadas de outras disposições respeitantes ao ensaio, tais como a amostragem, utilização de métodos estatísticos e sequência de ensaios [49].

**Norma:** Documento, estabelecido por consenso e aprovado por um organismo de normalização reconhecido, que define regras, linhas de orientação ou características para actividades ou seus resultados, destinadas à utilização comum e repetida, visando atingir um grau óptimo de ordem, num dado contexto [49].

**Documento Normativo:** Documento que define as regras, linhas orientadoras ou características para actividades ou seus resultados. Incluem-se nesta definição, normas, definições técnica, códigos de boa prática e regulamento [49].

**Organismo reconhecido:** Organismo de normalização ou outra organização com reconhecida credibilidade internacional no sector técnico em causa.

## Anexo A-1 (Continuação)

**Material de Referência (MR):** Material ou substância com uma ou mais propriedades suficientemente bem estabelecidas para serem usadas na calibração de aparelhos, avaliação de métodos de análise ou atribuição de valores e materiais [6]. Englobam-se nesta definição quer os padrões (químicos ou físicos) preparados pelo laboratório, quer os reagentes/padrões produzidos pelas firmas comerciais.

**Material de Referência Certificado (MRC):** Material de Referência em que os valores de uma ou mais propriedades forma certificados por um processo tecnicamente válido, e que é acompanhado de um certificado (ou outro documento) emitido por um organismo de certificação [6]. Os MRC distinguem-se dos MR por serem geralmente preparados por entidades oficiais, e certificados através de ensaios interlaboratoriais e/ou com várias técnicas analíticas, sendo atribuído a cada parâmetro um valor certificado (que se assume como um valor convencionalmente verdadeiro) e respectiva incerteza.

**Ensaio Interlaboratorial:** Organização, realização e avaliação de ensaios da mesma amostra (ou similares) ou material por dois ou mais Laboratórios diferentes, de acordo com as condições previamente definidas [3].

**Incerteza padrão:** é a incerteza do resultado de uma medida expressa como um desvio padrão.

**Incerteza do tipo A:** é uma incerteza padrão, calculada a partir da análise estatística de uma série de observações.

**Incerteza do tipo B:** quando a incerteza padrão é calculada a partir de outros processos que não o anterior. (Ex.: leitura)

**Incerteza padrão combinada:** é a incerteza padrão do resultado de uma medida, quando esse resultado é obtido a partir dos valores de outras grandezas. Dependerá das incertezas padrão das outras grandezas envolvidas.

**Incerteza expandida:** é uma quantidade que define o intervalo em torno do resultado da medida, dentro do qual se terá os valores que poderão ser razoavelmente atribuídos à grandeza, com um determinado nível de confiança.



# Anexo B

---

*Determinação do Boro*

## Anexo B-1

### Curva de calibração e análise de amostras.

#### Software Information

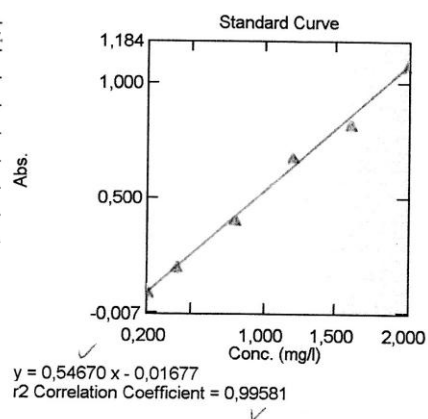
Software Name: UVPProbe  
Version: 2.00  
Mode: Normal Mode

#### Data Information

Filename: C:\Documents and Settings\CQH\Ambiente de trabalho\Shimadzu\curvas\Boro\2008\Boro\_20\_03\_2009.pho  
Title:  
Analyst:  
Date/Time: 20-03-2009 15:27:19  
Comments:

Standard Table

|   | Sample ID | Type     | Ex | Conc  | WL420,0 | Wgt. |
|---|-----------|----------|----|-------|---------|------|
| 1 | P1        | Standard |    | 0,200 | 0,098   |      |
| 2 | P2        | Standard |    | 0,400 | 0,196   |      |
| 3 | P3        | Standard |    | 0,800 | 0,403   |      |
| 4 | P4        | Standard |    | 1,200 | 0,680   |      |
| 5 | P5        | Standard |    | 1,600 | 0,827   |      |
| 6 | P6        | Standard |    | 2,000 | 1,084   |      |
| 7 |           |          |    |       |         |      |



Sample Table

|    | Sample ID | Type    | Ex | Conc  | WL420,0 | Comments |
|----|-----------|---------|----|-------|---------|----------|
| 1  | Branco    | Unknown |    | 0,000 | -0,017  |          |
| 2  | LQ        | Unknown |    | 0,199 | 0,092   |          |
| 3  | PC        | Unknown |    | 0,929 | 0,491   |          |
| 4  | 1357      | Unknown |    | 0,016 | -0,008  |          |
| 5  | 1357 dup  | Unknown |    | 0,018 | -0,007  |          |
| 6  | 1357 rec  | Unknown |    | 0,980 | 0,519   | 98%      |
| 7  | 1639      | Unknown |    | 0,017 | -0,008  |          |
| 8  | 1639 dup  | Unknown |    | 0,032 | 0,001   |          |
| 9  | 1247 a    | Unknown |    | 0,205 | 0,095   |          |
| 10 | 1247 b    | Unknown |    | 0,195 | 0,090   |          |
| 11 | 1247 c    | Unknown |    | 0,194 | 0,089   |          |
| 12 | PC 1      | Unknown |    | 0,997 | 0,528   |          |
| 13 |           |         |    |       |         |          |

Figura 1 Curva de calibração e análise de amostras.

## Anexo B-2

### Plano de controlo interno da qualidade.

Tabela 1 Plano de controlo interno da qualidade.

| Controlo Interno   | Frequência   |
|--|--|
| Calibração analítica.  | Em cada sessão de trabalho.  |
| Controlo do declive da curva de calibração.<br>(Inspeção visual).  | Sempre que se faz a curva de calibração.<br>C.A: 0,5070-0,5945   |
| Controlo do coeficiente de correlação da curva de calibração.<br>(Inspeção visual).                        | Sempre que se faz curva de calibração.<br>$R^2 \geq 0,995$   |
| Controlo da concentração do padrão de controlo intermédio (1 mg/L) independente dos padrões de calibração. | Em cada sessão de trabalho de 10 em 10 amostras, ou no fim sempre que o número de amostras é inferior a 10.<br>C.A: 10 % do valor teórico.                   |
| Duplicados de amostras.  | Em cada sessão de trabalho de 20 em 20 amostras, ou no fim sempre que o número de amostras é inferior a 20.<br>C.A: amplitude de 10 % entre os dois valores. |
| Ensaio de recuperação.   | Um em cada sessão de trabalho.<br>C.A: 80-120%   |
| Controlo do limite de quantificação independente do padrão de calibração.<br>(Inspeção visual)             | Um em cada sessão de trabalho.<br>C.A: 0,182-0,224 mg/L  |
| Controlo de brancos.<br>(Inferior ao limite de deteção)  | Um em cada sessão de trabalho.   |



# Anexo C

---

*Determinação de HAPs*

## Anexo C-1

### Informações sobre as condições do método.

#### ==== Shimadzu LCsolution Method File Infomation ====

Method File Name : C:\LabSolutions\Data\Setembro\_08\Método\_20 min\_Set\_08.lcm

##### <<System Controller>>

SCL Type : CBM-20Alite  
Event1 : OFF  
Event2 : OFF

##### <<Data Acquisition>>

LC Stop Time : 20.00 min  
--Detector A--  
Name : Detector A  
Sampling Frequency : 2 Hz  
Start Time : 0.00 min  
End Time : 20.00 min

##### <<Pump>>

Pump Mode : Low pressure gradient  
Pump A : LC-20AT  
Pump B : Not Used  
Pump C : Not Used  
Pump D : Not Used  
Total Flow : 1.000 mL/min  
B.Conc : 40.0 %  
C.Conc : 0.0 %  
D.Conc : 0.0 %  
B.Curve : 0  
C.Curve : 0  
D.Curve : 0  
PumpA PressMax : 10.0 MPa  
PumpA PressMin : 0.0 MPa  
LPGE Mode : Auto

##### <<Oven>>

Oven : CTO-20A  
Use Oven : Use  
Temperature : 30 C  
T.Max : 85 C

##### <<Detector A>>

Model : RF-10AXL  
Response : 1.5 sec  
Excitation Wavelength : 290 nm  
Emission Wavelength : 505 nm  
Gain : x4  
Sensitivity : Medium  
Recorder Range : 1

##### <<LC Program>>

| Time  | Unit       | Command | Value | Comment |
|-------|------------|---------|-------|---------|
| 0.01  | Pumps      | B.Conc  | 40    |         |
| 5.00  | Pumps      | B.Conc  | 100   |         |
| 16.00 | Pumps      | B.Conc  | 100   |         |
| 18.00 | Pumps      | B.Conc  | 40    |         |
| 20.00 | Controller | Stop    |       |         |

##### <<Peak Integration>>

##### <Detector A>

Channel : Ch1 505nm  
Width : 5 sec  
Slope : 1000 uV/min  
Drift : 0 uV/min  
T.DBL : 1000 min  
Max Slices : 0

Figura 2 Condições do método.

## Anexo C-1 (Continuação)

Min Area/Height : 10000 counts  
Calculated By : Area

<<Integration Time Program>>

<Detector A>  
Channel : Ch1 505nm  
None

<<Integration Time Program(Data)>>

<Detector A>  
Channel : Ch1 505nm  
None

<<Identification>>

<Detector A>  
Method : Window  
Window : 5.00 %  
Ident Peak : Closest Peak  
Correction RT : None

<<Quantitative>>

<Detector A>  
Method : External Standard  
Calculated by : Area  
Calibration Levels : 8  
Curve Fit Type : Linear  
Zero : Not Forced  
Weighting Method : None  
X Axis of Calibration Curve : Area/Height  
Units : mg/L  
Format of Concentration Mode : Decimals  
Format of Concentration Figure : 5  
Group Type : Not Used

<<Compound Table>>

<Detector A>

-- ID# 1 --  
Name : Benzo b  
Type : Target  
RTTime : 11.600 min  
Conc : [1]=0.1 [2]=0.5 [3]=1  
[4]=5 [5]=10 [6]=15  
[7]=20 [8]=25  
Ident Peak : Default(Closest Peak)  
Calc. by : Default(Area)  
Curve Fit Type : Default(Linear)  
Zero : Default(Not Forced)  
Weight : Default(None)  
Window/Band : Default(Window)  
Additive : 0.000

-- ID# 2 --  
Name : Benzo K  
Type : Target  
RTTime : 12.050 min  
Conc : [1]=0.1 [2]=0.5 [3]=1  
[4]=5 [5]=10 [6]=15  
[7]=20 [8]=25  
Ident Peak : Default(Closest Peak)  
Calc. by : Default(Area)  
Curve Fit Type : Default(Linear)  
Zero : Default(Not Forced)  
Weight : Default(None)  
Window/Band : Default(Window)  
Additive : 0.000

-- ID# 3 --  
Name : benzopireno

Figura 2 (Continuação) Condições do método.

## Anexo C-1 (Continuação)

Type : Target  
RTime : 14.900 min  
Conc : [1]=0.1 [2]=0.5 [3]=1  
[4]=5 [5]=10 [6]=15  
[7]=20 [8]=25  
Ident Peak : Default(Closest Peak)  
Calc. by : Default(Area)  
Curve Fit Type : Default(Linear)  
Zero : Default(Not Forced)  
Weight : Default(None)  
Window/Band : Default(Window)  
Additive : 0.000  
-- ID# 4 --  
Name : Indeno  
Type : Target  
RTime : 15.300 min  
Conc : [1]=0.1 [2]=0.5 [3]=1  
[4]=5 [5]=10 [6]=15  
[7]=20 [8]=25  
Ident Peak : Default(Closest Peak)  
Calc. by : Default(Area)  
Curve Fit Type : Default(Linear)  
Zero : Default(Not Forced)  
Weight : Default(None)  
Window/Band : Default(Window)  
Additive : 0.000  
<<Group Table>>  
<Detector A>  
<<Column Performance>>  
<Detector A>  
Calc. Method : USP  
Unretained Peak : Time at 1st Peak  
Column Length : 150 mm  
Calculated by Identified Peak only : OFF

Figura 2 (Continuação) Condições do método.

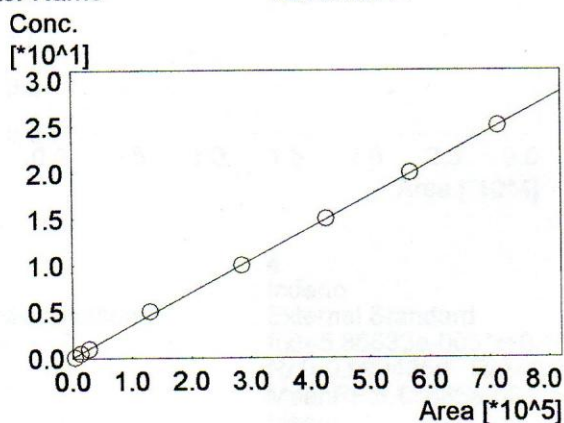
Anexo C-2

Curvas de calibração.

==== Shimadzu LCsolution Calibration Curve ====

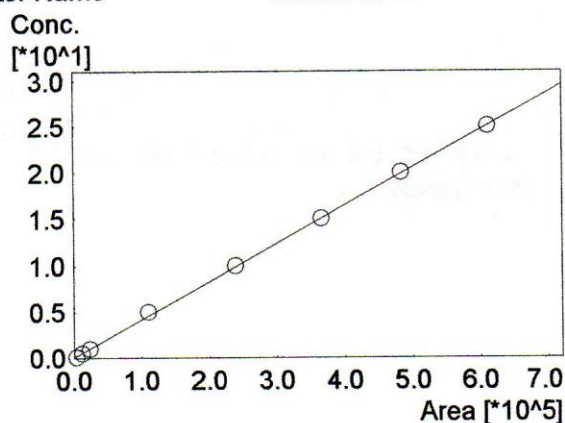
<Calibration Curve>

ID# : 1  
 Name : Benzo b  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=3.49223e-005*x+0.0734044$   
 Rr1=0.9998716 Rr2=0.9997431  
 MeanRF:3.35421e-005 RFSD:5.68004e-006 RFRSD:16.9341  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A



| # | Conc (Ratio) | Area     | Area   |
|---|--------------|----------|--------|
| 1 | 0.100        | 5060.9   | 5061   |
| 2 | 0.500        | 14524.4  | 14524  |
| 3 | 1.000        | 27877.5  | 27877  |
| 4 | 5.000        | 131347.6 | 131348 |
| 5 | 10.000       | 285505.5 | 285506 |
| 6 | 15.000       | 426863.6 | 426864 |
| 7 | 20.000       | 568614.1 | 568614 |
| 8 | 25.000       | 716831.5 | 716831 |

ID# : 2  
 Name : Benzo K  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=4.09397e-005*x+0.0993723$   
 Rr1=0.9998289 Rr2=0.9996579  
 MeanRF:3.95546e-005 RFSD:6.35293e-006 RFRSD:16.0612  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A

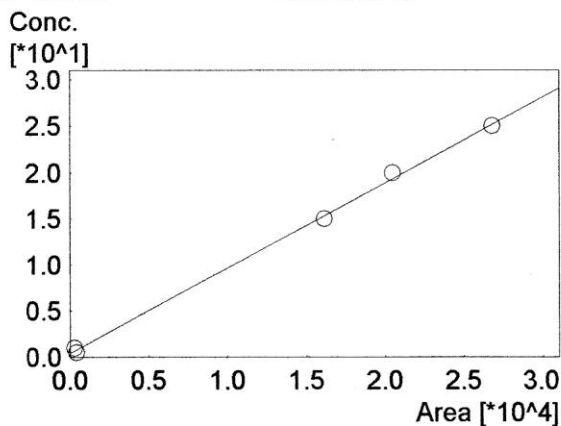


| # | Conc (Ratio) | Area     | Area   |
|---|--------------|----------|--------|
| 1 | 0.100        | 4115.0   | 4115   |
| 2 | 0.500        | 12519.1  | 12519  |
| 3 | 1.000        | 23780.6  | 23781  |
| 4 | 5.000        | 110640.1 | 110640 |
| 5 | 10.000       | 239926.9 | 239927 |
| 6 | 15.000       | 365482.6 | 365483 |
| 7 | 20.000       | 483746.9 | 483747 |
| 8 | 25.000       | 611412.8 | 611413 |

Figura 3 Curva de calibração do benzo(b)fluranteno e do benzo(k)fluranteno.

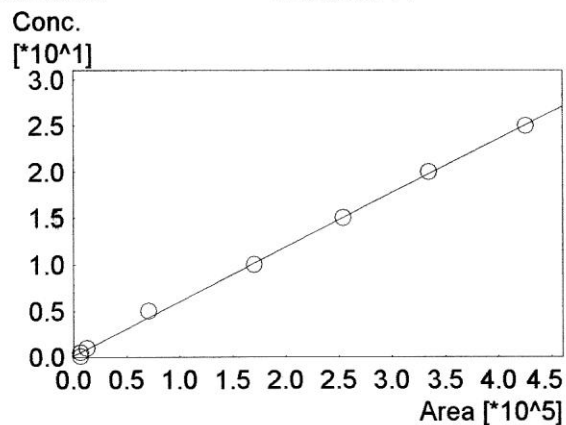
## Anexo C-2 (Continuação)

Name : benzopireno  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=0.000925909*x+0.428043$   
 Rr1=0.9992543 Rr2=0.9985092  
 MeanRF:0.0015166 RFSD:0.00112797 RFRSD:74.3752  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A



| # | Conc (Ratio) | Area    | Area  |
|---|--------------|---------|-------|
| 2 | 0.500        | 409.5   | 409   |
| 3 | 1.000        | 283.9   | 284   |
| 6 | 15.000       | 16129.8 | 16130 |
| 7 | 20.000       | 20490.8 | 20491 |
| 8 | 25.000       | 26795.8 | 26796 |

ID# : 4  
 Name : Indeno  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=5.86633e-005*x+0.16387$   
 Rr1=0.9994356 Rr2=0.9988714  
 MeanRF:5.85685e-005 RFSD:1.89221e-005 RFRSD:32.3077  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 WeightedRegression : None  
 Detector Name : Detector A



| # | Conc (Ratio) | Area     | Area   |
|---|--------------|----------|--------|
| 1 | 0.100        | 6653.1   | 6653   |
| 2 | 0.500        | 7101.7   | 7102   |
| 3 | 1.000        | 12987.4  | 12987  |
| 4 | 5.000        | 71486.3  | 71486  |
| 5 | 10.000       | 170281.8 | 170282 |
| 6 | 15.000       | 254259.4 | 254259 |
| 7 | 20.000       | 334670.4 | 334670 |
| 8 | 25.000       | 425968.7 | 425969 |

Figura 4 Curva de calibração do benzo(ghi)perileno e do indeno.

# Anexo D

---

*Determinação da turvação*

## Anexo D-1

### Curva de calibração e análise de amostras.

|              | Branco | 0,2   | 0,4   | 0,6   | 0,8   | 1     | 2    | 4    | 10   | 20   | Padrão HACH 200 NTU |
|--------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|---------------------|
|              | 0,085  | 0,302 | 0,466 | 0,675 | 0,884 | 1,08  | 1,98 | 3,85 | 9,35 | 19,0 | 198                 |
| <b>Média</b> | 0,085  | 0,302 | 0,466 | 0,675 | 0,884 | 1,080 | 1,98 | 3,85 | 9,35 | 19,0 | 198                 |
|              |        |       |       |       |       |       |      |      |      |      | Er (%) 1,0%         |

| Téorico | Experimental |
|---------|--------------|
| 0,09    | 0,085        |
| 0,2     | 0,302        |
| 0,4     | 0,466        |
| 0,6     | 0,675        |
| 0,8     | 0,884        |
| 1       | 1,08         |
| 2       | 1,98         |
| 4       | 3,85         |
| 10      | 9,4          |
| 20      | 19,0         |

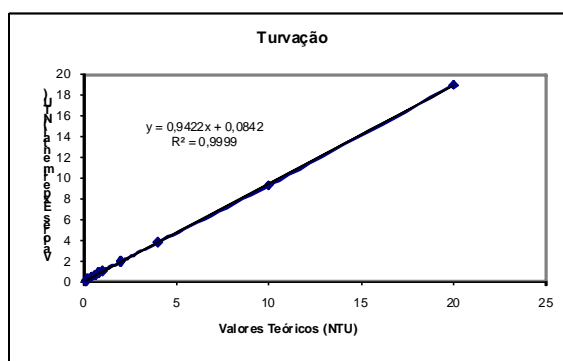


Figura 5 Curva de calibração para a turvação.

## Anexo D-1 (continuação)



Laboratório de Química e Toxicologia - Porto

### Resultados

$$\text{Equação da recta } Y = 0,9422x + 0,0842$$

$$R^2 = 0,9999$$

| Data       | Amostra  | Valor Equipamento | Valor na recta | Padrões de Gelex | Padrões de Gelex |
|------------|----------|-------------------|----------------|------------------|------------------|
| 02-03-2009 | 1211     | 0,685             | 0,638          | 1,91             | 20,6             |
|            | 1211 Dup | 0,623             | 0,572          | 1,91             | 20,6             |
|            | 1212     | 0,149             | 0,069          | 1,89             | 20,5             |
|            | 1212 Dup | 0,158             | 0,078          |                  |                  |
|            | 1215     | 0,533             | 0,476          |                  |                  |
|            | 1215 Dup | 0,522             | 0,465          |                  |                  |
|            | 1216     | 7,390             | 7,754          |                  |                  |
|            | 1216 Dup | 7,810             | 8,200          |                  |                  |
|            | 1224     | 1,280             | 1,269          |                  |                  |
|            | 1225     | 0,469             | 0,408          |                  |                  |
|            | 1226     | 0,202             | 0,125          |                  |                  |
|            | 1228     | 0,231             | 0,156          |                  |                  |
|            | 1229     | 0,106             | 0,023          |                  |                  |
|            | 1230     | 0,235             | 0,160          |                  |                  |
|            | 1231     | 0,162             | 0,083          |                  |                  |
|            | 1232     | 0,170             | 0,091          |                  |                  |
|            | 1233     | 0,155             | 0,075          |                  |                  |
|            | 1234     | 0,170             | 0,091          |                  |                  |
|            | 1235     | 0,223             | 0,147          |                  |                  |
|            | 1236     | 0,201             | 0,124          |                  |                  |
|            | 1237     | 0,213             | 0,137          |                  |                  |
|            | 1238     | 0,171             | 0,092          |                  |                  |
|            | 1239     | 0,359             | 0,292          |                  |                  |
|            | 1240     | 0,244             | 0,170          |                  |                  |
|            | 1246     | 0,845             | 0,807          |                  |                  |
|            | 1152     | 0,364             | 0,297          |                  |                  |
|            | 1153     | 0,281             | 0,209          |                  |                  |
|            | 1154     | 0,302             | 0,231          |                  |                  |
|            | LQ       | 0,335             | 0,266          |                  |                  |
|            | 1248     | 0,215             | 0,139          | 1,89             |                  |
|            | 1249     | 1,970             | 2,001          | 1,89             |                  |
|            | 1250     | 0,818             | 0,779          | 1,89             |                  |
| 1251       | 2,240    | 2,288             |                |                  |                  |
| 1252       | 0,318    | 0,248             |                |                  |                  |
| 1255       | 0,227    | 0,152             |                |                  |                  |
| 03-03-2009 | 1259     | 0,202             | 0,125          |                  |                  |
| 1260       | 0,308    | 0,238             |                |                  |                  |
| 1261       | 0,118    | 0,036             |                |                  |                  |
| 1262       | 0,235    | 0,160             |                |                  |                  |
| 1269       | 0,138    | 0,057             |                |                  |                  |
| 1270       | 0,503    | 0,444             |                |                  |                  |
| 1270 Dup   | 0,467    | 0,406             |                |                  |                  |
| 1272       | 0,283    | 0,211             | 1,91           |                  |                  |
| 1273       | 0,485    | 0,425             | 1,91           |                  |                  |
| 1276       | 0,173    | 0,094             | 1,91           |                  |                  |
| 1277       | 0,255    | 0,181             |                |                  |                  |
| 04-03-2009 | 1278     | 0,451             | 0,389          |                  |                  |
| 1279       | 0,398    | 0,333             |                |                  |                  |

Figura 6 Análise de amostras.

## Anexo D-2

### Plano de controlo interno da qualidade.

Tabela 2 Plano de controlo interno da qualidade.

| Controlo Interno   | Frequência  |
|--|---|
| Calibração do equipamento  | Anual ou quando se revelar necessário (manutenção do equipamento).  |
| Validação da curva de calibração do equipamento com o padrão de 200 NTU.   | Após calibração do equipamento. (C.A.: $\pm 10$ NTU).   |
| Calibração analítica   | Conforme estudo de estabilidade. (C.A: $R^2 \geq 0,995$ e declive: $0,9366 - 1,0134$ )  |
| Verificação de curva de calibração armazenada: (i) 1º padrão – 10% do valor teórico; (ii) último padrão – 5% do valor teórico. | Sempre que se utiliza uma curva armazenada.   |
| Padrão de controlo gelex 1,8 e 18 NTU para verificação da calibração analítica.  | Sempre que se efectuar nova recta, mede-se 3 vezes.. (C.A: média $\pm 3$ x desvio padrão)   |
| Controlo do branco   | No início de cada sessão de trabalho. (C.A: $<0,1$ NTU)   |
| Padrão controlo do limite de quantificação de formazina (0,2 NTU)  | Semanalmente. (C.A: $0,302 - 0,372$ NTU)  |
| Padrão de controlo gelex 1,8 e 18 NTU.   | Em cada sessão de trabalho. (C.A: média $\pm 3DP$ )   |
| Duplicados de amostra.   | Em cada sessão de trabalho de 20 em 20 amostras, ou no fim sempre que o número de amostras é inferior a 20. (Registo: anotação em carta). |