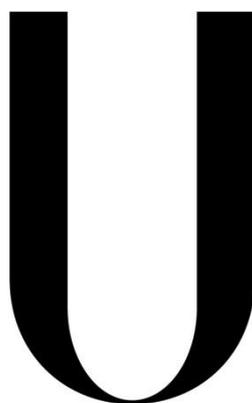


Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Química e Bioquímica



**LISBOA**

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**Implementação, validação e controlo da qualidade da  
determinação de metais em águas naturais por ICP-OES**

Rui Miguel da Silva Cordeiro

Dissertação

Orientadores:

Doutor Ricardo Jorge Neves Bettencourt da Silva

Dr. Constantino Manuel Gonçalves Rosa

Mestrado em Química – Especialização em Química Analítica

2015



## RESUMO

Neste trabalho descreve-se o desenvolvimento, validação e controlo da qualidade da análise de 8 metais (Ca, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, K, Na) em águas naturais por Espectrometria de Emissão Atómica com Plasma acoplado Indutivamente recorrendo a 13 gamas de calibração analítica. Neste estudo foram considerados os critérios de evidência da competência técnica para realização de ensaios descritos na Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005. A validação dos métodos envolveu a determinação dos limiares analíticos, a avaliação da linearidade da resposta instrumental, a quantificação da precisão, a avaliação da veracidade da medição, através de ensaios de recuperação e a quantificação da incerteza da medição.

Foram desenvolvidas ferramentas e definidos critérios para o controlo diário do desempenho do método. Este controlo de qualidade passa por ensaios branco, um padrão de otimização da resposta instrumental, a análise de padrões de controlo ao limite de quantificação e a meio da gama de calibração, a análise de amostras em duplicado e através da realização de estudos de recuperação de analito adicionado a amostras reais.

A incerteza da medição foi estimada considerando os princípios da abordagem supra-analítica da reconciliação, tendo sido desenvolvida uma nova abordagem que permite a avaliação da incerteza associada à recuperação média de analito quando são realizadas fortificações a diversas concentrações em diferentes amostras com analito nativo. Os dados da validação dos métodos foram usados para estimar a incerteza das medições. A incerteza estimada foi avaliada considerando uma incerteza alvo definida e resultados da participação em Testes de Aptidão. A incerteza estimada, para todos os elementos e gamas de calibração com exceção da gama 0,1-1 mg/L de Ferro, é inferior à incerteza alvo definida e os En-score resultantes dos ensaios de aptidão encontram-se todos entre -2 e 2. Desta forma pode-se considerar que o método analítico desenvolvido, incluindo a abordagem da estimativa da incerteza desenvolvida, é adequado à determinação dos metais estudados na fração solúvel de águas naturais. Foi ainda considerado a incerteza absoluta definida como critério no Decreto-Lei

83/2011 (incerteza expandida igual ou inferior a 50%), tendo-se verificado a adequação da incerteza estimada a essa incerteza alvo. O método analítico desenvolvido e a abordagem da estimativa da incerteza podem então ser considerados adequados ao objetivo.

Palavras-chave: Águas Naturais; ICP-OES; Validação de Métodos; Controlo de Qualidade; Incerteza da Medição; Recuperação de Analíto;

## ABSTRACT

In this work it's described the development, validation and quality control of the analytical for determination of 8 elements (Ca, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, K and Na) in natural waters by Atomic Emission Spectrometry Inductively Coupled Plasma using 13 different analytical calibration ranges. It was considered the technical competence criteria for testing proposed by the Norm NP EN ISO\IEC 17025:2005. The method validation involved the determination of the limit of detection and quantification, the evaluation of the linearity instrumental response, the quantification of precision, the evaluation of the measurement trueness, through recovery tests, and the quantification of the measurement uncertainty.

Apart from the method validation it was developed quality control tools and was defined criteria for the daily control of the method performance. This quality control involved blank samples, optimization standards, the analysis control and limit of quantification standards, analysis of duplicate samples and recovery experiments of analyte added to real samples.

The measurement uncertainty was estimated considering the principles of the reconciliation approach, being developed a new approach that allows the evaluation of the mean recovery uncertainty, applicable to the recovery tests from the spiking of analyte at different levels to different samples with native analyte. The validation data was used to estimate the measurement uncertainty.

The measurement uncertainty was then evaluated considering the comparison with a target uncertainty and with the results of participating in a proficiency test. The estimated measurement uncertainty for all elements in all standard calibration ranges, with the exception of the 0.1-1 mg/L of iron, were inferior to the defined target uncertainty and the proficiency tests En-scores where all between -2 and 2. It was also evaluated the compliance with the uncertainty level defined as a criteria for natural waters in the "Decreto-Lei 83/2011", and was observed that the estimated uncertainty was compliant with this criteria. In conclusion we can consider that the analytical methods developed, including the proposed approach to the estimation of the

measurement uncertainty, is fit for the purpose of determining the studied metals in the soluble fraction of natural waters.

Keywords: Natural Waters; ICP-OES; Method Validation; Measurement Uncertainty; Quality Control; Analyte Recovery

## AGRADECIMENTOS

No fim deste trabalho existe sobretudo a alegria de alcançar um objetivo, com muito empenho e dedicação durante todo este trajeto.

Tenho de começar por agradecer a quem tornou isto possível, nomeadamente o Doutor Ricardo Bettencourt da Silva, não só pelo acompanhamento durante este período mas por toda a preciosa ajuda e dedicação, e à Labelec, mais especificamente à Dra. Cristina Marin e ao Dr. Constantino Rosa por tão abertamente me terem recebido na casa deles e terem sido parte integrante do meu processo de aprendizagem. Gostaria aqui também de deixar o meu agradecimento a todos os funcionários da Labelec, mais especificamente do Área de Ambiente, com quem partilhei o dia-a-dia durante uns longos 8 meses.

Fica também um agradecimento aos de sempre, que estiveram comigo em diversas alturas deste trajeto. À Anabela Sanchez, ao André Janeiro, à Cecília Rocha, ao Cláudio Leal, à Joana Peres, ao Jorge Diniz, ao Nuno Rosa e à Sofia Assis o meu mais sincero obrigado por todos os dias em que estiveram ao meu lado (E desculpem lá qualquer coisinha).

Um agradecimento especial à minha namorada pelo apoio incondicional, pelo acompanhamento de diversas fases deste trajeto e pelo interesse que sempre revelou neste projeto.

E por fim um agradecimento aos meus pais e irmão que mais perto, ou mais longe, estão sempre presentes e é por eles e por causa deles que hoje estou a escrever isto.

Lisboa, 24 de Setembro de 2015

Rui Miguel da Silva Cordeiro



## ÍNDICE

RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABELAS .....	x
GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	xi
1. Introdução .....	1
1.1. METAIS EM ÁGUAS NATURAIS – ENQUADRAMENTO LEGAL .....	3
1.2. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE .....	5
1.2.1. BREVE HISTÓRIA .....	5
1.2.2. O ICP – PRINCÍPIOS TEÓRICOS .....	6
1.2.3. O ICP-OES .....	7
1.2.3.1. O PLASMA .....	8
1.2.3.2. GERADOR DE RADIOFREQUÊNCIAS .....	10
1.2.3.3. INTRODUÇÃO DA AMOSTRA .....	11
1.2.3.4. CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO .....	12
1.2.3.5. TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRA .....	12
1.2.3.6. SISTEMA DE DETECÇÃO E DETETORES .....	13
1.2.3.7. INTERFERÊNCIAS .....	14
1.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS E A NP EN ISO/IEC 17025 .....	16
1.3.1. AVALIAÇÃO INDIRECTA .....	18
1.3.1.1. SELETIVIDADE .....	18
1.3.1.2. FUNÇÃO CALIBRAÇÃO .....	18
1.3.1.3. HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DA RESPOSTA INSTRUMENTAL .....	19
1.3.1.4. LINEARIDADE .....	21
1.3.1.5. LIMIARES ANALÍTICOS .....	21
1.3.1.6. PRECISÃO DE MEDIÇÃO .....	22
1.3.2. AVALIAÇÃO DIRECTA .....	23
1.3.3. RASTREABILIDADE .....	25
1.4. CONTROLO DE QUALIDADE .....	26
1.4.1. CARTAS DE CONTROLO .....	26
1.5. AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO .....	28

2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	32
2.1.	MATERIAL E REAGENTES.....	33
2.2.	MÉTODO ANALÍTICO .....	33
2.2.1.	IMPLEMENTAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	33
2.2.2.	DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO .....	41
3.	TRATAMENTO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	43
3.1.	LIMIARES ANALÍTICOS .....	44
3.2.	LINEARIDADE.....	45
3.3.	PRECISÃO.....	47
3.4.	VERACIDADE .....	49
3.5.	CONTROLO DE QUALIDADE .....	50
3.5.1.	CONTROLO DA SENSIBILIDADE DO ICP-OES .....	51
3.5.2.	CONTROLO DA CALIBRAÇÃO ANALÍTICA .....	52
3.5.3.	CONTROLO DA REPETIBILIDADE DA MEDIÇÃO .....	53
3.5.4.	ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO .....	54
4.	AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO.....	56
4.1.	IDENTIFICAÇÃO DA MENSURANDA.....	57
4.2.	MODELO DE MEDIÇÃO .....	57
4.3.	IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA .....	57
4.4.	QUANTIFICAÇÃO DAS COMPONENTES DE INCERTEZA .....	58
4.4.1.	INCERTEZA ASSOCIADA À PRECISÃO INTERMEDIÁRIA .....	61
4.4.2.	INCERTEZA ASSOCIADA À RECUPERAÇÃO MÉDIA .....	61
4.4.3.	COMBINAÇÃO DE COMPONENTES DE INCERTEZA .....	67
4.4.4.	EXPANSÃO DA INCERTEZA .....	67
4.5.	APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO MODELO DE ESTIMATIVA DA INCERTEZA .....	68
4.5.1.	AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO DA DIMENSÃO DA INCERTEZA.....	68
4.5.2.	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MODELO DE AVALIAÇÃO DA INCERTEZA .....	76
5.	CONCLUSÃO .....	78
6.	BIBLIOGRAFIA.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama energético que demonstra as transições energéticas - a e b representam o processo de excitação do átomo, c o de ionização e d o de excitação do ião. e representa a emissão iónica enquanto f, g e h representam a emissão atómica.....	7
Figura 2 - Esquema geral de um instrumento de ICP-OES .....	8
Figura 3 - Secção da tocha.....	9
Figura 4 – Esquema de processos que ocorrem no plasma .....	10
Figura 5 - Nebulizador Concêntrico.....	11
Figura 6 - Processo geral de determinação da incerteza de uma medição .....	29
Figura 7 - Gráficos de Residuais por elemento e gama de calibração .....	46
Figura 8 - Diagrama de causa e efeito da abordagem da reconciliação .....	58
Figura 9 – Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,2-2 mg/L de Cálcio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.....	69
Figura 10 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 2-6 mg/L de Cálcio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	69
Figura 11 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 4-20 µg/L de Cobre. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	70
Figura 12 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 2-20 µg/L de Crómio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.....	70
Figura 13 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 10-100 µg/L de Ferro. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.....	71
Figura 14 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,1-1 mg/L de Ferro. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.....	71
Figura 15 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,2-2 mg/L de Magnésio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	72
Figura 16 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 4-20 µg/L de Manganês. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	72
Figura 17 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 20-200 µg/L de Manganês. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	73
Figura 18 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,4-2 mg/L de Potássio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	73

Figura 19 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, $U$ , e da incerteza expandida relativa, $U'$ , estimada e alvo para a gama de 2-20 mg/L de Potássio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas. ....	74
Figura 20 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, $U$ , e da incerteza expandida relativa, $U'$ , estimada e alvo para a gama de 0,5-5 mg/L de Sódio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.....	74
Figura 21 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, $U$ , e da incerteza expandida relativa, $U'$ , estimada e alvo para a gama de 5-50 mg/L de Sódio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.....	75

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Gamas de concentração definidas para a calibração do ICP-OES para a determinação de diversos metais em águas naturais superficiais e de profundidade. ....	34
Tabela 2 - Comprimentos de onda analisados e modos de leitura estudados por elemento ....	35
Tabela 3 - Condições instrumentais do ICP-OES sugeridas pelo fabricante.....	36
Tabela 4 - Parâmetros instrumentais e respetivos valores testados no que respeita ao seu impacto na emissão característica dos elementos quantificados a menores concentrações. ....	37
Tabela 5 - Gamas de calibração validadas da determinação de diversos elementos por ICP-OES. Esta tabela também apresenta o modo de leitura da emissão considerado.....	39
Tabela 6 - Gamas de trabalho, modo de leitura e comprimentos de onda escolhido para determinação de diversos elementos em águas naturais por ICP-OES. ....	41
Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação estimados para cada elemento e gama de calibração .....	44
Tabela 8 - Valores quantitativos da repetibilidade e precisão Intermediária as medições dos vários elementos nas gamas estudadas.....	48
Tabela 9 - Ferramentas e parâmetros usados no controlo interno de qualidade implementado. Esta tabela apresenta a frequência e alguns critérios de utilização destas ferramentas.....	50
Tabela 10 – Critérios de aceitação dos sinais de brancos e padrões de topo usados para monitorizar a otimização das condições instrumentais.....	52
Tabela 11 - Critérios de aceitação da amplitude de duplicados obtidos em condições de repetibilidade na gama de calibração .....	54
Tabela 12 – Determinação dos termos usados no cálculo da incerteza da recuperação média.....	66
Tabela 13 – En-score da participação do laboratório num teste de aptidão.....	76
Tabela 14 - Valores Críticos de T1 e Tn para o teste de valores aberrantes únicos de Grubbs .... e	
Tabela 15 - Valores críticos de $\mathfrak{R}$ para o teste de valores aberrantes emparelhados únicos e antagónicos de Grubbs. ....	f

## GLOSSÁRIO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA – Análise de variâncias

CCD – Dispositivo de carga acoplado

c.d.o. – Comprimento de onda

CID – Dispositivo de injeção de carga

CTD – Dispositivos de transferência de carga

DQA – Diretiva Quadro Água

EAA – Ensaio de Aptidão de Águas

EIE – Elementos facilmente ionizáveis

EN – Norma Europeia

ICP-OES – Espectrofotometria de Emissão Atômica com Plasma acoplado indutivamente

IEC – International Electrotechnical Commission

ISO – International Organization for Standardization

LA – Lei da Água

LD – Limite de deteção

LI – Limite inferior

LQ – Limite de Quantificação

LS – Limite superior

MRC – Material de referência certificado

NP – Norma Portuguesa

PC- Padrão de Controlo

PDA – Matriz de Fotodiodos

PLQ – Padrão ao Limite de Quantificação

PT – Ensaio de Aptidão

SI – sistema internacional

RPM – rotações por minuto

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

c – velocidade da luz

E – Energia

$h$  – constante de Planck

$K$  – Kelvin, unidade de temperatura

$L \text{ min}^{-1}$  – Litro por minuto

$\text{mg/L}$  – Miligrama por litro

$\text{MHz}$  – Megahertz

$\text{nm}$  – nanómetro

$W$  – Watt

$\lambda$  – comprimento de onda

$\mu\text{g/L}$  – Micrograma por Litro

# 1. Introdução

O Laboratório de Ambiente (LAB-MA) da EDP Labelec é um laboratório de ensaios acreditado, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2005, para vários métodos de análise de águas naturais, águas de consumo, águas de processo e efluentes líquidos, sendo a sua principal atividade a operacionalização de programas de monitorização de meios hídricos de superfície nas vertentes de amostragem e análise laboratorial.

O LAB-MA é responsável pela realização dos programas de monitorização e autocontrolo da qualidade da água das albufeiras onde a EDP capta água para a produção de energia hidroelétrica. Estes programas incluem a monitorização de elementos físico-químicos de suporte, microbiológicos, biológicos, substâncias prioritárias e poluentes específicos.

Também para cumprimento do estabelecido nos contratos de concessão acima referidos, o LAB-MA tem sido responsável pela implementação dos programas de monitorização dos troços de rio localizados a jusante das barragens, com o objetivo de avaliar a eficácia do regime de caudais ecológicos (RCE), como medida de minimização dos impactos causados pela construção da barragem.

No âmbito destas monitorizações, o LAB-MA utiliza as técnicas de Espectrofotometria de Absorção Atómica com atomização por chama e por câmara de grafite. Por serem técnicas de análise mono-elementar e com uma capacidade de resposta demorada para a análise de muitas amostras com vários metais por amostra, foi adquirido um ICP-OES “dual view” com o intuito de melhorar o tempo de resposta para a análise dos metais. Este equipamento tem capacidade de análise multielementar e no modo de leitura axial pode atingir limites de deteção ao nível da câmara de grafite, tornando-o numa boa alternativa aos equipamentos de absorção atómica e que vai ao encontro do objetivo pretendido com a sua aquisição.

O presente trabalho foi realizado com o intuito de, implementar, validar e estabelecer o controlo de qualidade para a análise de (Ca, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, K, Na) por ICP-OES e em várias gamas de trabalho, de acordo com os critérios estabelecidos na NP EN ISO\IEC 17025:2005.

## 1.1. METAIS EM ÁGUAS NATURAIS – ENQUADRAMENTO

### LEGAL

A distribuição da água pelo planeta pode ser dividida em dois grupos, água doce e água salgada. Apenas cerca de 3% de toda a água no planeta é água doce, sendo que apenas 1% dessa água é uma água de superfície, sendo o restante dividido entre águas subterrâneas e icebergs e glaciares. A água de superfície está distribuída predominantemente em lagos, mas também na atmosfera e no solo e uma pequena parte nos rios.[1]

As águas naturais englobam as águas de superfície, como rios e lagos, não sendo catalogadas por tipo de utilização, como as águas de consumo humano ou as águas residuais.

A poluição das águas superficiais constitui uma ameaça para o ambiente, para a saúde humana e para a qualidade de vida das pessoas.

De acordo com a Diretiva Quadro Água (DQA), transposta para a lei nacional através da Lei da Água (LA), os Estados Membros deverão proteger, melhorar e recuperar as massas de águas superficiais e subterrâneas com o objetivo ambiental de alcançar um Bom Estado das massas de água até 2015, bem como reduzir gradualmente a poluição provocada por substâncias prioritárias e suprimir as emissões, descargas e perdas das substâncias perigosas prioritárias.

O Bom Estado das águas de superfície é definido como o estado em que se encontra uma massa de água quando o seu Estado/Potencial Ecológico e o seu Estado Químico são considerados como pelo menos “Bons”.

Na avaliação do Estado/Potencial Ecológico estão em causa i) elementos de qualidade biológica ii) elementos químicos e físico-químicos de suporte e iii) elementos hidromorfológicos. No segundo grupo estão incluídos os elementos físico químicos gerais e os poluentes descarregados em quantidades significativas, designados por poluentes específicos. No que se refere a estes poluentes, para se atingir o Bom Estado/Potencial Ecológico, as médias anuais não deverão ultrapassar as NQA estabelecidas no Anexo B do documento “Critérios para a Classificação do Estado das Massas de Água descritas nos Planos de Gestão de Região Hidrográfica 2016-2021.

A avaliação do Bom Estado Químico para as águas superficiais é feita com base na comparação das concentrações das substâncias prioritárias com as normas de qualidade ambiental (NQA) estabelecidas pela Comissão Europeia na Diretiva 2013/39/UE. As NQA têm como objetivo o controlo da poluição, estabelecendo níveis máximos de concentração de determinadas substâncias na água, nos sedimentos e no biota. [2], [3]

Nos programas de monitorização ambiental operacionalizados pelo Laboratório de Ambiente da EDP Labelec estão incluídos vários metais, que podem ser englobados em categorias distintas:

- elementos físico químicos gerais: cálcio, magnésio, sódio e potássio;
- substâncias prioritárias: cádmio, chumbo, mercúrio e níquel;
- poluentes específicos: arsénio, cobre, crómio e zinco.

Para a avaliação da qualidade da água das albufeiras são também monitorizados o ferro e o manganês, dada a relevância destes metais em estudos de limnologia.

As especificações técnicas para a análise e monitorização dos vários parâmetros e os critérios de desempenho mínimo para os métodos de análise devem obedecer ao estipulado no Decreto-lei n.º 83/2011, de 20 de Junho.

## 1.2. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA ACOPLADO INDUTIVAMENTE

### 1.2.1. BREVE HISTÓRIA

Espectroscopia é uma palavra derivada do latim spectrum, que significa imagem, e da raiz grega skopos, que significa observar. Em 1666, Sir Isaac Newton elaborou a hipótese de que a luz branca se decompunha em 7 cores observadas quando esta atravessa um prisma. Por sua vez Carl Wilhelm Scheele, em 1777, demonstrou que existia uma radiação invisível abaixo do violeta. Anos depois, em 1800, William Herschel veio ainda provar a existência de radiação para além do vermelho. Hoje em dia sabe-se que a região visível do espectro - (com comprimentos de onda entre 700 e 400 nm) - corresponde apenas a uma pequena fração do espectro eletromagnético. [4]

O uso de chamas e descargas elétricas sobre materiais para a determinação da sua composição começou há bastante tempo. Em 1752 foi registada a comparação da cor de uma chama resultante da queima de uma mistura de álcool e sal marítimo e a cor de uma chama sem a presença do sal marítimo. Já as descargas elétricas foram primeiramente usadas em análise química em 1776 por Alessandro Volta, que foi capaz de identificar alguns gases pelas cores que emitiam quando era aplicada uma faísca. [5]

Os princípios da espectroscopia atômica foram lançados quando em 1817 Joseph von Fraunhofer registou na região visível do espectro solar uma série de riscas pretas. [4]

Em 1859 Kirchhoff e Bunsen concluíram que as riscas de emissão do espectro de uma chama eram produzidas por átomos e não moléculas. Foi este desenvolvimento que potenciou o conhecimento do espectro de emissão. Os princípios da espectroscopia de emissão, permitiram a Kirchhoff e Bunsen o desenvolvimento de métodos que levaram à descoberta de 4 elementos (Cs, Rb, Ti e In). [5]

Em 1955 Walsh, Alkemade e Milatz propuseram um método de análise quantitativa baseado na absorção da radiação pelos átomos produzidos numa chama, usando como fonte de radiação um tubo de descarga de cátodo oco. Em 1959, Boris L'vov desenvolveu um forno de grafite com aquecimento eletrotérmico, como alternativa à atomização numa chama. [4]

A espectrometria de emissão atômica sofreu um desenvolvimento muito relevante em 1964, quando Stanley Greenfield publicou o primeiro relatório sobre o uso de um plasma indutivamente acoplado (ICP) para análise elementar por espectrometria de emissão atômica (OES). Greenfield conclui que o plasma era uma fonte de calor estável, com capacidade de ultrapassar efeitos interferentes e produzir medições mais sensíveis que a fotometria de chama. [4], [5]

### 1.2.2. O ICP – PRINCÍPIOS TEÓRICOS

A Espectrofotometria de Emissão Ótica com Plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), é uma técnica de emissão atômica largamente utilizada em análise elementar.

A emissão atômica baseia-se no facto de que quando um átomo absorve energia na forma de radiação eletromagnética ou de uma colisão com outra partícula existem dois acontecimentos mais prováveis de ocorrer. Um deles é o aumento da energia cinética do átomo e o outro a absorção da energia e a consequente excitação do átomo. Quando um átomo é excitado um eletrão é promovido de um estado menos energético para uma orbital de maior energia. Se a energia absorvida for suficientemente elevada o eletrão pode ser expelido do átomo, formando um ião carregado positivamente. Os iões também apresentam estados excitados e podem emitir fotões da mesma maneira que um átomo. Estes fenómenos encontram-se representados na Figura 1. [5]

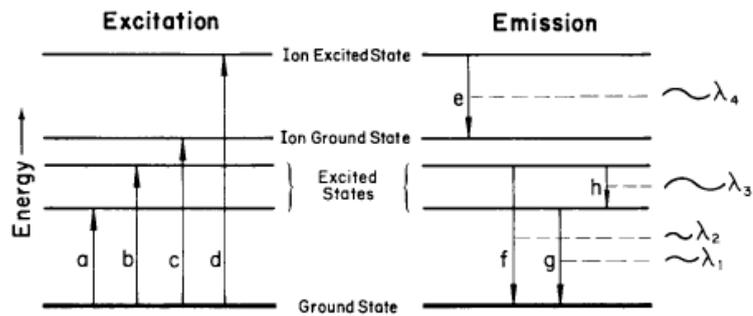


Figura 1 - Diagrama energético que demonstra as transições energéticas - a e b representam o processo de excitação do átomo, c o de ionização e d o de excitação do ião. e representa a emissão iónica enquanto f, g e h representam a emissão atómica

Quando se dá o decaimento do electrão de um nível de maior energia para um de mais baixa energia o átomo emite um fóton. [4]

A diferença entre os níveis energéticos permite estimar o comprimento de onda (c.d.o.) da radiação emitida através da equação de Planck,  $E = \frac{h \times c}{\lambda}$  (Em que  $E$  representa a Energia,  $h$  a constante de Planck,  $c$  a velocidade da luz e  $\lambda$  o comprimento de onda da radiação emitida pela desexcitação)[5]

Na espectroscopia de emissão atómica, os átomos do analito são excitados por uma fonte de energia (calor/elétrica).

### 1.2.3. O ICP-OES

A configuração geral de um ICP-OES é ainda muito semelhante à descrita no início dos anos 70, dividindo-se no nebulizador, plasma e numa rede de difração associada a um detetor de radiação. Habitualmente os itens analisados encontram-se no estado líquido, sendo posteriormente nebulizados formando um aerossol dentro de uma câmara de nebulização e este é conduzido ao centro do plasma por um fluxo de árgon. Aqui ocorrem uma série de processos que resultam no fenómeno de emissão atómica ou iónica do elemento estudado. Esta radiação policromática obtida é conduzida à rede de difração, que a separa em diversos comprimentos de onda. A radiação isolada é transportada para um detetor, sendo criada uma corrente elétrica, cuja intensidade depende do número de fótons presentes na radiação emitida. Através do software informático este sinal é transformado proporcionalmente num valor em

concentração. A concentração obtida é função da calibração prévia do ICP-OES com soluções de concentração conhecida do elemento, processo designado por calibração instrumental. Um esquema de um ICP-OES é apresentado na Figura 2.

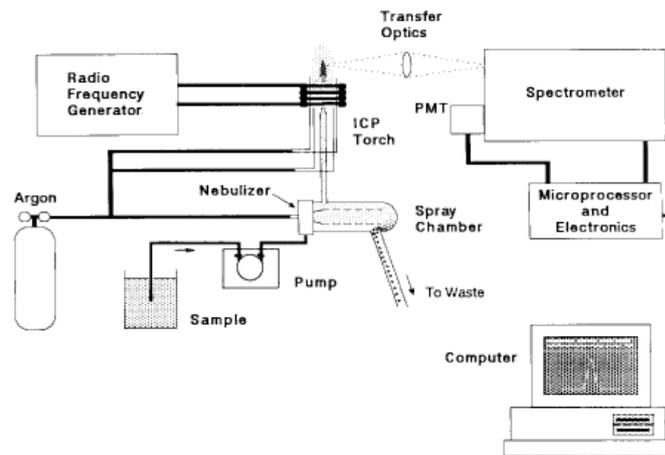


Figura 2 - Esquema geral de um instrumento de ICP-OES

As aplicações mais comuns desta instrumentação são a determinação de metais a níveis vestigiais em amostras com relevância para a saúde pública e para a gestão da qualidade do meio ambiente, tais como água potável, alimento, águas residuais e águas naturais. É também usado na caracterização de matérias-primas e produtos da indústria, amostras geológicas, etc. [4], [5]

### 1.2.3.1. O PLASMA

Por definição um plasma é uma mistura gasosa condutora que contém uma concentração significativa de íons e eletrões. No caso dos plasmas de argônio, os íons de argônio e os eletrões são as principais espécies condutoras.

Habitualmente os plasmas de argônio são iniciados por uma fonte de energia externa, tipicamente uma bobina de Tesla. [6] Posteriormente, a energia de uma fonte de radiofrequências acelera os eletrões a energias cinéticas elevadas através do campo magnético gerado. As radiofrequências são muito usadas devido às suas vantagens ao nível da sensibilidade e robustez a interferências. A temperatura do plasma pode

atingir cerca de 10000 K. Esta energia é transferida para os outros átomos através de colisões produzindo mais iões e eletrões. O processo desenvolve-se em cadeia até a formação de um plasma estável. [4], [6]

Na instrumentação ICP-OES com fins analíticos, o plasma é formado numa tocha, representada na Figura 3, que é constituída por três tubos de quartzo concêntricos. Na secção externa passa o maior fluxo de árgon ( $11-17 \text{ L min}^{-1}$ ). Na secção intermédia flui cerca de  $1 \text{ L min}^{-1}$  de árgon para estabilizar o plasma. Por sua vez, na secção interna passa o aerossol da amostra transportado num fluxo de árgon. À volta do tubo mais exterior encontra-se uma bobina de indução cuja fonte de energia é um gerador de radiofrequências. A resistência dos iões e eletrões ao fluxo de energia da bobina produz o aquecimento *óhmico* do plasma. A temperatura do plasma é tão alta que requer que este esteja termicamente isolado da tocha. Isto consegue-se com um fluxo de árgon à volta das paredes da tocha que também posiciona o plasma no centro da bobina de radiofrequências. [4], [6]

A emissão do plasma pode ser observada de duas formas diferentes: A observação radial, visualizando o plasma num ângulo de  $90^\circ$  e a axial, visualizando o plasma ao longo do seu comprimento. A geometria radial permite a observação de uma emissão mais estável e precisa, enquanto a axial permite a observação de emissões mais intensas úteis para a determinação de limites de deteção mais baixos. [4], [6]

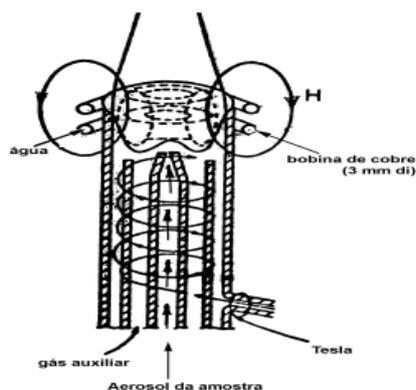


Figura 3 - Secção da tocha

O plasma tem mais funções para além da atomização, ionização e excitação dos elementos. A primeira função é a de remover o solvente do aerossol (i.e. desolvatar o

aerossol). Em seguida decompõe as moléculas e compostos iônicos resultantes que são dissociados em átomos no processo designado como atomização. Em seguida os átomos excitados produzem iões no estado fundamental ou também excitados. Estes processos estão esquematizados na Figura 4.[5]

Uma das grandes vantagens do plasma sobre as outras fontes de energia da espectrometria atômica é a elevada temperatura deste. Esta temperatura melhora a eficiência de atomização e ionização e reduz ou elimina muitas das interferências químicas que ocorrem quando se usam outras fontes em soluções complexas. Outra característica importante do ICP, que não é partilhada por outras fontes é o facto de o aerossol ser introduzido no centro da fonte de energia aumentando o tempo de residência do elemento para aproximadamente 2 ms. Este tempo de residência é comparativamente maior ao de outras fontes e é em parte responsável pelos poucos interferentes de matriz que ocorrem no ICP-OES.[5]

Outra vantagem do ICP é o facto de a atomização/ionização ocorrer num ambiente quimicamente inerte e num percurso ótico relativamente pequeno, minimizando os fenómenos de auto-absorção importante em atomizações mais frias.

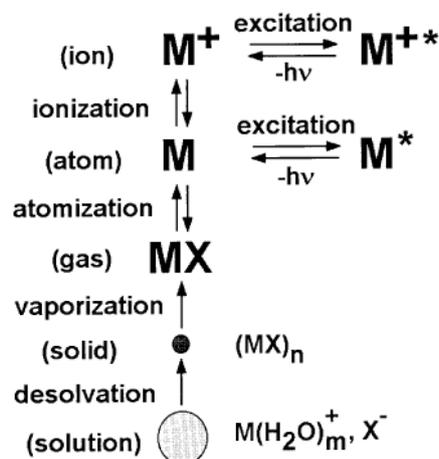


Figura 4 – Esquema de processos que ocorrem no plasma

### 1.2.3.2. GERADOR DE RADIOFREQUÊNCIAS

O gerador de radiofrequências é o aparelho que fornece a potência para gerar e manter o plasma. Geralmente são osciladores que fornecem corrente alternada a

frequências de 27,12 MHz ou 40,69 MHz. Relativamente à potência fornecida, esta varia geralmente de 700 W a 1500 W. A bobina é, de um modo geral, feita de cobre e arrefecida a água ou ar. Existem dois tipos diferentes de gerador de radiofrequências, os “crystal-controlled” e os “free-running”. [4], [6]

### 1.2.3.3. INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

A maneira mais comum de se introduzir a amostra, tipicamente no estado líquido, é através de um nebulizador pneumático. Existem diversos nebulizadores pneumáticos para amostras líquidas. Para além do nebulizador concêntrico, representado na Figura 5, o mais utilizado, existe ainda os de fluxo cruzado e o nebulizador de Babington.

Um nebulizador concêntrico é constituído por dois tubos finos, sendo um para o gás e outro para a amostra. A passagem do gás para a câmara de nebulização provoca um vácuo, por expansão brusca, que permite a aspiração da amostra, pelo princípio de Venturi. O gás a alta velocidade, por passagem de um fluxo de cerca de  $1 \text{ L min}^{-1}$  num estrangulamento físico, fragmenta o líquido em pequenas gotas de diferentes tamanhos, que constituem um aerossol, que é transportado para o plasma. [4], [5]

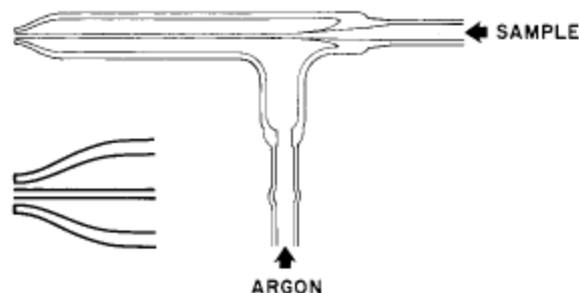


Figura 5 - Nebulizador Concêntrico

As características mais importantes do aerossol formado são o tamanho e distribuição das gotículas, a quantidade de elemento e solvente transferido para o plasma e as flutuações do sistema de nebulização. A qualidade do aerossol formado

depende quase exclusivamente da geometria e operação do nebulizador, enquanto que a transferência do aerossol para o plasma depende da câmara de nebulização.[5]

Nos nebulizadores de Babington é necessário que a amostra seja bombeada para dentro do nebulizador, tipicamente por uma bomba peristáltica ao contrário do que acontece nos nebulizadores concêntricos ou de fluxo cruzado. O uso de uma bomba peristáltica assegura que o fluxo de amostra para o nebulizador seja constante e não dependente das características físicas da solução analisada, nomeadamente da sua viscosidade e tensão superficial. A independência das características físicas da solução é importante dado que os calibradores podem ter características diferentes das amostras analisadas. O estado da tubagem utilizada pela bomba peristáltica deve ser verificado diariamente visto que esta pode condicionar a repetibilidade da nebulização.[5]

#### 1.2.3.4. CÂMARA DE NEBULIZAÇÃO

A câmara de nebulização existe para que apenas gotas muito pequenas, geralmente com diâmetros abaixo de 10  $\mu\text{m}$ , possam ser introduzidas no plasma. Essa é a principal função da câmara de nebulização, no entanto ela permite ainda estabilizar o fluxo de amostra que pode chegar pulsado devido, por exemplo, à utilização de uma bomba peristáltica. As câmaras de nebulização conduzem apenas entre 1-5 % da amostra ao plasma.[5]

#### 1.2.3.5. TÉCNICAS ALTERNATIVAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRA

Existem algumas alternativas ao uso de nebulizadores e câmaras de nebulização como sistemas de introdução de amostra no ICP-OES. A alternativa mais utilizada é a geração de hidretos. Nesta técnica a amostra é misturada com um reagente redutor, geralmente uma solução de borohidreto de sódio em hidróxido de sódio diluído. A reação produz hidrogénio atómico que reage com o elemento a

determinar na solução (Hg, Sb, As, Bi, Ge, Pb, Se, Te, e Sn), formando hidretos metálicos voláteis. Os hidretos são conduzidos para o plasma e a emissão característica do elemento a estudar, isolada e medida. Esta técnica permite melhorar os limites de detecção das determinações; muitas vezes numa ordem de 1000 vezes. Isto acontece porque a quantidade de elemento introduzida no plasma é muito maior do que com um nebulizador pneumático. A eficiência com que os hidretos chegam ao plasma é de perto de 100%; muito superior à eficiência de 1-5% da câmara de nebulização. Também têm sido usados fornos de grafite para vaporizar amostras líquidas ou sólidas antes da condução dos elementos para o plasma. [5]

#### 1.2.3.6. SISTEMA DE DETECÇÃO E DETETORES

A radiação emitida pode ser visualizada em duas geometrias diferentes, a radial e a axial, como descrito anteriormente. Em qualquer delas a radiação é recolhida numa lente convexa ou um espelho côncavo. Posteriormente a radiação é focada num aparelho de dispersão dos comprimentos de onda. Esta separação é mais frequentemente realizada numa rede de difração ou numa rede de echelle, podendo ainda existir prismas, filtros e interferómetros.[5]

Recentemente têm sido estudadas as vantagens do uso de sistemas com redes de echelle por comparação com as redes de difração. Entre essas vantagens pode-se destacar a boa eficiência em todos os comprimentos de onda e todas as ordens espectrais e a excelente resolução que exibem[5]

No que respeita a detetores, foram desenvolvidos três tipos diferentes de equipamentos com alta sensibilidade e resolução; a matriz de fotodiodos (PDA), o dispositivo de injeção de carga (CID) e o dispositivo de carga acoplado (CCD). O CID e o CCD são baseados na sensibilidade à luz de silício no estado sólido e pertencem à classe dos dispositivos de transferência de carga (CTD). No caso de um CID, cada componente, chamado de pixel, é capaz de guardar a carga gerada pela absorção de luz pelo silício e essa carga pode ser medida no fim do tempo de exposição ou durante a integração, sem a destruição da carga. Por isso, este processo é conhecido como um

modo de leitura não destrutivo. No entanto, o CID apresenta algumas desvantagens, nomeadamente um nível de ruído superior ao de um CCD e requer que seja arrefecido até temperaturas muito baixas de modo a diminuir este nível de ruído. [5]

#### 1.2.3.7. INTERFERÊNCIAS

Entre todas as técnicas usadas em espectrometria atómica o ICP- OES é uma das que tem menos interferências. O facto do plasma de árgon ser inerte e ter uma alta temperatura reduz a ocorrência de interferências químicas. Contudo existem ainda algumas interferências químicas relevantes, das quais se destacam os efeitos produzidos pela presença de elementos facilmente ionizáveis (EIE), como os metais alcalinos. A elevada concentração destes elementos reduz a concentração de iões e aumenta a concentração de átomos dos outros elementos no plasma com um impacto proporcional na emissão iónica e atómica medida. Uma das maneiras de diminuir este efeito é diluir a amostra de forma a tornar este efeito menos acentuado. [7]

No entanto, o tipo de interferência mais comum em ICP-OES é a interferência espectral. Esta surge devido à natureza multielementar do plasma, visto que o ICP é capaz de excitar quase todos os elementos que são introduzidos, o que resulta num espectro de emissão altamente complexo. A solução mais usada para evitar estes problemas é o uso de um espectrómetro de alta resolução, no entanto, em alguns casos, continua a verificar-se sobreposição de riscas de emissão com c.d.o. próximos.

Existem quatro tipos diferentes de interferências espectrais: “desvio simples da linha de base”, “inclinação da linha de base”, “sobreposição espectral” e “desvio complexo da linha de base”. O “desvio simples da linha de base” é um deslocamento positivo ou negativo na linha de base, em qualquer um dos lados do comprimento de onda a medir. Pode ser corrigido fazendo uma correção do fundo, ou evitado usando um comprimento de onda diferente. A “inclinação da linha de base” pode ter um tratamento equivalente ao anterior e deve-se à sobreposição da risca de emissão com uma emissão próxima muito intensa. No caso de existir “sobreposição espectral”, que consiste na sobreposição de riscas de emissão de dois ou mais elementos, esta

interferência pode ser corrigida por subtração da emissão interferente após o conhecimento da concentração do interferente e relação desta com o sinal de emissão. Existe um “desvio complexo da linha de base” quando se combinam diferentes interferências à volta do comprimento de onda de emissão do elemento. Aqui deve ser escolhido um comprimento de onda diferente. [7]

Outros tipos de interferências são as denominadas não espectrais, geralmente físicas ou químicas. As interferências físicas são as que alteram a capacidade de aspiração, nebulização ou desolvatação da solução analisada por comparação com o observado nos calibradores. Podem ser alterações na viscosidade da solução, tensão superficial ou densidade. Estas interferências são causadas por diferenças nos teores de sólidos dissolvidos nas amostras e nos calibradores. Os níveis elevados de sólidos dissolvidos podem levar a deposição de sais no nebulizador o que afeta a velocidade do fluxo do aerossol. A presença de constituintes inflamáveis, como solventes orgânicos, na solução desconhecida pode alterar a temperatura no plasma e afetar a eficiência da atomização, ionização e excitação.[6], [8]

As interferências químicas são geralmente diferentes para os diversos elementos. Estas afetam o processo de atomização ou ionização. A presença de elementos facilmente ionizáveis causa alterações na distribuição do estado do elemento a analisar (i.e. estado atómico ou ionizado) com impacto na determinação das intensidades das respetivas emissões. Estas interferências podem ser corrigidas ou ultrapassadas com a diluição das soluções, o uso de padrões com uma matriz equivalente à das amostras ou a calibração pela técnica da adição de padrão. [6], [8]

### 1.3. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS E A NP EN ISO/IEC 17025

A qualidade de uma medição é função da sua adequação ao fim em vista. Esta avaliação é realizada em laboratórios que integram o seu trabalho num sistema de garantia da qualidade. No entanto, os sistemas da garantia da qualidade também cuidam de aspetos não técnicos do serviço analítico como o cumprimento de prazos de emissão de resultados ou o tratamento adequado de reclamações dos destinatários dos ensaios.

Os princípios de garantia de qualidade têm sido cada vez mais implementados nos laboratórios de ensaios, o que não garante por si só a qualidade dos resultados produzidos mas aumentam a probabilidade dessa qualidade ser adequada ao objetivo dos mesmos. A implementação de um esquema de garantia da qualidade permite ao laboratório demonstrar que tem competência organizacional e técnica para produzir, atempadamente, informação analítica adequada ao objetivo da medição. Neste caso o laboratório deverá ter pessoal competente capaz de desempenhar as suas funções de forma imparcial, usando recursos materiais adequados, seguindo procedimentos analíticos validados e controlados, em que todo o trabalho analítico é monitorizado para a deteção e, se pertinente a correção de desvios. Os princípios de garantia da qualidade estão publicados na forma de protocolos ou normas, sendo que uma das referências mais comuns para os laboratórios de ensaios químicos é a Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005. [9]

A acreditação segundo a Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 é concedida, por um Organismo de Acreditação, a um laboratório para a realização de uma ou mais atividades, depois da avaliação externa do laboratório. A avaliação consiste na análise do sistema da qualidade, incluindo os procedimentos seguidos e registos gerados, sendo presenciada a realização dos ensaios. Os procedimentos analíticos são analisados de forma a garantir que são adequados para o uso em vista e que foram validados. A acreditação solicita a participação do laboratório em testes de aptidão existentes visto que estes asseguram uma avaliação externa das capacidades técnicas e organizacionais do laboratório. [9]

É da responsabilidade do laboratório a seleção do método a usar, tendo em conta o objetivo do ensaio, independentemente dos conhecimentos técnicos do destinatário mais direto do resultado do ensaio. O método pode estar especificado numa norma ou regulamento ou pode ser desenvolvido pelo laboratório. O laboratório avalia a adequação do método de ensaio ao fim em vista durante a validação do procedimento de medição que envolve a avaliação da qualidade das referências usadas na medição, como por exemplo materiais de referência certificados e a adequação da dimensão da incerteza da medição considerando o objetivo do ensaio. [9]

Tanto os métodos que são especificados numa norma como os métodos desenvolvidos pelo laboratório têm de ser validados. No caso de um método especificado numa norma o laboratório só tem de garantir que consegue implementar corretamente o método que comprovadamente é capaz de produzir resultados com qualidade adequada ao fim para o qual foi criado. Quando se trata de um método desenvolvido no laboratório tem de ser feita uma avaliação exaustiva inicial do princípio da medição e posteriormente do desempenho do procedimento para se provar que os ensaios produzidos serão adequados.[9]

Para se efetuar a validação de um método alguns estudos devem ser efetuados que se podem dividir em dois tipos de avaliação: a avaliação indireta e a avaliação direta. No que respeita à avaliação indireta destaca-se a determinação de parâmetros do desempenho do método como o estudo da representatividade, estudo dos princípios teóricos, a especificidade, função calibração, linearidade da resposta, exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, limites de deteção e quantificação, incerteza entre outros.[9]–[11]

A avaliação direta envolve a comparação do valor estimado com o valor de referência de padrões, materiais de referência certificados, itens analisados em ensaios interlaboratoriais ou caracterizados por um método de referência. [10]

### 1.3.1. AVALIAÇÃO INDIRETA

#### 1.3.1.1. SELETIVIDADE

A seletividade de um método refere-se à facilidade com que o método consegue determinar o analito numa mistura complexa sem o efeito interferente dos componentes da matriz. As interferências de uma determinação podem ser avaliadas através do estudo de diversos tipos de itens, desde padrões preparados numa matriz simples a padrão com matrizes complexas, com valores de analito conhecidos e distribuídos ao longo da gama de trabalho. Esta avaliação envolve a determinação do analito recuperado nos ensaios tendo em conta o seu valor conhecido; i.e. através da determinação da recuperação de analito. Os diferentes interferentes e a extensão do seu efeito interferente devem ser registados e tidos em conta na definição da aplicabilidade do método.[9], [11], [12]

#### 1.3.1.2. FUNÇÃO CALIBRAÇÃO

A calibração é um conjunto de operações que estabelece, em condições específicas, a relação entre sinal medido (habitualmente um sinal instrumental) e o valor conhecido da grandeza medida. Em métodos instrumentais de análise, a calibração analítica passa geralmente por, primeiramente, a preparação de uma série de soluções padrão com concentração conhecida do analito, em seguida essas soluções são estudadas através do método a validar e por fim estabelece-se um gráfico de sinal do equipamento em função da concentração. A função de calibração poderá ser representada por uma função polinomial do primeiro grau e traçada através do método dos mínimos quadrados. Se esse for o caso, o eixo das ordenadas (y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento e o eixo das abcissas (x) a concentração dos padrões, uma vez que assume que os “erros” associados aos valores das abcissas são desprezáveis face aos de observados nas ordenadas. De forma mais

rigorosa, o pressuposto dos métodos dos mínimos quadrados indica que a razão da concentração de analito dos padrões deve ter uma incerteza desprezável considerando a precisão da resposta instrumental. Pressupõe-se ainda que o sinal instrumental tem uma distribuição aproximadamente normal e que a sua variância é constante ao longo da gama de calibração. [13], [9], [11], [12]

A forma algébrica da equação de uma recta é dada por  $y = mx + b$ , em que  $m$  representa o declive e  $b$  a ordenada na origem da recta.

O método dos mínimos quadrados estima os parâmetros da regressão através da equação 1 e 2.

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

$$b = \bar{y} - m \times \bar{x} \quad (2)$$

Em que,  $x_i$  refere-se à concentração de analito ao nível  $i$  (em que  $i$  varia de 1 a  $n$  pontos de calibração),  $y_i$  ao sinal ao nível  $i$ ,  $\bar{x}$  à média dos valores de  $x$  e  $\bar{y}$  a média dos valores de  $y$ .

### 1.3.1.3. HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIA DA RESPOSTA INSTRUMENTAL

O pressuposto de homogeneidade de variâncias da resposta instrumental do método dos mínimos quadrados pode ser avaliados como proposto na norma ISO 8466.[9], [11], [12]

De acordo com a norma é recomendado que o primeiro e último padrão sejam lidos 10 vezes cada. Em seguida determinam-se as variâncias associadas a esses sinais de acordo com as equações 3 e 4.

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (3)$$

Sendo,

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i} \quad (4)$$

Em que  $s_i$  é a variância ao nível  $j$  ( $j$  pode corresponder ao nível mais alto ou mais baixo da gama de calibração),  $y_{ij}$  corresponde à réplica  $j$  do sinal  $y_j$ ,  $n_i$  ao numero de replicas de sinais do nível  $i$  ( $\sum n_i = n$ ) e  $\bar{y}_i$  é a média dos sinais ao nível  $j$ .

As variâncias aos dois níveis são então comparadas para verificar se existem diferenças significativas entre elas, através do cálculo do valor PG, pela equação 5.

$$PG = \frac{S_{maior}^2}{S_{menor}^2} \quad (5)$$

$S_{maior}$  e  $S_{menor}$  correspondem ao maior e menor  $s_i$  independentemente de serem ao nível mais baixo ou mais alto da gama de calibração. O PG é comparado com o valor tabelado,  $F_{tab}$ , da distribuição de Fisher para 9 graus de liberdade para o numerador e denominador da equação anterior.

Se  $PG \leq F_{tab}$  a diferença das variâncias não é significativa e a gama de trabalho é homoscedástica (i.e. possui uma variância da resposta instrumental constante ao longo da gama de calibração).

Se  $PG > F_{tab}$  a diferença das variâncias é significativa e gama de resposta instrumental é heteroscedástica (i.e. a variância da resposta instrumental é significativamente diferente ao longo da gama de calibração). Estas gamas devem ser estudadas usando modelos de regressão ponderados ou reduzidas com vista a avaliar a aplicabilidade do método dos mínimos quadrados numa gama de calibração mais estreita.

#### 1.3.1.4. LINEARIDADE

A linearidade da resposta do método, tipicamente resposta instrumental, é avaliada através da leitura de padrões com concentração de analito equidistantes na gama de trabalho. Em calibrações lineares devem ser estudados, no mínimo de 4 níveis de concentração incluindo o ensaio branco. Com os sinais traça-se um gráfico sinal *versus* concentração e, caso a função seja representada por uma função polinomial de primeiro grau, traça-se a reta de regressão. Pode-se fazer uma avaliação sumária da linearidade da resposta instrumental combinando a determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson com a representação gráfica dos residuais da regressão em função da concentração do padrão. Os residuais são estimados pela diferença entre o sinal instrumental observado e previsto pela linha de regressão; o residual é zero quando ambos coincidem. A determinação do coeficiente de correlação linear e a sua comparação com um valor mínimo necessariamente elevado (por exemplo 0,999) deve ser acompanhado por uma avaliação da distribuição dos residuais aleatoriamente acima e abaixo do residual zero porque pode ser observado um desvio evidente dos sinais à linha de regressão com um coeficiente de correlação linear elevado. [9], [11], [12], [14], [15]

Idealmente a avaliação da linearidade da resposta instrumental deve ser avaliada estatisticamente usando o método ANOVA-Lack-of-fit ou o método  $\chi^2$  aplicáveis em gamas homoscedásticas e heteroscedásticas respetivamente.[14], [15]

#### 1.3.1.5. LIMIARES ANALÍTICOS

O Limite de Detecção (LD) é o teor mínimo medido a partir do qual é possível detetar a presença do analito com uma certeza estatística definida. O Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) define o limite de deteção como “valor medido, obtido por um dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência dum constituinte num material é  $\beta$ , sendo  $\alpha$  a probabilidade de declarar falsamente a sua presença”. O LD pode ser determinado

através da análise repetida de brancos em condições de precisão intermédia (entre 10 e 20 ensaios), somando a média da concentração estimada dos brancos,  $\bar{x}$ , a três vezes o desvio padrão,  $s$ , dessas concentrações como representado na equação 6.[9], [11], [12], [16]

$$LD = \bar{x} + 3 \times s \quad (6)$$

O Limite de Quantificação (LQ) é a mais baixa concentração de analito que pode ser determinada com uma precisão aceitável, tipicamente um coeficiente de variação de precisão intermediária de 10%. É determinado de forma similar ao LD, considerando o fator multiplicativo de 10 em vez de 3, como representado na equação 7.

$$LQ = \bar{x} + 10 \times s \quad (7)$$

#### 1.3.1.6. PRECISÃO DE MEDIÇÃO

O VIM define a fidelidade ou precisão de medição como o “grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas”. A imprecisão é habitualmente quantificada por um desvio padrão ou variância. Esta é geralmente função da concentração de analito. Dependendo das condições em que esta é obtida podem ter diferentes denominações. A repetibilidade, que se refere à precisão de medição realizadas sob condições de repetibilidade, é determinada quando as replicas são obtidas pelo mesmo operador, no mesmo laboratório, usando o mesmo equipamento e recolhidas num curto período de tempo. A reprodutibilidade que se refere à precisão de medições realizadas sob condições de reprodutibilidade, é determinada quando as medições são obtidas depois de se variar todas as condições de medição como os operadores, equipamentos e laboratório com as respectivas condições ambientais. A precisão intermediária que se determina quando as replicas

são reunidas em condições de precisão intermediária. Esta é a medida de precisão que descreve a maior variabilidade dos resultados observada num laboratório.[9], [11], [12], [16]

### 1.3.2. AVALIAÇÃO DIRECTA

Este tipo de avaliação aborda a exatidão dos métodos de ensaio. A exatidão é definida como o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de uma mensuranda. [16]

Esta exatidão é avaliada geralmente através da análise de Materiais de Referência Certificados (MRC), Ensaio de Fortificação, Ensaio Interlaboratoriais, ou a análise de outras referências com valor conhecido. Sempre que possível, devem ser usados MRC's adequados neste processo, pois constituem uma ferramenta por excelência no Controlo Externo da Qualidade. Um MRC possui pelo menos um valor certificado de concentração (ou outra grandeza) reportado com incerteza. O valor obtido na análise do MRC deve ser comparado com o valor certificado.

Os ensaios de fortificação (ou recuperação) constituem uma outra ferramenta importante para avaliar a exatidão de um método. Esta ferramenta é especialmente importante quando não estão disponíveis MRC adequados ou quando os MRC são demasiado dispendiosos para a sua utilização regular. Aqui uma toma de amostra é analisada inicialmente pelo método e em seguida é analisada outra toma da mesma amostra à qual foi adicionada uma quantidade conhecida de analito. Depois é feita a comparação entre o valor estimado da amostra reforçada depois de descontado o teor inicial (i.e. o teor nativo) e a quantidade adicionada. A razão destes dois vales é designada Recuperação,  $R$  e pode ser calculado pela equação 9.

$$Ri(\%) = \frac{C_{obs(i)} - C_{nativa(i)}}{C_{fortificação(i)}} \quad (8)$$

Em que  $C_{obs}$  é a concentração observada após a adição do analito,  $C_{nativa}$  é a concentração nativa da amostra e  $C_{fortificação}$  a concentração adicionada de analito à amostra.

Os Ensaio Interlaboratoriais são também outra excelente ferramenta de avaliação da exatidão com a vantagem adicional de permitir uma avaliação transparente do desempenho visto que os resultados são enviados para um promotor externo do ensaio antes do laboratório conhecer o valor de referência do material analisado. Os critérios de acreditação do laboratório indicam a participação obrigatória em Ensaio Interlaboratoriais existentes devido a esta característica dos mesmos. Existem diversos tipos de Ensaio, sendo os mais comuns os de Aptidão (PT) e os de Normalização. Os Ensaio de Normalização destinam-se apenas a estudar as características de um método, mais especificamente a reprodutibilidade e repetibilidade da medição. Os PT por seu lado destinam-se a avaliar a qualidade das medições realizados pelos laboratórios. A comparação dos valores reportados com o valor de referência pode ser efetuada através do cálculo de diversos parâmetros, sendo que alguns deles também permitem a avaliação da incerteza reportada.

Pode ser avaliada a concordância entre o valor certificado e o estimado recorrendo ao cálculo de diversos parâmetros como o Erro relativo,  $\zeta$ -score ou o z-score, representado pela equação 8.[9], [11]

$$z = \frac{x_i - V_{ref}}{s} \quad (9)$$

Em que  $x_i$  é o valor estimado pelo laboratório,  $V_{ref}$  o valor de referência do material e  $s$  o desvio padrão de referência considerado para a avaliação da dimensão do erro da medição  $x_i - V_{ref}$ . Habitualmente o valor de  $s$  é metade da incerteza máxima admissível, designada incerteza alvo na última edição do VI, para a determinação realizada.

A interpretação dada ao z-score depende do seu resultado. Valores entre -2 e 2 são considerados satisfatórios, enquanto que  $|z| > 3$  são considerados insatisfatórios. Se o  $|z|$  estiver entre 2 e 3, os resultados são considerados questionáveis. Em

resultados com uma incerteza da medição coincidente com a incerteza alvo a probabilidade do z-score posicionar-se entre -2 e 2 é de aproximadamente 95% [9], [11]

Pode ser ainda calculado o  $\zeta$ -score, através da equação 10. [10], [17]

$$\zeta = \frac{x_i - V_{ref}}{\sqrt{u(x_i)^2 + u(V_{ref})^2}} \quad (10)$$

Sendo que  $x_i$  se refere ao resultado estimado pelo laboratório,  $V_{ref}$  o valor de referência do material e  $u(x_i)$  e  $u(V_{ref})$  as incertezas padrão de  $x_i$  e  $V_{ref}$  respectivamente.

A interpretação do  $\zeta$ -score é análoga ao do z-score, em que valores de  $|\zeta| < 2$  são satisfatórios,  $|\zeta| > 3$  insatisfatórios e entre estes limites questionáveis. [17]

### 1.3.3. RASTREABILIDADE

A rastreabilidade é definida pelo VIM como a “propriedade dum resultado de medição pela qual tal resultado pode ser relacionado a uma referência através duma cadeia ininterrupta e documentada de calibrações, cada uma contribuindo para a incerteza da medição”. [16]

Esta cadeia ininterrupta consegue-se através do uso de materiais de referência, como padrões ou MRC, cujo valor de referência pode ser rastreado às unidades do sistema internacional (SI). Esta cadeia pode ser constituída por padrões primários que servem de referência para padrões secundários que, por sua vez, são usados para definir o valor de padrões de trabalho que são usados em rotina. A rastreabilidade a uma referência comum assegura que diferentes medições, realizadas em diferentes laboratórios e em diferentes ocasiões, são comparáveis.

Cada nível da cadeia de rastreabilidade adiciona incerteza aos valores de referência. A incerteza da medição depende em parte da incerteza do padrão usado.

As medições químicas são geralmente realizadas por comparação de sinais de padrões com os sinais de amostras, por exemplo através do uso de funções de calibração. [18]

#### 1.4. CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade geralmente descreve as medidas tomadas por um laboratório que asseguram a qualidade dos resultados de medições, como parte do sistema de qualidade. Este controlo é realizado de forma a conhecer e identificar as potenciais causas de erro e tentar eliminá-las assim como a existência de um sistema de deteção de erros. Os laboratórios devem implementar medidas de controlo de qualidade, que podem ser divididas em dois tipos diferentes, o controlo de qualidade interno e o controlo de qualidade externo.

O controlo de qualidade interno pode ser realizado através do controlo diversos parâmetros como ensaios em branco, padrões de controlo, amostras fortificadas, duplicados, etc. Os diferentes tipos de parâmetros controlados avaliam diferentes tipos de variação no procedimento de medição, por exemplo a análise de padrões de controlo podem indicar variações na veracidade do procedimento de medição.

O controlo de qualidade externo é realizado através de Ensaio Interlaboratoriais, que foram descritos anteriormente na seção 1.3.2.

Uma das ferramentas usada no controlo de tendências nos parâmetros de controlo de qualidade é o uso de cartas de controlo.[9], [19]

##### 1.4.1. CARTAS DE CONTROLO

A abordagem tradicional do controlo de qualidade envolvia a verificação do resultado individual sem avaliação das tendências ao longo do tempo. No entanto verificou-se que é mais eficiente seguir uma estratégia que preveja as tendências do

sistema analítico, através da recolha e processamento de informação do processo e se necessário, a correção de desvios antes destes afetarem o trabalho analítico. [20]–[22]

Com isto em mente foi proposto o uso de cartas de controlo como um meio gráfico de aplicar os princípios estatísticos da significância do desvio analítico. Estas processam dois tipos de efeitos, os aleatórios que contribuem para a variabilidade dos resultados e os sistemáticos que são responsáveis por desvios ao valor convencionalizado como verdadeiro da grandeza medida. Um processo diz-se estar sob controlo estatístico quando os desvios observados coincidem com o desempenho observado durante a validação e não se prevê alterações neste desempenho. Quando isso não acontece as causas devem ser identificadas e tomadas ações para corrigir a situação.[20]–[22]

Dos diversos tipos de cartas de controlo que podem ser elaboradas destacam-se, cartas de Médias ou Indivíduos, e as de Amplitude ou de Amplitude Móveis. Enquanto as primeiras, apresentam, ao longo do tempo, o valor de resultados individuais ou médias de um parâmetro, as segundas apresentam amplitudes de resultados de ensaios repetidos.[20]–[22]

Estas cartas tem geralmente 3 tipos diferentes de linhas, a linha Central e as Linhas do Limite de Controlo e Limite de Aviso. No caso de uma carta de Médias ou Indivíduos, estas representam a média dos valores compilados na carta,  $\bar{x} \pm 3 \times s$  e  $\bar{x} \pm 2 \times s$ , respectivamente. No caso das cartas de Amplitudes ou de Amplitudes Móveis, representam o zero,  $3.267 \times \bar{R}'$  e  $2.512 \times \bar{R}$ , respectivamente.[20]–[22]

O Limite de Aviso permite ao operador ser avisado quando o processo começa a apresentar uma maior variabilidade enquanto o Limite de Controlo permite detetar quando o processo deve ser parado e avaliada a causa do desvio. Em conjunto com estas linhas também devem ser avaliadas as tendências dos valores de modo a detetar desvios não aleatórios.[20]–[22]

## 1.5. AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

A incerteza da medição encontra-se definida na última edição do VIM como “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão de valores atribuídos a uma mensuranda, baseado na informação usada” Qualquer medição tem uma incerteza associada que resulta da combinação de diferentes efeitos aleatórios e sistemáticos que afetam as diversas fases da medição desde a amostragem à quantificação do item amostrado. Para uma medição ser adequada o resultado dessa medição tem de ser reportado com a respetiva incerteza, visto que esta quantifica a qualidade do resultado. Os laboratórios de ensaio acreditados segundo a Norma A NP EN ISSO/IEC 17025:2005 têm de evidenciar a capacidade de estimar a incerteza das medições do âmbito de acreditação. Esta avaliação tem de ser feita pormenorizadamente, sendo que o estudo detalhado das componentes de incerteza pode necessitar de um esforço demasiado grande. É então necessário adequar o esforço despendido na avaliação da incerteza ao objetivo pretendido. Um estudo preliminar consegue identificar as maiores contribuições para a incerteza e são nessas contribuições que a avaliação mais detalhada se deverá focar. [9], [16], [23]

A avaliação da incerteza da medição envolve o cumprimento sequencial de determinadas etapas, como está ilustrado na Figura 6, que possuem graus de exigência distintos. Primeiro é preciso especificar a mensuranda, que é definida no VIM como “grandeza que se pretende medir”. Em seguida vêm os passos teoricamente mais complexos: a identificação e a quantificação dos componentes de incerteza. Para a quantificação dos componentes de incerteza, é muitas vezes possível utilizar dados da validação ou do controlo de qualidade do ensaio, o que permite reduzir, em muito, o esforço necessário para estimar a incerteza. O passo seguinte é o cálculo da incerteza combinada, que quando é baseada na lei da propagação das incertezas requer que os diferentes componentes estejam quantificados na forma de incertezas padrão. A lei da propagação de incertezas define algoritmos para a combinação de componentes de incerteza. Por fim, utilizando um fator multiplicativo de expansão da incerteza padrão combinada, é estimada a incerteza expandida. [15], [16], [23]

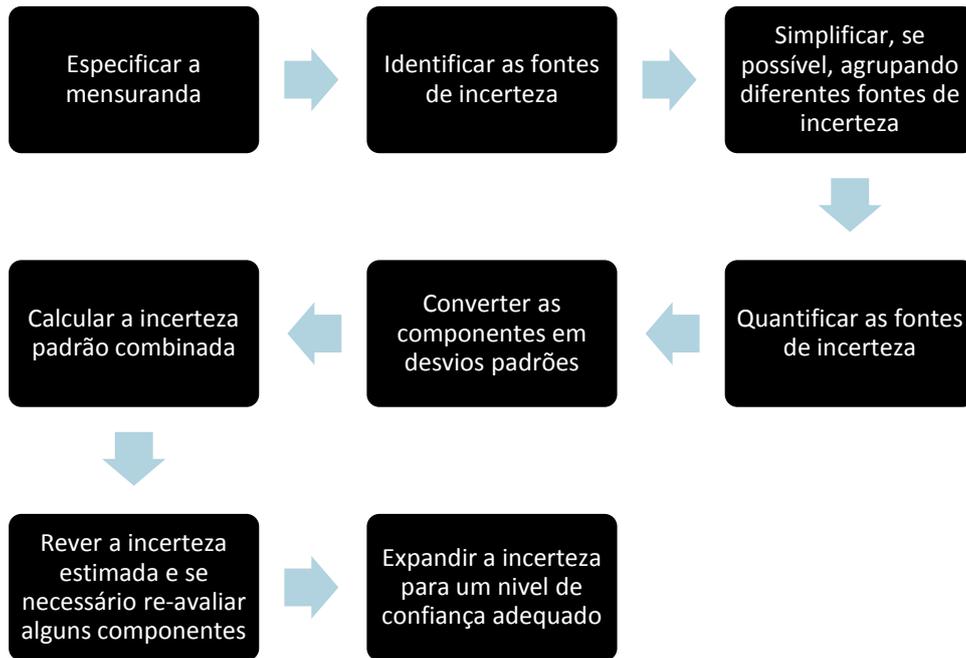


Figura 6 - Processo geral de determinação da incerteza de uma medição

Focando a atenção nos passos mais complexos e começando pela identificação das fontes de incerteza, é aconselhado listar as fontes de incerteza, começando pela expressão matemática usada no cálculo da melhor estimativa da mensuranda, designado modelo de medição. Todos os parâmetros desta expressão podem ser afetados de incerteza e portanto podem ser potenciais fontes de incerteza relevantes. No entanto existem alguns parâmetros que não aparecendo na expressão habitualmente usada no cálculo da mensuranda, afetam o resultado da medição e que também devem constar na listagem de fontes de incerteza. A maneira mais intuitiva de listar as fontes de incerteza é através de uma representação gráfica como um diagrama de causa/efeito, mais conhecido como diagrama de espinha de peixe. Os diagramas de causa/efeito evitam o esquecimento e a contabilização repetida de componentes de incerteza. Em seguida procede-se à atualização do modelo da medição considerando as novas fontes de incerteza identificadas. [15], [16], [23]

Tendo identificado as fontes de incerteza o passo seguinte é quantificá-las. Isto pode ser tipicamente feito de duas maneiras, através da avaliação da incerteza de cada componente, ou determinando contribuições combinadas de diferentes componentes. Sendo este um procedimento geral, foram desenvolvidas três tipos de abordagens, as subanalíticas, supralaboratorial e supra-analíticas.

A abordagem subanalítica baseia-se na identificação, quantificação e combinação de todas as componentes de incerteza associadas tanto aos erros aleatórios como aos erros sistemáticos que afetam diretamente o desempenho das várias etapas do método analítico. A maior desvantagem no uso desta abordagem prende-se com a dificuldade de aplicação a métodos analíticos complexos, nomeadamente à quantificação das fontes de incerteza complexas. A quantificação de componentes de incerteza complexas, como a digestão ou extração de analito da toma amostra, é difícil de isolar das outras componentes ditas simples devido à facilidade da sua modelação. Esta abordagem é assim mais exigente ao nível do domínio do conceito de incerteza. A vantagem principal da abordagem subanalítica é o permitir estimar a contribuição percentual das diversas fontes de incerteza. A avaliação subanalítica da medição permite uma maior compreensão do procedimento de medição do ponto de vista metrológico e também uma otimização da sua incerteza. As fontes de incerteza identificadas como minoritárias podem ser mais excluídas do cálculo da incerteza pois têm um impacto desprezável no resultado final. Já as fontes maioritárias podem ser otimizadas de forma a melhorar a qualidade da medição (i.e. reduzir a sua incerteza) ou reduzir os custos dos ensaios. [15], [23]

A abordagem supralaboratorial tem como objetivo a utilização de resultados de ensaios Interlaboratoriais para estimar a incerteza da medição. Esta abordagem baseia-se no facto de os erros sistemáticos e aleatórios gerados em ambientes intralaboratoriais serem observados como erros aleatórios ao nível supralaboratorial, logo mais facilmente quantificáveis. Esta abordagem apresenta também algumas desvantagens, em particular o facto de precisar de informação interlaboratorial e de sobrestimar a incerteza da medição estimável por uma avaliação subanalítica da medição. [15], [23]

A abordagem supra-analítica baseia-se na utilização de dados do desempenho global da medição, recolhidos durante a validação interna e controlo de qualidade do procedimento de medição, para estimar a incerteza da medição. Uma das abordagens supra-analíticas mais populares é a chamada abordagem da reconciliação. Esta abordagem combina a incerteza através de parâmetros do desempenho global da medição, obtidos em ambiente intralaboratorial, com a incerteza associada a fontes de

incerteza constantes durante os ensaios. Esta estratégia de avaliação da incerteza trás uma maior simplicidade à estimativa da incerteza da medição e permite que as componentes sejam estimadas usando exclusivamente dados obtidos no laboratório. No entanto, não é tão detalhada como a abordagem subanalítica e não permite estimar as contribuições percentuais das diversas etapas e processos analíticos. Na abordagem supra-analítica de avaliação da incerteza, bem como nas restantes estratégias de avaliação, é necessário ter em conta que a incerteza da medição varia ao longo da gama analítica. [15], [23]

A abordagem da reconciliação propõe a divisão da incerteza em três componentes: a incerteza quantificada pela precisão intermediária, a incerteza associada à recuperação média de analito e a incerteza associada às componentes mantidas constantes durante os estudos de precisão intermediária e recuperação de analito. A recuperação média de analito pode ter de ser combinada com componentes que tentam proteger a estimativa da incerteza de fragilidades das referências usadas nos estudos de recuperação como diferenças da matriz do MRC usado e das amostras habitualmente caracterizadas.[24]

A incerteza da precisão intermediária é geralmente estimada pelo desvio padrão de ensaios realizados nessas condições de precisão. A quantificação da componente associada à recuperação de analito do método é mais complexa e será discutida, mais à frente, neste trabalho. A recuperação de analito pode ser avaliada de diversas formas, nomeadamente através da análise de MRC' ou de amostras fortificadas. A recuperação de analito,  $R$ , pode ser dividida em três componentes:  $\bar{R}_m$  é a recuperação média de analito observada na análise das referencias estudadas,  $R_s$  é o fator de correção de  $\bar{R}_m$  que tem em conta as diferenças na recuperação de analito de uma amostra por comparação com a recuperação observada no material usado para estimar  $\bar{R}_m$  e  $R_{rep}$  é o fator de correção que tem em conta o facto do analito do item de referencia analisado poder comportar-se de maneira diferente do analito na amostra. Estes três componentes são combinados numa multiplicação:  $R = \bar{R}_m \times R_s \times R_{rep}$ . [15], [23], [24]

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

## 2.1. MATERIAL E REAGENTES

Neste ponto são descritos os materiais e reagentes usados em todo o procedimento de implementação, desenvolvimento e validação dos métodos.

Foram usados balões de vidro Normax, classe A de 10, 25 e 50 mL, pipetas graduadas Normax, classe A de 1,2,3 e 5 mL, soluções padrão monoelementares Merck de  $(1000 \pm 10)$  mg/L e ácido nítrico suprapuro Merck 65%.

Para os ensaios de fortificação foram ainda usadas amostras reais de águas naturais de superfície.

## 2.2. MÉTODO ANALÍTICO

### 2.2.1. IMPLEMENTAÇÃO, DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

A implementação das determinações no espectrómetro iCAP 7400 ICP-OES foi a primeira fase deste trabalho. Esta fase do trabalho é relevante visto que para além do instrumento ser novo também a técnica ICP-OES era nova para o laboratório. Foi necessário realizar um avanço faseado e com várias etapas, em que os resultados obtidos determinaram as alterações que gradualmente se fizeram. De seguida é feita uma descrição dessas etapas até à fase de validação.

O ICP-OES Thermo Scientific iCAP 7400 ICP-OES Duo usado é constituído por uma bomba peristáltica, um nebulizador de vidro concêntrico, uma câmara de nebulização ciclónica, uma tocha de quartzo, e um sistema ótico do tipo rede de echelle de dispersão cruzada de alta energia com um detetor RACID86. Este equipamento pode estudar a emissão radial ou axial do plasma de argón indutivamente acoplado.

Na primeira fase do trabalho foi necessário dispendir algum tempo na familiarização com o software do equipamento visando um domínio total do seu funcionamento, bem como avaliar a influência que alguns parâmetros (fluxos de

árgon, a potência da fonte de radiofrequências, o tempo de integração e a velocidade da bomba peristáltica) têm na qualidade dos resultados obtidos. Apesar do fabricante ter indicado os valores destes parâmetros, que considerava adequados para este tipo de amostra, havia interesse em conhecer a sua variabilidade e adquirir aprendizagem.

A fase seguinte foi a do estabelecimento de quais os metais e respectivas gamas de concentração que o Laboratório pretendia implementar, tendo por base as que já eram utilizadas nas técnicas de absorção atômica, bem como o conhecimento dos teores existentes nas amostras. Desta avaliação foram identificados 13 metais (Al, As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn), que se pretendiam implementar para a análise de águas naturais superficiais (provenientes de albufeiras e rios) e mais quatro (Ba, Ni, Ti e V) para a análise de águas naturais de profundidade, recolhidas em piezómetros. As gamas de concentração pretendidas para os 17 metais identificados encontram-se referidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Gamas de concentração definidas para a calibração do ICP-OES para a determinação de diversos metais em águas naturais superficiais e de profundidade.

<b>Elemento\Concentração</b>	<b>Concentração Inferior</b>	<b>Concentração Superior</b>
<b>Alumínio</b>	3 µg/L	30 µg/L
<b>Arsénio</b>	3 µg/L	30 µg/L
<b>Cádmio</b>	0,1 µg/L	4 µg/L
<b>Cálcio</b>	0,08 mg/L	50 mg/L
<b>Chumbo</b>	4 µg/L	20 µg/L
<b>Cobre</b>	2 µg/L	20 µg/L
<b>Crómio</b>	2 µg/L	20 µg/L
<b>Ferro</b>	0,005 mg/L	4 mg/L
<b>Magnésio</b>	0,09 mg/L	5 mg/L
<b>Manganês</b>	0,002 mg/L	1 mg/L
<b>Potássio</b>	0,1 mg/L	5 mg/L
<b>Sódio</b>	0,2 mg/L	10 mg/L
<b>Zinco</b>	0,015 mg/L	0,05 mg/L
<b>Bário</b>	0,005 mg/L	0,5 mg/L
<b>Níquel</b>	0,004 mg/L	1 mg/L
<b>Titânio</b>	5 µg/L	50 µg/L
<b>Vanádio</b>	5 µg/L	100 µg/L

Planeou-se começar o estudo com a implementação dos metais nas águas de superfície deixando os das amostras de piezômetros para uma segunda fase se ainda existisse disponibilidade de tempo, o que não viria a ocorrer.

Em seguida, foram recolhidos sinais instrumentais de padrões de calibração, em conjunto com brancos (água ultrapura acidificada com ácido nítrico a 0,2 %), utilizando os comprimentos de onda indicados na Tabela 2. A seleção destes comprimentos de onda foi feita tendo em conta o conhecimento profundo que o laboratório tem sobre a matriz das amostras de água natural e dos interferentes que podem afetar cada risca de emissão, recorrendo ao “software” do equipamento e à consulta do livro “Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water” [25]. Os comprimentos de onda estudados podem ser consultados na Tabela 2.

Em conjunto com a seleção dos comprimentos de onda de emissão foi selecionado o modo de leitura dessa emissão: modo radial e/ou axial. O modo de leitura radial permite determinações menos sensíveis mas também menos suscetíveis a interferências, enquanto que o modo axial é mais sensível e adequado a gamas de concentração na ordem dos µg/L mas também mais propenso a interferências.

Tabela 2 - Comprimentos de onda analisados e modos de leitura estudados por elemento

<b>Elemento</b>	<b>Comprimento de onda (nm)</b>	<b>Modo de leitura do plasma</b>
<b>Alumínio</b>	167,079	Axial
	308,215	
	396,152	
<b>Arsénio</b>	189,042	Axial
	193,759	
<b>Cádmio</b>	228,802	Axial
	226,502	
<b>Cálcio</b>	315,887	Radial
	396,847	
	184,006	
<b>Chumbo</b>	220,353	Axial
	216,999	
<b>Cobre</b>	327,396	Axial
	219,958	
<b>Crómio</b>	205,560	Axial
	267,716	

<b>Ferro</b>	238,204	Radial\Axial
	239,562	
<b>Magnésio</b>	285,213	Radial
	279,079	
<b>Manganês</b>	257,610	Radial\Axial
<b>Potássio</b>	766,490	Radial
	769,896	
<b>Sódio</b>	588,995	Radial
	589,592	
<b>Zinco</b>	213,856	Axial
	202,548	

Também foi estudada a introdução da amostra no plasma cuja eficiência é quantificada pelas contagens de emissão referentes a cada padrão e respectivo ensaio branco. Depois de alguns testes, optou-se por seguir as condições sugeridas pelo fabricante tanto para a introdução da amostra como para a operação do plasma. A Tabela 3 resume as condições instrumentais utilizadas.

Tabela 3 - Condições instrumentais do ICP-OES sugeridas pelo fabricante.

<b>Parâmetros</b>	<b>Valor</b>
<b>Potência da fonte de radiofrequências</b>	1150 W
<b>Tempo de exposição</b>	3s (Visível), 20s (Ultravioleta)
<b>Fluxo de árgon no nebulizador</b>	0,50 L/min
<b>Fluxo de árgon auxiliar</b>	0,50 L/min
<b>Velocidade da bomba peristáltica</b>	50 RPM (rotações por minuto)

Mesmo depois de definidas as condições de trabalho, de modo a compreender como estes parâmetros interferem no sinal instrumental, em particular no desempenho do plasma e da introdução da amostra, foram testadas variações de alguns destes parâmetros nos sinais de brancos e padrões de concentração igual à mais elevada da gama de concentração definida. Este estudo foi realizado para os elementos que são analisados em concentrações mais baixas da ordem de algumas unidades ou poucas dezenas de  $\mu\text{g/L}$ . Os parâmetros escolhidos foram os que afetam a

extensão da ionização e a introdução da amostra no plasma. A Tabela 4 apresenta os parâmetros e as variações dos seus valores consideradas.

Tabela 4 - Parâmetros instrumentais e respetivos valores testados no que respeita ao seu impacto na emissão característica dos elementos quantificados a menores concentrações.

<b>Parâmetro</b>	<b>Valor</b>
<b>Fluxo de árgon no nebulizador</b>	0,4 L/min
	0,5 L/min
	0,6 L/min
<b>Tempo de exposição</b>	3s (Visível), 20s (Ultravioleta)
	5s (Visível), 15 (Ultravioleta)
	7s (Visível), 10s (Ultravioleta)
<b>Velocidade da bomba peristáltica</b>	45 RPM
	50 RPM
	55 RPM

Adicionalmente foi utilizada a técnica Simplex para uma otimização multivariante dos parâmetros instrumentais, não se tendo concluído que as condições ótimas eram significativamente diferentes das indicadas pelo fabricante.

A única alteração realizada às condições proposta pelo fabricante refere-se à gestão da velocidade da bomba peristáltica, que inicialmente foi aumentada para uma rotação de 70 RPM, que permite a mais rápida aspiração da amostra até ao início da leitura, passando aí para uma rotação de 50 RPM até ao fim da leitura.

Foi desenvolvida, nesta fase uma instrução técnica que descreve todo o processo de funcionamento do instrumento incluindo a manipulação do *software* utilizado.

Com as condições experimentais estabelecidas procedeu-se a uma avaliação da linearidade da variação do sinal instrumental com a concentração nas gamas pretendidas. Esta avaliação começou com a preparação dos padrões ou calibradores: o branco e três padrões com concentrações acima do limite de quantificação esperado. O primeiro padrão, depois do branco, corresponde à concentração mais baixa que se pretende quantificar a partir daqui designada como concentração ao LQ e consequentemente o padrão ao LQ. Esta concentração deverá ser igual ou superior ao Limite de Quantificação que poderia ser determinado estatisticamente. O segundo

padrão corresponde à concentração central ou intermédia da gama, apesar de poder não coincidir com o centro da gama que começa no sinal branco. Por último, o terceiro padrão com a concentração mais elevada da gama de trabalho pretendida é a partir daqui designado como concentração de topo e conseqüentemente o padrão como padrão do topo. Idealmente os padrões, desde o branco ao padrão de topo devem corresponder a incrementos equivalentes de concentração.

Numa primeira fase, o Arsénio foi retirado desta avaliação devido à reduzida sensibilidade instrumental.

No que respeita à linearidade, concluiu-se que devido à extensão das gamas testadas algumas destas apresentam variações não lineares do sinal com a concentração. Tendo isto em conta, as gamas foram divididas em duas porções nas esperanças de cada uma destas ter um comportamento linear. Esta situação verificou-se em todos os elementos com exceção do cobre e crómio.

Depois da redefinição das gamas de calibração, procedeu-se à avaliação da linearidade das gamas escolhidas, começando pelas gamas de concentrações mais baixas. Estas gamas foram estudadas com 6 padrões de calibração equidistantes incluindo o branco. Nesta fase foi também iniciada a monitorização diária da sensibilidade do instrumento para verificar se esta se mantém aproximadamente constante. Esta monitorização é realizada logo após se ligar o aparelho através da leitura de um branco e de um padrão multielementar com a concentração mais alta da gama de trabalho de todos os elementos. O sinal do padrão multielementar (em contagens por segundo) é depois controlado através de parâmetros estatísticos.

As curvas de calibração do alumínio e do zinco apresentavam desvios à linearidade que parecem ser causadas por contaminações ou interferentes. Para identificar a possível causa deste problema foram preparados padrões de calibração mono-elementares destes dois elementos. Os novos padrões produziram curvas de calibração lineares com coeficientes de correlação de Pearson elevados. Com este resultado e dado que foram avaliadas 3 a 2 comprimentos de onda com comportamentos semelhantes, conclui-se que a contaminação poderia provir dos padrões dos outros elementos ou de uma fonte de contaminação externa como material de vidro contaminado. Optou-se por excluir a análise de alumínio e zinco

deste estudo devido à necessidade de preparação de padrões exclusivamente com estes elementos.

Foram também identificadas dificuldades na sensibilidade da determinação de cádmio o que levou a decisão de não estudar este elemento antes de uma otimização da sua resposta.

As gamas de trabalho anteriormente apresentadas foram modificadas por exclusão de alguns elementos e redução das gamas de calibração para gamas com uma razão das concentrações do último e segundo padrões de calibração menores que 10. O primeiro padrão de calibração consiste no branco. A redução da amplitude das gamas tem como objetivo permitir um aumento linear do sinal instrumental com a concentração, e a mesma amplitude relativa das gamas tem como objetivo facilitar a preparação dos padrões multielementares. Assim definiram-se as gamas de calibração apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Gamas de calibração validadas da determinação de diversos elementos por ICP-OES. Esta tabela também apresenta o modo de leitura da emissão considerado.

<b>Elemento</b>	<b>Gama de trabalho</b>	<b>Modo de Leitura</b>
<b>Cálcio</b>	0,2 – 2 mg/L	Radial
	2-60 mg/L	
<b>Cobre</b>	4-20 µg/L	Axial
<b>Crómio</b>	2-20 µg/L	Axial
<b>Ferro</b>	10-100 µg/L	Axial
	0,1-1 mg/L	Radial
<b>Magnésio</b>	0,2-2 mg/L	Radial
	2-60 mg/L	
<b>Manganês</b>	4-20 µg/L	Axial
	20-200 µg/L	
<b>Potássio</b>	0,4-2 mg/L	Radial
	2-20 mg/L	
<b>Sódio</b>	0,5-5 mg/L	Radial
	5-50 mg/L	

Estas gamas de calibração foram validadas com vista a determinar se as quantificações realizadas podem ser adequadas ao objetivo em vista; i.e. à

caracterização de águas naturais. Os resultados da validação foram posteriormente usados para definir o controlo da qualidade dos ensaios de rotina.

Após os estudos de validação que serão detalhados nas próximas alíneas, foram detetados défices ao nível da recuperação de cálcio e magnésio na parte superior da gama de calibração entre 2-60 mg/L. Tendo em conta que estes desvios indicam uma falta de linearidade da resposta instrumental não detetada pela representação gráfica da curva de calibração e cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson, optou-se por reduzir a gama de calibração destes elementos para 2-6 mg/L. A determinação de magnésio nesta gama não foi validada por uma questão de tempo. A avaliação estatística da linearidade da resposta instrumental recorrendo a testes ANOVA-LOF ou  $\chi^2$  deveria ter sido capaz de antecipar o desvio observado.

A última etapa do desenvolvimento do método de análise foi a seleção do comprimentos de onda a utilizar no futuro. Considerando a generalidade dos parâmetros avaliados na validação dos métodos, o desempenho das medições realizadas recorrendo às riscas de emissão estudadas dos diversos elementos foi semelhante, tendo-se optado por usar o comprimento de onda mais sensível em ambas as gamas de trabalho. Isso foi possível em todos os elementos com exceção do cálcio, no qual se optou por, na gama de maior concentração, utilizar um comprimento de onda menos sensível.

Já em relação ao modo de leitura das emissões dos diferentes elementos nas gamas estudadas apenas no ferro o modo de leitura varia com a gama de calibração: a gama de concentração mais baixa envolve leituras em modo axial e a gama de concentração mais alta em modo radial. A Tabela 6 apresenta os parâmetros instrumentais mais relevantes definidos para a calibração das determinações dos diversos elementos nas diversas gamas de concentração.

Tabela 6 - Gamas de trabalho, modo de leitura e comprimentos de onda escolhido para determinação de diversos elementos em águas naturais por ICP-OES.

<b>Elemento</b>	<b>Gama de trabalho</b>	<b>Modo de Leitura</b>	<b>Comprimentos de onda seleccionados (nm)</b>
Cálcio	0,2 – 2 mg/L	Radial	317,933
	2-60 mg/L		315,887
Cobre	4-20 µg/L	Axial	324,754
Crómio	2-20 µg/L	Axial	267,716
Ferro	10-100 µg/L	Axial	259,940
	0,1-1 mg/L	Radial	
Magnésio	0,2-2 mg/L	Radial	285,210
Manganês	4-20 µg/L	Axial	257,610
	20-200 µg/L		
Potássio	0,4-2 mg/L	Radial	766,490
	2-20 mg/L		
Sódio	0,5-5 mg/L	Radial	589,592
	5-50 mg/L		

### 2.2.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

As condições operatórias utilizadas, em particular os comprimentos de onda e modo de leitura para cada gama de trabalho e elemento, foram descritas anteriormente.

Em síntese, o método analítico começa com a filtração e acidificação das amostras a 0,2 % de ácido nítrico suprapuro. As amostras são caracterizadas por ICP-OES, após a calibração do instrumento com 6 padrões de calibração incluindo o ensaio branco.

A preparação dos padrões de calibração foi dividida em dois grupos, o primeiro para as gamas de concentração mais baixas de cada elemento e o segundo com as gamas de concentração mais elevadas, como é possível verificar nos esquemas apresentados nos Anexos 1 e 2. Nestes esquemas está ainda representada a preparação dos padrões de controlo. Os padrões usados nos ensaios de fortificação são preparados de modo análogo.

As gamas de concentração calibradas podem ser reduzidas de corrida para corrida dependendo das necessidades.

O controlo da qualidade dos ensaios de rotina deve ser realizado usando as ferramentas e critérios definidos, e quando observados desvios relevantes no desempenho, devem ser tomadas ações adequadas.

### 3. TRATAMENTO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Os dados da validação dos métodos de medição desenvolvidos para a análise de metais (Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, Mg, K e Na) em águas naturais por ICP-OES são apresentados em seguida.

### 3.1. LIMIARES ANALÍTICOS

Começou-se por avaliar os limiares analíticos dos métodos de quantificação de cada metal através da quantificação de ensaios branco. Foram quantificados entre 10 a 20 ensaios branco, em condições de precisão intermediária, por elemento e gama de calibração com exceção da gama de cálcio entre 2 a 6 mg/L. O LD e o LQ foram estimados de acordo com as equações (6) e (7), respetivamente. Na Tabela 7 são apresentados os LD e LQ para os diferentes elementos e gamas de concentração.

Tabela 7 - Limites de detecção e quantificação estimados para cada elemento e gama de calibração

Elemento	Gama de calibração	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Unidades
<b>Ca</b>	0,2-2	0,021	0,095	mg/L
	2-6	0,001	0,041	mg/L
<b>Cu</b>	4-20	1,151	3,638	µg/L
<b>Cr</b>	2-20	0,604	1,968	µg/L
<b>Fe</b>	10-100	1,500	5,619	µg/L
	0,1-1	0,017	0,056	mg/L
<b>Mg</b>	0,2-2	0,019	0,075	mg/L
<b>Mn</b>	4-20	0,322	1,252	µg/L
	20-200	3,022	12,46	µg/L
<b>K</b>	0,4-2	0,099	0,378	mg/L
	2-20	0,342	1,175	mg/L
<b>Na</b>	0,5-5	0,077	0,228	mg/L
	5-50	0,401	2,140	mg/L

Para os elementos que foram estudados a duas gamas de calibração, os LD e LQ estimados para a gama mais baixa definem os limiares analíticos da determinação do elemento. Pode ainda ser evidenciado que, com exceção do cálcio, todos os LD e LQ da gama de concentração mais alta são superiores aos da gama de concentração mais baixa. Os menores limiares analíticos estimados para as gamas com menores concentrações são explicados pelo aumento da variância da resposta instrumental com a concentração como será observado mais à frente. O caso do cálcio justifica-se com o número reduzido de medições usadas no cálculo dos LD e LQ que são afetados por uma grande variabilidade. A adequação das gamas de calibração definidas foi avaliada também considerando o LQ estimado. Optou-se por calibrar o instrumento com padrões de calibração, excluindo o branco, com concentrações superiores ao LQ. No caso do cobre, inicialmente, o segundo padrão de calibração possuía uma concentração de 2 µg/L que era menor que o LQ estimado.

### 3.2. LINEARIDADE

A linearidade foi avaliada, de forma pragmática, através do cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson ao quadrado,  $r^2$ , e da construção de um gráfico de residuais (Anexo 3 a Anexo 15). Considerou-se que o  $r^2$  deve ser superior a 0,995.

O gráfico de residuais é a representação gráfica dos desvios dos pontos experimentais à curva de calibração traçada. Na Figura 7 estão representados os gráficos de residuais, concentração versus  $x_i - \hat{x}_i$ , em que  $x_i$  representa a concentração esperada e  $\hat{x}_i$  a concentração estimada pela calibração de cada padrão.

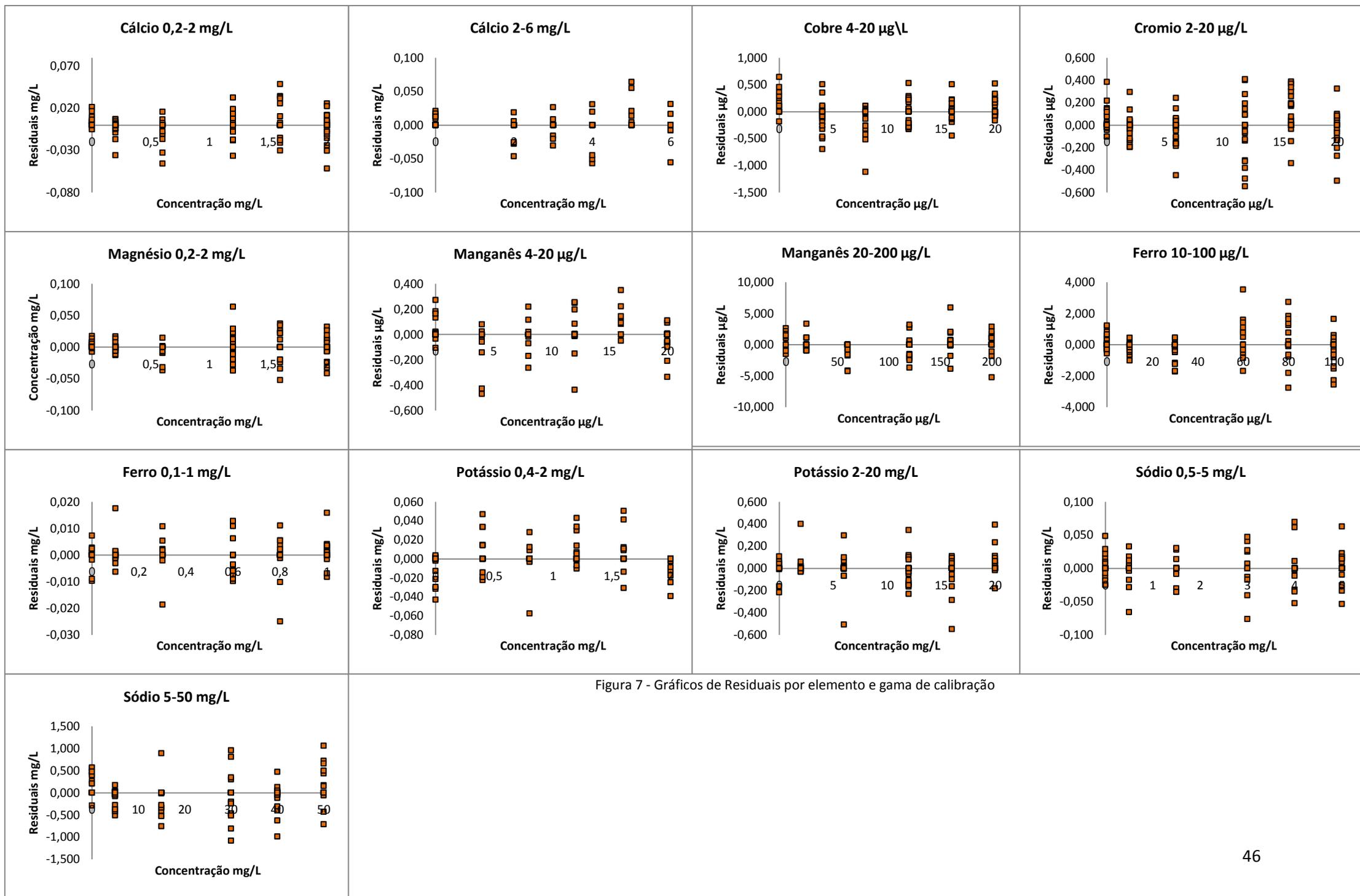


Figura 7 - Gráficos de Residuais por elemento e gama de calibração

Idealmente o gráfico de residuais deve apresentar uma distribuição aleatória dos pontos igualmente acima e abaixo do residual 0. Em nenhum gráfico se verifica um desvio claro a uma distribuição aleatória dos residuais, o que é indicador da linearidade da resposta instrumental nas gamas de calibração. É de notar o aumento da variância dos resultados com a concentração que sugerem que a variância da resposta instrumental é heteroscedástica. Em teoria, a homoscedasticidade dos dados é um dos pressupostos base para a aplicação do método dos mínimos quadrados, e quando isso não se verifica deve ser utilizado um modelo ponderado. No entanto, quando a resposta instrumental varia linearmente com a concentração, o declive e a ordenada na origem estimados pelos modelos de regressão linear não ponderado (conhecido como método dos mínimos quadrados) e ponderado não é significativamente diferente, como discutido no livro *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*[26] e no artigo “Worst Case Uncertainty Estimates for Routine Instrumental Analysis”[27]. Apenas é necessário utilizar métodos de regressão ponderados em gamas heteroscedásticas quando o modelo de regressão também é chamado a estimar a incerteza de interpolação do sinal das amostras.

### 3.3. PRECISÃO

Neste trabalho, foi avaliada não só a precisão intermediária mas também a repetibilidade. A reprodutibilidade não foi avaliada porque o desempenho do método foi determinado e é controlado em ambiente intralaboratorial.

Para a determinação do desvio padrão da precisão intermediária,  $s_{pi}$ , foram analisados, por calibração diária, Padrões de Controlo (PC) (Anexo 3 a Anexo 15) com uma concentração conhecida próxima do centro da gama de calibração.

O desvio padrão é uma medida da dispersão dos resultados de uma medição. O desvio padrão é representado pela letra grega sigma,  $\sigma$ , e o desvio padrão de uma população é representado por  $s$ . O desvio padrão das concentrações estimadas foi determinado, através da equação 11, depois de retirados os valores aberrantes (Anexo

2) caso existam. Este desvio padrão foi então dividido pela média das concentrações estimadas do PC,  $\bar{C}_{PC}$ , para assim se obter a precisão intermediária relativa,  $s'_{pi}$ , de acordo com a equação 12.

$$s_{pi} = s_{PC} \quad (11)$$

$$s'_{pi} = \frac{s_{pi}}{\bar{C}_{PC}} \quad (12)$$

A repetibilidade por seu lado foi avaliada recorrendo à análise de amostras em duplicado obtidas em condições de repetibilidade, utilizando as equações 13 e 14.

$$s_{rep} = \frac{\bar{R}}{1.128} \quad (13)$$

$$s'_{rep} = \frac{\bar{R}'}{1.128} \quad (14)$$

Em que  $s_{rep}$  e  $s'_{rep}$  são os desvio padrão absoluto e relativo da repetibilidade da medição, e  $\bar{R}$  e  $\bar{R}'$  são as amplitude média absoluta e relativas dos duplicados respetivamente.

A Tabela 8 apresenta os valores quantitativos da repetibilidade e precisão intermediária das medições estimadas por elemento e gama de trabalho.

Tabela 8 - Valores quantitativos da repetibilidade e precisão Intermediária as medições dos vários elementos nas gamas estudadas.

Elemento	Gama de calibração	$s_{rep}$	$s'_{rep}$	$s_{pi}$	$s'_{pi}$
Ca	0,2-2 mg/L	0,017 mg/L	0,020	0,031 mg/L	0,032
	2-6 mg/L	0,045 mg/L	0,014	0,045 mg/L	0,011
Cu	4-20 µg/L	0,227 µg/L	0,026	0,589 µg/L	0,050
Cr	2-20 µg/L	0,167 µg/L	0,029	0,316 µg/L	0,031
Fe	10-100 µg/L	0,637 µg/L	0,023	2,284 µg/L	0,046
	0,1-1 mg/L	0,004 mg/L	0,012	0,013 mg/L	0,026
Mg	0,2-2 mg/L	0,006 mg/L	0,014	0,038 mg/L	0,040

<b>Mn</b>	4-20 µg/L	0,094 µg/L	0,010	0,307 µg/L	0,026
	20-200 µg/L	0,622 µg/L	0,009	2,881 µg/L	0,029
<b>K</b>	0,4-2 mg/L	0,033 mg/L	0,033	0,057 mg/L	0,047
	2-20 mg/L	0,070 mg/L	0,011	0,220 mg/L	0,022
<b>Na</b>	0,5-5 mg/L	0,036 mg/L	0,016	0,112 mg/L	0,045
	5-50 mg/L	0,099 mg/L	0,010	0,521 mg/L	0,021

De notar que, como seria de esperar, a repetibilidade é inferior à precisão intermediária dado que em condições de precisão intermediária também são aleatorizados os efeitos sistemáticos que afetam as quantificações realizadas em diferentes dias.

### 3.4. VERACIDADE

A veracidade da análise de águas naturais foi avaliada a partir de ensaios de fortificação que envolvem a adição de uma quantidade conhecida de analito a uma amostra e consequente comparação da concentração esperada com a concentração estimada de analito.

Os ensaios de fortificação envolvem a determinação da recuperação de analito que estima o erro da medição. Se a recuperação média for estimada através de um número elevado de ensaios replicados realizados em diversos dias, visto que os efeitos aleatórios que afetam a média são desprezáveis, esta média permite uma quantificação dos efeitos sistemáticos.

Considerando a metodologia seguida para a fortificação de amostras com analito nativo, a recuperação é calculada de acordo com a equação 15.

$$R = \frac{C_{obs} - \left( C_{nativa} \times \frac{(V_6 - (V_5 + V_9))}{V_6} \right)}{C_{fort}} \quad (15)$$

Em que  $C_{obs}$  refere-se à concentração estimada da amostra fortificada,  $C_{nativa}$  à concentração da amostra antes da fortificação,  $V_5$  ao volume da solução mãe de analito adicionado à amostra,  $V_9$  ao volume de outras soluções que não do analito adicionado à amostra,  $V_6$  ao volume do balão usado para diluir  $V_5$  e  $V_9$  no volume de amostra ( $V_6 - (V_5 + V_9)$ ) e  $C_{fort}$  à concentração da fortificação. A  $C_{fort}$  é determinada pela multiplicação da concentração da solução de analito mãe,  $C_{sk}$ , pela razão  $V_5/V_6$ . Os dados dos ensaios de recuperação podem ser consultados no Anexo 3 a Anexo 15.

### 3.5. CONTROLO DE QUALIDADE

Na sequência da validação do método foram definidos critérios de controlo de qualidade dos ensaios, desde a fase de otimização do instrumento até à análise de ensaios de fortificação.

A Tabela 9 apresenta a estratégia geral proposta para o controlo interno da qualidade dos ensaios.

Tabela 9 - Ferramentas e parâmetros usados no controlo interno de qualidade implementado. Esta tabela apresenta a frequência e alguns critérios de utilização destas ferramentas.

Parâmetro	Periodicidade	Critério
<b>Ensaio branco</b>	Uma vez por sessão, no início da sessão	Definido por critérios estatísticos baseado no histórico
<b>Padrão do Topo</b>	Uma vez por sessão, no início da sessão	Definido por critérios estatísticos baseado no histórico Análise visual da representação gráfica
<b>Curva de Calibração</b>	Uma vez por sessão	da Curva de Calibração e análise do valor de $r^2$ que deve ser superior a 0,995
<b>Desvio Padrão Relativo dos sinais dos Padrões de Calibração</b>	Uma vez por sessão, após leitura dos padrões de calibração	O desvio padrão relativo máximo dos padrões lidos igual a 10 % no caso de gamas de concentração na ordem dos mg/L e 15%

		no caso de gamas de concentração na ordem dos µg/L
<b>Padrão de Controlo</b>	Após a calibração e de 10 em 10 ensaios	Carta de Controlo
<b>Padrão ao Limite de Quantificação</b>	Após a curva de calibração	Carta de Controlo
<b>Análise em Duplicado</b>	Uma vez por sessão	Definido por critérios estatísticos baseados no histórico
<b>Ensaio de Recuperação</b>	Uma vez por sessão	Compatibilidade entre recuperação estimada e valor ideal de 100 %

### 3.5.1. CONTROLO DA SENSIBILIDADE DO ICP-OES

Para garantir que as condições em que as análises são realizadas se mantêm aproximadamente as mesmas em termos de sensibilidade, foram analisados no início de cada sessão de trabalho um ensaio branco e um padrão de controlo com concentração igual ao padrão de concentração mais elevado da gama de calibração. Isto é feito para que seja controlada a ocorrência de contaminações, pela análise do ensaio branco, e para verificar se a sensibilidade se mantêm sob controlo, pela análise do padrão de topo.

Foram então estimados limites estatísticos para os sinais destas duas soluções, um Limite Superior (LS) e Inferior (LI) para cada solução, como representado nas equações 16 e 17.

$$LS = \bar{x} + t_{95\%} \times s \quad (16)$$

$$LI = \bar{x} - t_{95\%} \times s \quad (17)$$

Em que  $\bar{x}$  se refere à média do historial de sinais (expressos em contagens por segundo),  $s$  ao desvio padrão dos sinais e  $t_{95\%}$  à distribuição t-student bilateral para um nível de confiança de 95% e um número adequado de graus de liberdade.

Este controlo de qualidade pode também ser feito através do uso de uma carta de controlo.

A Tabela 10 apresenta os valores dos limites LS e LI dos sinais do branco e padrão de topo para todos os elementos e gamas de trabalho estudadas.

Tabela 10 – Critérios de aceitação dos sinais de brancos e padrões de topo usados para monitorizar a otimização das condições instrumentais.

Elemento	Gama de trabalho	Ensaio em Branco		Padrão Topo	
		LI (cps)	LS (cps)	LI (cps)	LS (cps)
Ca	0.2-2 mg/L	-18,9	34,1	3621	4659,
	2-6 mg/L	-6,7	46,7	5378	7239
Cu	4-20 µg/L	333,7	477,0	1405	1689
Cr	2-20 µg/L	6,0	30,1	632	868
Fe	10-100 µg/L	-3,6	35,6	3448	4275
	0.1-1 mg/L	-4,7	5,4	1130	1764
Mg	0.2-2 mg/L	-15,9	13,8	5866	8556
Mn	4-20 µg/L	-11,5	65,7	4078	5157
	20-200 µg/L	-7,6	54,9	4748	70789
K	0.4-2 mg/L	-26,0	100,1	1149	1289
	2-20 mg/L	-18,9	88,3	10018	12145
Na	0.5-5 mg/L	-75,3	117,1	5329	11303
	5-50 mg/L	-29,1	101,6	47596	95918

### 3.5.2. CONTROLO DA CALIBRAÇÃO ANALÍTICA

Após terem sido lidos os padrões de calibração, as curvas de calibração devem ser avaliadas, não só pela sua representação gráfica, mas também através da análise do valor de  $r^2$  que deve ser superior a 0,995. Nesta altura devem também ser avaliados os desvios padrão relativos das réplicas dos sinais dos calibradores, que devem ser no

máximo 10 % ou 15 % dependendo da ordem de grandeza das concentrações estudadas.

A avaliação da calibração é complementada com a análise de padrões de controlo ao limite de quantificação e com uma concentração posicionada a meio da gama de calibração. No caso de elementos estudados a duas gamas de concentração, com exceção do Ferro dado que o modo de leitura é diferente para ambas as gamas, apenas foi controlado o Padrão ao Limite de Quantificação para a gama de concentração mais baixa. O padrão de controlo é ainda lido de 10 em 10 amostras. As concentrações estimadas dos padrões de controlo são controladas através de uma carta de controlo (Anexo 3 a Anexo 15).

A análise das cartas de controlo construídas (Anexo 3 a Anexo 15) indica que o processo analítico esteve sob controlo estatístico visto que pontualmente alguns valores se posicionam acima ou abaixo das linhas de aviso mas nunca para além das linhas de controlo. Verifica-se ainda a presença de algumas tendências, que devem ser monitorizadas de futuro. Sugere-se o acompanhamento do aumento da concentração estimada do padrão de controlo ao Limite de Quantificação na determinação de cálcio entre 0,2 mg/L e 2 mg/L, e do possível aumento da precisão da determinação do magnésio no padrão de controlo ao Limite de Quantificação na gama de 0,2 mg/L e 2 mg/L.

### 3.5.3. CONTROLO DA REPETIBILIDADE DA MEDIÇÃO

Foram ainda definidos critérios para a análise de duplicados. O critério é definido estatisticamente pela seguinte condição.

$$R' \leq 3.267 \times \bar{R}' \quad (18)$$

Em que  $R'$  representa a amplitude relativa (i.e. o módulo da diferença a dividir pela média dos valores) dos resultados duplicados estimados para controlo da qualidade dos ensaios e  $\bar{R}'$  a média de um historial de duplicados. Esta condição está definida para um nível de confiança de 99%.

Tabela 11 - Critérios de aceitação da amplitude de duplicados obtidos em condições de repetibilidade na gama de calibração

Elemento	Gama de trabalho	Critério de Duplicados
<b>Ca</b>	0.2-2 mg/L	0.075
	2-6 mg/L	0.051
<b>Cu</b>	4-20 µg/L	0,096
<b>Cr</b>	2-20 µg/L	0,109
<b>Fe</b>	10-100 µg/L	0,085
	0.1-1 mg/L	0,046
<b>Mg</b>	0.2-2 mg/L	0,051
<b>Mn</b>	4-20 µg/L	0,037
	20-200 µg/L	0,035
<b>K</b>	0.4-2 mg/L	0,122
	2-20 mg/L	0,040
<b>Na</b>	0.5-5 mg/L	0,058
	5-50 mg/L	0,038

A diferença entre duas amostras em condições de repetibilidade nunca pode ser superior ao valor do critério. Este parâmetro pode também ser controlado através do uso de cartas de controlo de amplitudes.

#### 3.5.4. ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO

A qualidade de todo o processo analítico, incluindo a robustez a interferências de matriz que podem ocorrer na análise de amostras reais, foi controlada através da análise pontual de amostras fortificadas. O critério definido para este controlo é a inclusão do valor ideal de recuperação (i.e. 100%) no intervalo de confiança da recuperação única estimada considerando a respetiva incerteza. Esta incerteza tem em

conta a precisão intermediária das medições e a incerteza associada ao processo de adição de padrão.

#### 4. AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DA MEDIÇÃO

A incerteza da medição foi avaliada de acordo com os princípios da abordagem da reconciliação [23], [24], tendo sido desenvolvida uma metodologia para estimar a incerteza da recuperação média com base em ensaios de fortificação efetuados sobre diferentes amostras com analito nativo.

#### 4.1. IDENTIFICAÇÃO DA MENSURANDA

A mensuranda estudada consiste na concentração mássica de um determinado elemento (Ca, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, K, Na) solúvel na amostra de água natural analisada. O teor de metal nas partículas retidas no processo de filtração não é considerado na definição da mensuranda.

#### 4.2. MODELO DE MEDIÇÃO

O modelo de medição consiste na “relação matemática entre todas as grandezas que se sabe estarem envolvidas numa medição”. [16]

O modelo de medição destes métodos é apresentado na equação 19.

$$C = \frac{(S - b)}{m} \times f_{dil} \times R_m \quad (19)$$

em que  $C$  representa a concentração estimada da amostra,  $S$  o sinal instrumental da leitura da amostra,  $b$  a ordenada na origem da curva de calibração,  $m$  o declive da mesma curva,  $f_{dil}$  o factor de diluição da amostra e  $R_m$  a recuperação média observada de analito.  $R_m$  é igual a 1 se não for significativamente diferente de 100 %.

#### 4.3. IDENTIFICAÇÃO DAS FONTES DE INCERTEZA

A identificação das fontes de incerteza é facilitada pela utilização de um diagrama de causa/efeito. O diagrama relativo aos métodos em causa está representado na Figura 8. A relevância da estimativa da recuperação média de analito para o processo

de medição está refletida no vetor designado como “veracidade”. Apesar de acordo com a última edição do VIM a veracidade ser um conceito qualitativo, a recuperação média de um número elevado de réplicas permite uma boa estimativa dos efeitos sistemáticos tratados no conceito de veracidade.

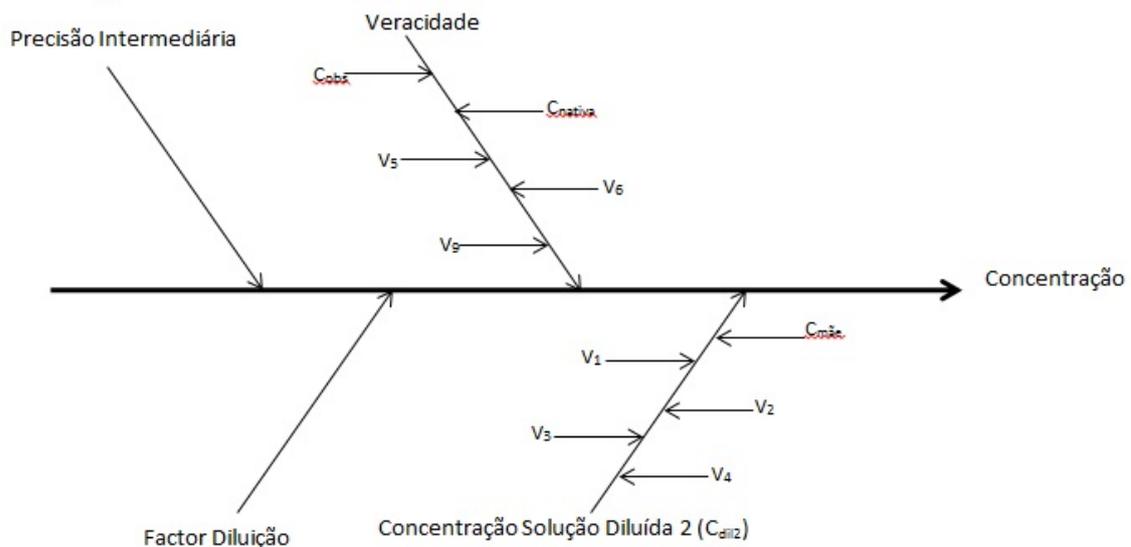


Figura 8 - Diagrama de causa e efeito da abordagem da reconciliação

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DAS COMPONENTES DE INCERTEZA

A quantificação da incerteza da medição realizada baseia-se nos princípios da abordagem da reconciliação, que como descrito anteriormente, estima componentes de incerteza relevantes com base em parâmetros do desempenho global da medição. Esta abordagem propõe que a incerteza da medição seja determinada por combinação de três componentes: a precisão intermediária, a recuperação de analito e uma componente adicional que reflete efeitos relevantes não incluídas nos estudos de precisão intermediária e recuperação realizados. Considerando que estas componentes são constantes na gama analítica na forma relativa, a incerteza padrão relativa combinada,  $u'_c$ , é estimada pela equação

$$u'_c = \sqrt{u'^2_{pi} + u'^2_{\bar{R}} + u'^2_{outras}} \quad (20)$$

Em que  $u'_{pi}$  é a incerteza padrão relativa da precisão intermediária,  $u'_{\bar{R}}$  a incerteza padrão relativa associada à recuperação média estimada e  $u'_{outras}$  a incerteza padrão relativa associada às componentes não contabilizadas pelos termos anteriores.

Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para estimar a incerteza da recuperação média de analito estimada através da análise de diferentes amostras com analito nativo após a fortificação a diversos níveis de analito. A bibliografia não propõe uma forma de estimar a incerteza da recuperação média recorrendo a este tipo de informação.

Após a consulta do relatório do projecto “VAM 3.2.1” [24], que trata os princípios da abordagem da reconciliação, em particular de como devem ser estimadas as diferentes componentes da incerteza, encontra-se uma lacuna no documento na estimativa da incerteza da recuperação média. Para estimar a incerteza da recuperação média são propostas diferentes abordagens dependendo do tipo de amostras disponíveis ou dos ensaios realizados. Estas podem ser estimadas através da análise de MRC's, usando as equações 21 e 22:

$$\bar{R} = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{MRC}} \quad (21)$$

$$u(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{MRC})}{C_{MRC}}\right)^2} \quad (22)$$

sendo que  $\bar{C}_{obs}$  representa a média dos teores estimados do MRC,  $C_{MRC}$  o valor certificado do MRC,  $s_{obs}$  o desvio padrão dos resultados das análises ao MRC,  $n$  o número de réplicas e  $u(C_{MRC})$  a incerteza padrão do valor certificado do MRC. Se a recuperação média for estimada com base na análise de amostra fortificadas sem analito nativo, considerando o mesmo nível de fortificação, a recuperação média e respetiva incerteza pode ser estimada pelas Equação 23 e 24:

$$\bar{R} = \frac{\bar{C}_{obs}}{C_{spike}} \quad (23)$$

$$u(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2}{n \times \bar{C}_{obs}^2}\right) + \left(\frac{u(C_{spike})}{C_{spike}}\right)^2} \quad (24)$$

sendo que  $\bar{C}_{obs}$  representa a média do teor estimado da amostra fortificada,  $C_{spike}$  a concentração da amostra fortificada,  $s_{obs}$  o desvio padrão dos resultados estimados da amostra fortificada e  $u(C_{spike})$  a incerteza padrão da concentração fortificada. Caso a amostra fortificada seja a mesma e esta tenha um teor nativo sugere-se a utilização das equações 25 e 26:

$$\bar{R} = \frac{\bar{C}_{obs} - \bar{C}_{nativa}}{C_{spike}} \quad (25)$$

$$u(\bar{R}) = \bar{R} \times \sqrt{\left(\frac{s_{obs}^2/n + s_{nativa}^2}{(\bar{C}_{obs} - \bar{C}_{nativa})^2}\right) + \left(\frac{u(C_{spike})}{C_{spike}}\right)^2} \quad (26)$$

sendo que  $\bar{C}_{nativa}$  representa a concentração média estimada de analito nativo e  $s_{nativo}$  o desvio padrão das estimativas de teor nativo.

Caso a mesma amostra com analito nativo seja fortificada a diversos níveis de fortificação ( $C_{spike(i)}$ ) sugere-se o uso das equações 27 e 28:

$$\bar{R} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{\bar{C}_{obs(i)} - \bar{C}_{nativa}}{C_{spike(i)}} \quad (27)$$

$$u(\bar{R})^2 = \sum_{i=1}^n \left[ \frac{1}{n} \times \frac{1}{C_{spike(i)}} \times u(C_{obs(i)}) \right]^2 + \left[ \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{C_{spike(i)}} \right]^2 \times u(C_{nativa})^2 \quad (28)$$

$$+ \sum_{i=1}^n \left[ \frac{1}{n} \times \frac{(C_{obs(i)} - C_{nativa})}{C_{spike(i)}^2} \times u(C_{spike(i)}) \right]^2$$

Em que  $C_{spike(i)}$  e  $C_{obs(i)}$  representam as concentrações fortificadas e observadas nos diversos ensaios  $i$ , e  $u(C_{spike(i)})$  a incerteza padrão associada a  $C_{spike(i)}$ .

Neste relatório, não é proposta uma abordagem para a quantificação da incerteza da recuperação média quando ensaios de fortificação a diversos níveis de concentração são realizados em amostras com diferentes concentrações de analito nativo. Neste trabalho foi desenvolvida uma abordagem que visa colmatar essa lacuna.

#### 4.4.1. INCERTEZA ASSOCIADA À PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A incerteza padrão associada à precisão intermediária,  $u_{pi}$ , pode ser estimada de diversas formas dependendo do tipo de informação disponível e do âmbito de aplicação do método em termos de matrizes e gamas de analito. Tendo em conta a forma como a precisão varia na gama analítica considerando os Limites de Detecção, LD, e Quantificação do método, LQ, considera-se que a incerteza padrão absoluta,  $u_{pi}$ , da precisão intermediária é igual ao desvio-padrão da precisão intermediária entre o LD e  $2 \cdot LQ$ , e a incerteza padrão relativa da precisão intermediária é constante e igual ao desvio padrão relativo da precisão intermediária acima de  $2 \cdot LQ$ .

A determinação do desvio padrão da precisão intermediária é feita por análise de um padrão de controlo com uma concentração posicionada aproximadamente a meio da curva de calibração. Idealmente deveria ter sido avaliado a constância da precisão intermédia ao longo da gama de trabalho.

#### 4.4.2. INCERTEZA ASSOCIADA À RECUPERAÇÃO MÉDIA

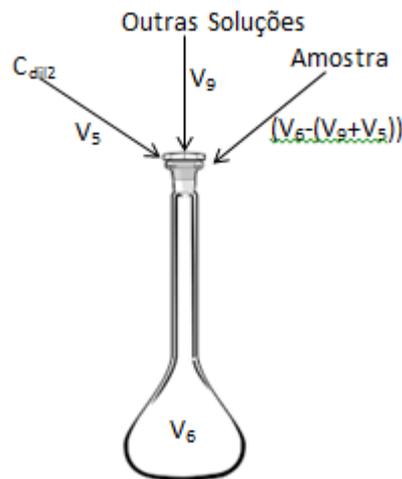
Nesta alínea é descrita a metodologia desenvolvida para a quantificação da incerteza associada à recuperação média observada em resultados de fortificações variáveis de diferentes amostras com analito nativo.

Esta descrição é iniciada com a metodologia de preparação dos padrões de calibração (ou calibradores) do ICP-OES visto que são usadas soluções comuns na preparação dos calibradores e fortificação das amostras e esta partilha deve ser

considerada na avaliação da incerteza da medição. Os calibradores são preparados por diluição direta e única de uma solução com concentração  $C_{dil2}$  que resultada da diluição de uma solução mãe com concentração  $C_{mãe}$  em dois passos (fatores de diluição dados pelas razões dos volume  $V_1/V_2$  e  $V_3/V_4$ ). O esquema seguinte representa a preparação dos calibradores.

$$C_{mãe} \xrightarrow{\frac{V_1}{V_2}} C_{dil1} \xrightarrow{\frac{V_3}{V_4}} C_{dil2} \rightarrow \text{Calibradores}$$

A ilustração seguinte descreve a fortificação e diluição das amostras dos ensaios de recuperação já descrita atrás.



Em que  $V_6$  representa o volume do balão utilizado no ensaio de recuperação e  $V_9$  a soma de volumes  $V_7$  e  $V_8$  ( $V_9 = V_7 + V_8$ ) de soluções adicionadas que não do analito em causa (i.e. adições de outros analitos).

A concentração da fortificação é estimada através da equação 29

$$C_{fort} = \frac{C_{Mãe} \times V_1 \times V_3 \times V_5}{V_2 \times V_4 \times V_6} \quad (29)$$

Considerando os termos apresentados anteriormente podem-se apresentar outras formas de estimar  $C_{fort}$  e o cálculo do fator de diluição da amostra depois da adição de padrão,  $f_{amostra}^{dil}$ .

$$\frac{C_{M\tilde{a}e} \times V_1 \times V_3}{V_2 \times V_4} = C_{dil2} \quad (30)$$

$$C_{fort} = C_{dil2} \times \frac{V_5}{V_6} \quad (31)$$

$$f_{amostra}^{dil} = \frac{V_6 - (V_9 + V_5)}{V_6} \quad (32)$$

Desta forma, a recuperação de analito do ensaio  $i$ ,  $R_i$ , é estimada pela equação 33.

$$\begin{aligned} R_i &= \frac{C_{obs(i)} - C_{nativa(i)}^{dil}}{C_{fort(i)}} = \frac{C_{obs(i)} - (C_{nativa(i)} \times \frac{V_6 - (V_9 + V_5)}{V_6})}{C_{fort(i)}} \\ &= \frac{V_6 \times C_{obs(i)} - V_6 \times C_{nativa(i)} + V_9 \times C_{nativa(i)} + V_5 \times C_{nativa(i)}}{C_{dil2} \times V_5} \end{aligned} \quad (33)$$

Em que  $C_{nativa(i)}$  se refere à concentração nativa da amostra usada no ensaio de recuperação  $i$ ,  $C_{fort(i)}$  à concentração da fortificação,  $C_{obs(i)}$  à concentração observada no ensaio de recuperação  $i$  e em que  $C_{amostra(i)}^{dil} = (C_{nativa(i)} \times f_{amostra}^{dil})$  representa a estimativa da concentração nativa diluída a partir da diluição com  $f_{amostra}^{dil}$  da concentração nativa.

Considerando a lei de propagação de componentes de incerteza independentes quantificados como incertezas padrão, a incerteza padrão,  $u_{R_i}$ , associada a  $R_i$  é estimada pela equação 34.

$$\begin{aligned} u_{R_i}^2 &= \left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{obs}} \right)^2 \times u_{C_{obs}}^2 + \left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{nativa}} \right)^2 \times u_{C_{nativa}}^2 + \left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{dil2}} \right)^2 \times u_{C_{dil2}}^2 \\ &\quad + \left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{V_5}} \right)^2 \times u_{V_5}^2 + \left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{V_6}} \right)^2 \times u_{V_6}^2 + \left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{V_9}} \right)^2 \times u_{V_9}^2 \end{aligned} \quad (34)$$

Em que  $u_a$  representa a incerteza padrão associada à variável  $a$ .

Derivando cada termo, obtemos as equações 35, 36, 37, 38, 39 e 40

$$\left( \frac{\partial R_i}{\partial C_{obs}} \right) = \frac{V_6}{C_{dil2} \times V_5} = \frac{1}{C_{fort}} \quad (35)$$

$$\left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{nativa}}\right) = \frac{V_9 - V_6 + V_5}{C_{dil2} \times V_5} \quad (36)$$

$$\left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{dil2}}\right) = 0 \quad (37)$$

$$\left(\frac{\partial R_i}{\partial V_5}\right) = \frac{(C_{nativa} - C_{dil2} \times V_5) - (C_{dil2} \times R_i \times C_{dil2} \times V_5)}{(C_{dil2} \times V_5)^2} \quad (38)$$

$$= \frac{C_{nativa} - (C_{dil2} \times R_i)}{C_{dil2} \times V_5}$$

$$\left(\frac{\partial R_i}{\partial V_6}\right) = \frac{C_{obs} - C_{nativa}}{C_{dil2} \times V_5} \quad (39)$$

$$\left(\frac{\partial R_i}{\partial V_9}\right) = \frac{C_{nativa}}{C_{dil2} \times V_5} \quad (40)$$

A equação 42 deriva do facto da solução diluída de padrão usada nos ensaios de recuperação ser a mesma usada na preparação dos calibradores e portanto esta não afeta a determinação da recuperação de analito.

De modo análogo, considerando a recuperação média  $\bar{R}$ , de vários ensaios de recuperação, a incerteza da recuperação média pode ser representada pela equação 41 e 42.

$$u_{\bar{R}}^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n u_{R_i}^2 \quad (41)$$

$$u_{\bar{R}}^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left( \left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{obs}}\right)^2 \times u_{C_{obs}}^2 + \left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{nativa}}\right)^2 \times u_{C_{nativa}}^2 + \left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{V_5}}\right)^2 \times u_{V_5}^2 \right. \\ \left. + \left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{V_6}}\right)^2 \times u_{V_6}^2 + \left(\frac{\partial R_i}{\partial C_{V_9}}\right)^2 \times u_{V_9}^2 \right) \quad (42)$$

A aplicação deste modelo parece ser dificultada pela necessidade de se estimar  $u_{C_{obs}}$  e  $u_{C_{nativa}}$  que mais parecem ser o objetivo do modelo do que as suas variáveis de entrada. No entanto, uma avaliação mais atenta das variáveis  $C_{obs}$  e  $C_{nativa}$  permitem concluir que estas têm componentes independentes e componentes que se anulam. As componentes independentes podem ser combinadas de acordo com a equação 42.

Quando  $C_{obs}$  e  $C_{nativa}$  são estimadas através da mesma calibração analítica os efeitos sistemáticos devido à calibração diária anulam-se na diferença ( $C_{obs}-C_{nativa}$ ) e a repetibilidade da medição será a única componente que justifica a diferença. A estimativa da repetibilidade da medição que afeta  $C_{obs}$  e  $C_{nativa}$  deve também ter em conta a variação esperada da precisão da medição em função dos limiares analíticos. Devido a razões de natureza algébrica, tanto em sistema como respostas instrumentais com variância homoscedásticas como heteroscedásticas, o desvio padrão da repetibilidade tende a ser constante do LD a  $2*LQ$  e acima de  $2*LQ$  é aproximadamente constante o desvio padrão relativo da repetibilidade.[28] Assim considera-se que quando a  $C_{nativa}$  ou  $C_{obs}$  é superior ou igual ao LD do método e menor que  $2*LQ$  a incerteza padrão relativa associada a  $C_{nativa}$  ou  $C_{obs}$  é dada pela razão entre o desvio padrão estimado da repetibilidade  $s_{rep}$  pela respetiva concentração (i.e.  $s_{rep}/C_{nativa}$  e  $s_{rep}/C_{obs}$  respectivamente). Quando estas concentrações são superiores a  $2*LQ$  considera-se que a sua incerteza, para fins de cálculo da diferença ( $C_{obs}-C_{nativa}$ ), é dada pelo desvio padrão relativo da repetibilidade estimada. Quando a  $C_{nativa}$  é menor que o LD esta deixa de ser considerada como referência para a determinação da recuperação e, neste caso, a incerteza padrão relativa associada a  $C_{obs}$ ,  $u_{(C_{obs})}$ , é  $(s_{oi}/C_{obs})$  ou  $(s'_{pi})$  se  $C_{obs}$  estiver entre o LD e  $2*LQ$  ou for superior s  $2*LQ$  respectivamente.

A Tabela 12 apresenta o cálculo de cada termo da Equação 42, tendo em conta os critérios acima citados.

**Tabela 12 – Determinação dos termos usados no cálculo da incerteza da recuperação média.**

$\left(\frac{\partial Ri}{\partial C_{obs}}\right)^2 \times u_{C_{obs}}^2$	$\left(\frac{\partial Ri}{\partial C_{nativa}}\right)^2 \times u_{C_{nativa}}^2$	$\left(\frac{\partial Ri}{\partial C_{V_5}}\right)^2 \times u_{V_5}^2$	$\left(\frac{\partial Ri}{\partial C_{V_6}}\right)^2 \times u_{V_6}^2$	$\left(\frac{\partial Ri}{\partial C_{V_9}}\right)^2 \times u_{V_9}^2$			
Se $C_{nativa} \geq LD$							
Se $C_{obs} \geq 2 \times LQ$	Se $C_{nativa} \geq 2 \times LQ$						
$\left(\frac{1}{C_{fort}} \times C_{obs} \times s'_{rep}\right)^2$	$\left(\frac{V_9 - V_6 + V_5}{C_{dil2} \times V_5} \times C_{nativa} \times s'_{rep}\right)^2$				$\left(\frac{C_{nativa} - (C_{dil2} \times R_i)}{C_{dil2} \times V_5} \times u_{V_5}\right)^2$	$\left(\frac{C_{obs} - C_{nativa}}{C_{dil2} \times V_5} \times u_{V_6}\right)^2$	$\left(\frac{C_{nativa}}{C_{dil2} \times V_5} \times u_{V_9}\right)^2$
Se $C_{obs} < 2 \times LQ$	Se $C_{nativa} < 2 \times LQ$						
$\left(\frac{1}{C_{fort}} \times s_{rep}\right)^2$	$\left(\frac{V_9 - V_6 + V_5}{C_{dil2} \times V_5} \times s_{rep}\right)^2$	Se $C_{nativa} < LD$					
Se $C_{obs} \geq 2 \times LQ$	$\emptyset$	$\left(\frac{C_{obs} \times u_{V_5}}{C_{fort} \times V_5}\right)^2$	$\left(\frac{C_{obs} \times u_{V_6}}{C_{dil2} \times V_5}\right)^2$	$\left(\frac{C_{nativa}}{C_{dil2} \times V_5} \times u_{V_9}\right)^2$			
$\left(\frac{1}{C_{fort}} \times C_{obs} \times s'_{pi}\right)^2$							
Se $C_{obs} < 2 \times LQ$							
$\left(\frac{1}{C_{fort}} \times s_{pi}\right)^2$							

A incerteza padrão associada a  $V_9$ ,  $u_{v_9}$ , é estimada pela equação 43.

$$u_{v_9} = \sqrt{u_{v_7}^2 + u_{v_8}^2} \quad (43)$$

Em que  $u_a$  representa a incerteza padrão associada à variável  $a$ .

Esta componente combina-se posteriormente com as outras componentes de  $u_R$ .

#### 4.4.3. COMBINAÇÃO DE COMPONENTES DE INCERTEZA

Dependendo da concentração da amostra as componentes de incerteza são combinadas através das equações 44 ou 45.

Se a  $C_{amostra} \geq 2 \times LQ$

$$u'_c = \sqrt{u'_{pi}{}^2 + u'_R{}^2 + u'_{outras}{}^2} \quad (44)$$

Se a  $C_{amostra} < 2 \times LQ$

$$u'_c = \sqrt{\left(\frac{Spi}{C_{amostra}}\right)^2 + u'_R{}^2 + u'_{outras}{}^2} \quad (45)$$

Em que  $u'_c$  é a incerteza padrão relativa combinada e  $u'_{outras}$  a incerteza padrão relativa associada a componentes de incerteza não refletidas nos estudos de precisão intermediária e recuperação efetuados e é dada por  $u'_{outras}{}^2 = u'_{cdil2}{}^2$  e  $u'_{cdil2}{}^2 = \left(\frac{u_{C_{M\tilde{a}e}}}{C_{M\tilde{a}e}}\right)^2 + \left(\frac{u_{v_1}}{v_1}\right)^2 + \left(\frac{u_{v_2}}{v_2}\right)^2 + \left(\frac{u_{v_3}}{v_3}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_4}}{V_4}\right)^2$ .

#### 4.4.4. EXPANSÃO DA INCERTEZA

Tendo em conta o número elevado de dados reunidos para a determinação das componentes de incerteza consideradas, a incerteza expandida foi estimada por multiplicação da incerteza padrão combinada por um fator de expansão ou cobertura

igual a dois, capaz de associar à nova estimativa da incerteza um nível de confiança aproximadamente igual a 95%.

## 4.5. APLICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO MODELO DE ESTIMATIVA DA INCERTEZA

### 4.5.1. AVALIAÇÃO DA ADEQUAÇÃO DA DIMENSÃO DA INCERTEZA

A estratégia de avaliação da incerteza atrás descrita foi aplicada aos dados da validação dos métodos apresentados anteriormente.

A incerteza alvo foi definida tendo por base o referido no artigo “Setting Target Measurement Uncertainty in Water Analysis”[28]. A incerteza absoluta alvo é considerada igual ao desvio padrão de referência de um Teste de Aptidão (PT) neste caso um PT EAA/RELACRE para águas de consumo humano, para valores quantificados de metal desde o LD até ao valor de referência do PT. A incerteza relativa alvo é considerada igual ao desvio padrão relativo de referência do PT, para valores acima do valor de referência do PT. Optou-se por considerar o valor de referência do PT para a alteração do critério de definição da incerteza alvo, de um valor absoluto constante para um valor relativo constante, devido ao facto dos valores de referência dos testes de aptidão serem muito superiores às concentrações mais altas da gama de calibração. O desempenho observado às concentrações elevadas dos testes de aptidão estudados deve ser significativamente melhor que o espectável nas gamas de calibração do ICP-OES estudadas.

É ainda necessário referir que o Decreto-Lei 83/2011, descreve no Artigo 4º que “devem assegurar que os critérios de desempenho mínimo para todos os métodos de análise são baseados numa incerteza de medição igual ou inferior a 50% para um fator de expansão (k) igual a 2...”. [29]

Tendo em conta que o modelo de avaliação da incerteza da medição desenvolvido deverá ser válido para a quantificação de amostras com sinais desde o sinal do branco até ao sinal do padrão de calibração mais alto, poderão ser reportados valores

quantitativos do metal entre o LD e LQ. Estes limites só são realmente necessários quando os resultados não são reportados com incerteza. Apesar dos métodos analíticos terem sido desenvolvidos para a análise de águas naturais, optou-se por ter como referência os critérios de avaliação do desempenho da análise de águas de consumo.

As Figuras 9 a 21 apresentam representações gráficas da variação da incerteza expandida estimada pelo modelo de medição desenvolvido (linha verde) e da incerteza expandida alvo (linha vermelha) para os elementos e gamas estudadas.

Cálcio determinado entre 0,2-2 mg/L

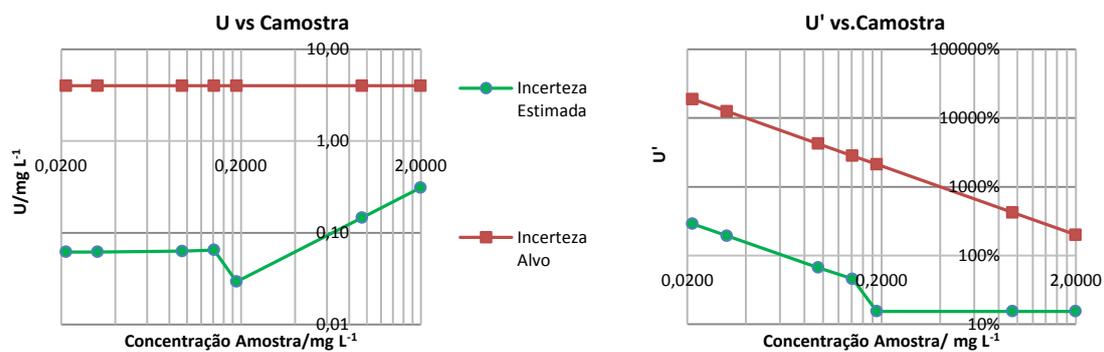


Figura 9 – Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,2-2 mg/L de Cálcio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Cálcio determinado entre 2-6 mg/L

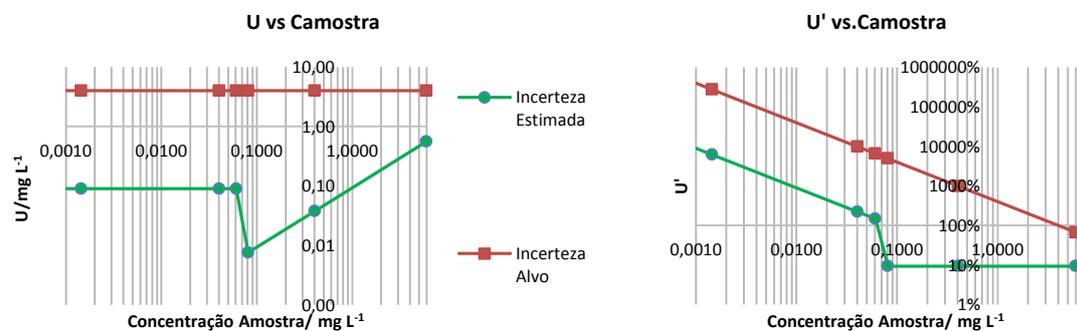


Figura 10 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 2-6 mg/L de Cálcio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Cobre determinado entre 4-20  $\mu\text{g/L}$

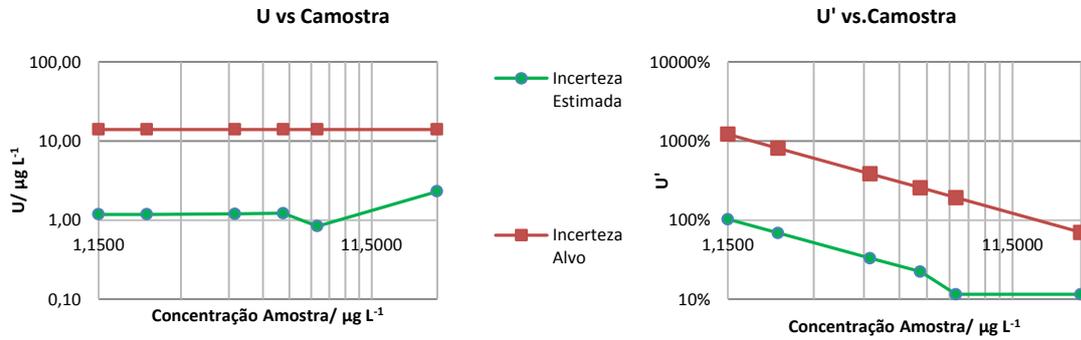


Figura 11 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 4-20  $\mu\text{g/L}$  de Cobre. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Crómio determinado entre 2-20  $\mu\text{g/L}$

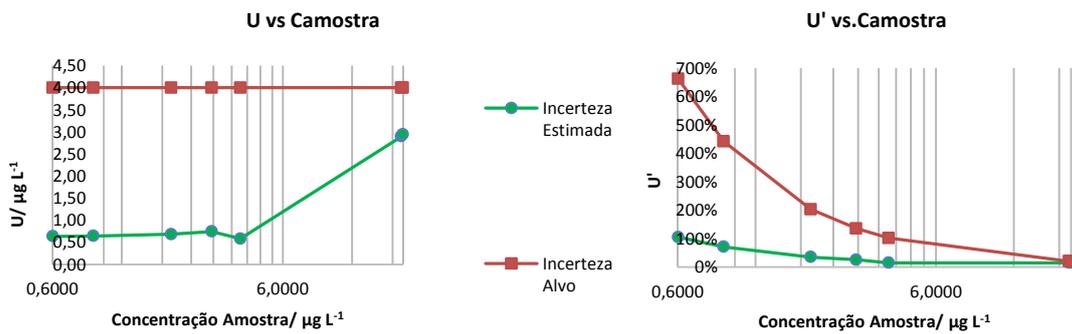


Figura 12 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 2-20  $\mu\text{g/L}$  de Crómio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Ferro determinado entre 10-100  $\mu\text{g/L}$

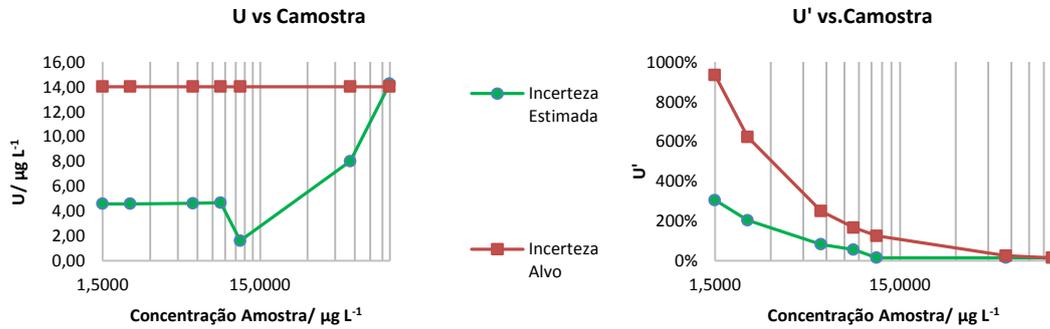


Figura 13 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 10-100  $\mu\text{g/L}$  de Ferro. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Ferro determinado entre 0,1-1  $\text{mg/L}$

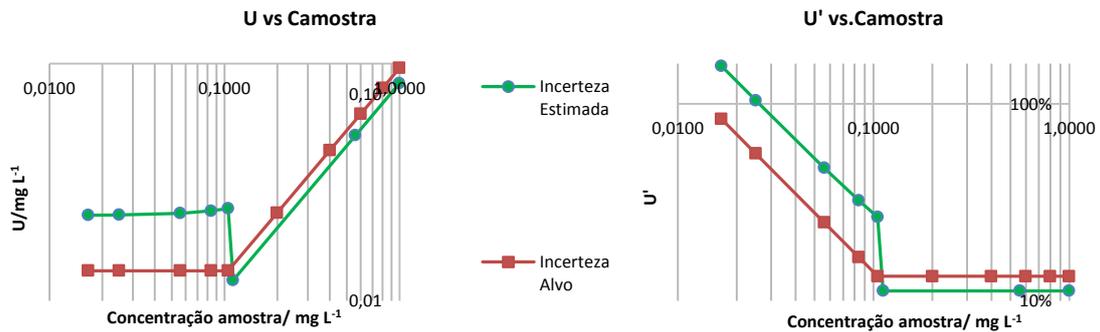


Figura 14 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,1-1  $\text{mg/L}$  de Ferro. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Magnésio determinado entre 0,2-2 mg/L

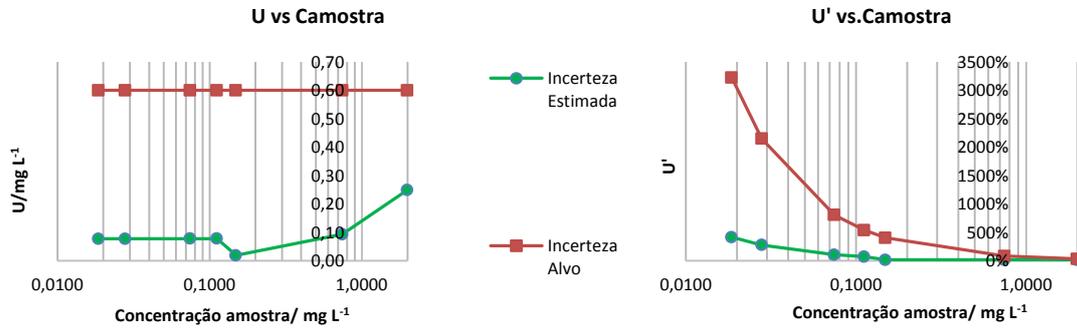


Figura 15 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,2-2 mg/L de Magnésio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Manganês determinado entre 4-20 µg/L

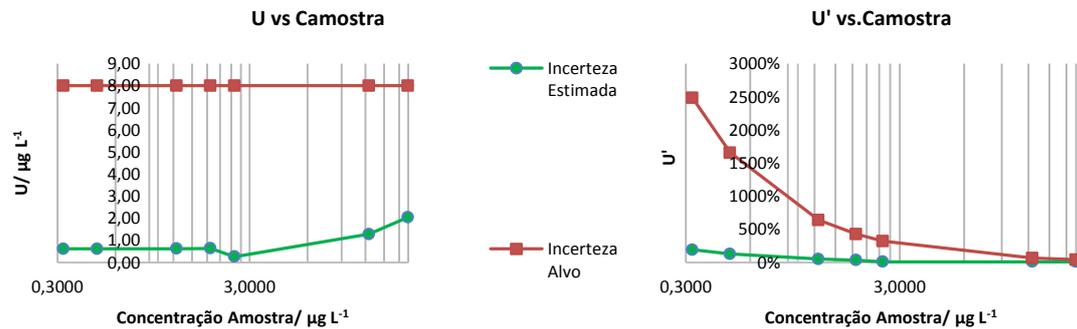


Figura 16 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 4-20 µg/L de Manganês. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Manganês determinado entre 20-200  $\mu\text{g/L}$

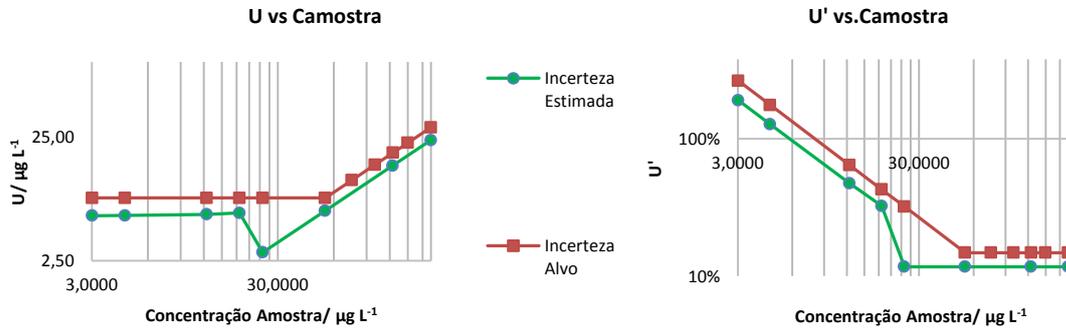


Figura 17 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 20-200  $\mu\text{g/L}$  de Manganês. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Potássio determinado entre 0,4-2  $\text{mg/L}$

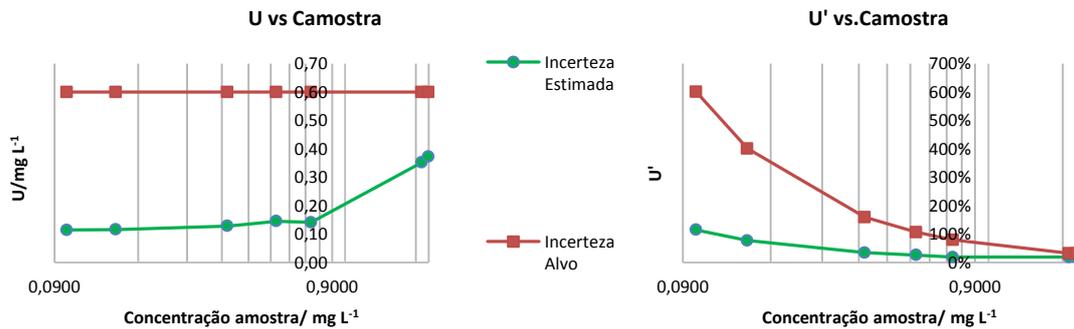


Figura 18 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,4-2  $\text{mg/L}$  de Potássio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Potássio determinado entre 2-20 mg/L

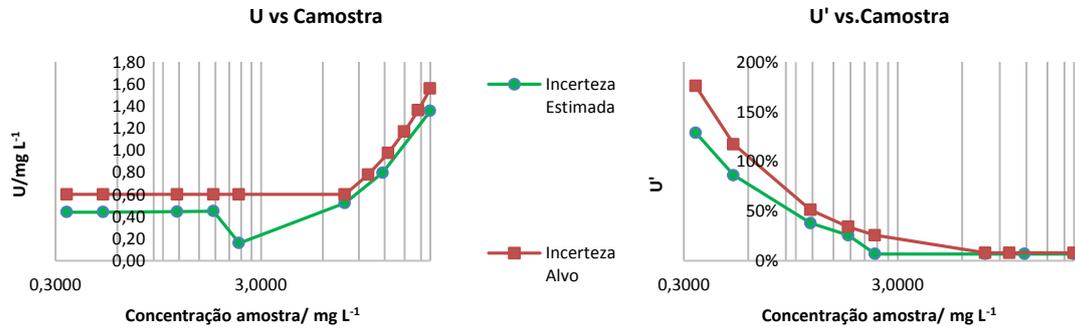


Figura 19 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 2-20 mg/L de Potássio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Sódio determinado entre 0,5-5 mg/L

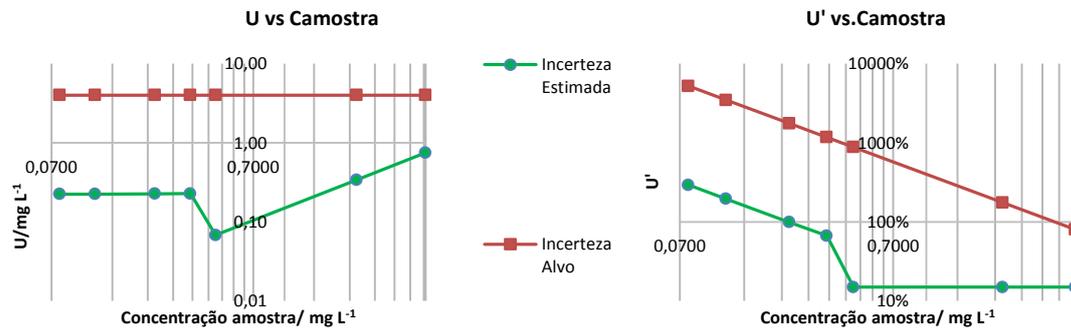


Figura 20 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 0,5-5 mg/L de Sódio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

Sódio determinado entre 5-50 mg/L

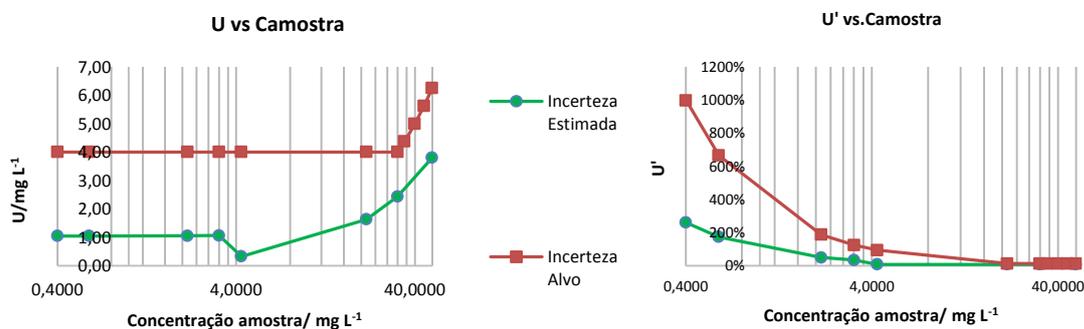


Figura 21 - Representações gráficas da variação da incerteza expandida absoluta, U, e da incerteza expandida relativa, U', estimada e alvo para a gama de 5-50 mg/L de Sódio. Ambos os eixos são apresentados com escalas logarítmicas.

As Figura 9-21 permitem observar claramente a descontinuidade dos modelos da incerteza da medição que apresentam duas gamas distintas. Assim observamos uma primeira zona de incerteza absoluta constante, seguida de um degrau para uma segunda zona de incerteza relativa constante. O degrau não é mais óbvio devido à baixa resolução da linha apresentada. O degrau observado a duas vezes o LQ deve-se ao modo como foi estimada a incerteza padrão da precisão intermediária (equações 44 e 45). O facto da precisão intermediária ter sido estimada a aproximadamente meio da gama de calibração deverá ter sobrestimado a incerteza abaixo de 2LQ. O degrau do modelo de incerteza da medição não se deve a uma descontinuidade no desempenho analítico, deve-se sim a uma descontinuidade no conhecimento desse desempenho.

Considerando agora a Incerteza Alvo definida, podemos concluir que para todas as gamas de trabalho, exceto a gama de Ferro de 0,1-1 mg/L, a incerteza estimada é menor que a alvo indicado a adequação da medição ao uso. No caso dessa gama de Ferro observamos que do LD a 2 vezes o LQ a incerteza estimada é superior à incerteza alvo. Isto deve-se essencialmente a sobrestimação do desvio padrão da precisão intermediária naquela gama.

Para alguns elementos o critério seguido para a definição da incerteza alvo é demasiado permissivo indicando, por exemplo, incertezas expandidas relativas alvo

superiores a 100 % acima do LQ. Estes critérios serão revistos em trabalho futuro seguindo o proposto no artigo [28].

Considerando a incerteza alvo definida pelo Decreto-Lei 83/2011, é possível concluir que a incerteza estimada se situa sempre abaixo dos 50% definidos, quando avaliamos a zona de concentração acima de 2\*LQ, em todos os elementos. Considerando que o laboratório apenas reporta valores de amostras a partir do valor mais baixo das gamas de calibração deparamo-nos com duas situações distintas. Para as gamas de cálcio, magnésio, sódio e a gama 4-20 µg/L de manganês, 2\*LQ situa-se a uma concentração inferior ao valor mais baixo das gamas de calibração. Nos restantes elementos e gamas onde isso não acontece a incerteza relativa estimada até ao valor mais baixo da gama de calibração é sempre inferior a 50%. Assim podemos comprovar a adequação da incerteza estimada à incerteza definida pelo regulador.

#### 4.5.2. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MODELO DE AVALIAÇÃO DA INCERTEZA

Para uma avaliação independente e transparente do modelo de avaliação da incerteza da medição, utilizaram-se os dados da participação do laboratório no teste de Aptidão EAA\RELACRE para águas de consumo humano. A qualidade da estimativa da incerteza foi quantificada pelo En-score. Os dados relativos a essa avaliação estão disponíveis na Tabela 13.

Tabela 13 – En-score da participação do laboratório num teste de aptidão.

Elemento	Gama de Trabalho	En-Score
<b>Ca</b>	2-6 mg/L	0,46
<b>Cu</b>	4-20 µg/L	0
<b>Cr</b>	2-20 µg/L	0,19
<b>Fe</b>	10-100 µg/L	-0,098
<b>Mn</b>	20-200 µg/L	-0,26
<b>K</b>	2-20 mg/L	0
<b>Na</b>	5-50 mg/L	-0,40

Para todos os elementos avaliados o En-score encontra-se entre -2 e 2, podendo assim considerar-se que o modelo de incerteza desenvolvido foi capaz de prever o erro da medição observado.

## 5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram implementados, desenvolvidos e validados métodos de análise para 8 elementos diferentes, Ca, Cu, Cr, Fe, Mg, Mn, K e Na, em águas naturais por ICP-OES, em 13 gamas de calibração distintas. A validação destes métodos baseou-se nos critérios definidos na Norma NP EN ISO/IEC 17025:2005. Os limiares analíticos foram determinados a partir da análise de resultados de ensaios branco (Tabela 7), tendo sido ajustadas as gamas de trabalho de alguns elementos de acordo com esses limiares. A linearidade foi avaliada, de forma pragmática, através da determinação do coeficiente de correlação linear de Pearson (Anexo 3 a Anexo 15) complementando com a avaliação de gráficos de residuais. A precisão da medição por seu turno foi avaliada em duas condições de precisão diferentes: a repetibilidade foi determinada através de ensaios de duplicados e a precisão intermediária a partir da análise de um padrão de controlo em dias diferentes. A veracidade foi avaliada usando ensaios de recuperação de analito adicionado a amostras de águas naturais (Anexo 3 a Anexo 15).

Foram ainda desenvolvidos e implementados procedimentos de controlo de qualidade que permitem garantir a manutenção diária do desempenho analítico. Este controlo de qualidade passa pela análise de um branco e de um padrão de otimização, para verificação das condições instrumentais. Depois desta fase inicial, procede-se à análise de padrões de controlo ao limite de quantificação e a meio da gama de calibração e subsequente análise do historial destes resultados através de cartas de controlo (Anexo 3 a Anexo 15). O controlo do desempenho também inclui a realização de ensaios em duplicados e a análise da recuperação de analito em amostras reais (Anexo 3 a Anexo 15).

A estimativa da incerteza da medição foi realizada considerando os princípios da abordagem supranalítica da reconciliação, que quantifica componentes de incerteza relevante através de dados do desempenho global da medição estimados em ambiente intralaboratorial. Considerando que a bibliografia não descreve como se estima a incerteza da recuperação média de analito quando esta é determinada com base em ensaios a diferentes níveis de fortificação realizados em diversas amostras com analito nativo, foi desenvolvida uma metodologia capaz de processar esse tipo de informação.

A incerteza da medição foi avaliada quanto à adequação da sua dimensão para o fim em vista e a qualidade de previsão do erro de medição. Essa avaliação procedeu-se de duas formas: através da comparação da incerteza estimada com uma incerteza alvo (Figura 9 a Figura 21), da participação em Testes de Aptidão (Tabela 13) . A incerteza estimada encontra-se, com exceção da zona de concentração inferior a  $2 \cdot LQ$  da gama 0,1-1 mg/L de ferro, abaixo da incerteza alvo definida e os En-score calculados para o Testes de Aptidão entre -2 e 2 para todos os casos. O caso em que se observam valores da incerteza estimada superiores à incerteza alvo, pode ser considerado irrelevante, dado que acontece apenas a concentrações inferiores ao padrão de concentração mais baixa daquela gama de calibração e considerando que o laboratório apenas reporta valores acima do padrão mais baixa da gama de calibração. Foi necessário ainda avaliar a adequação da incerteza estimada ao exigido pelo regulador (incerteza expandida igual ou inferior a 50%). A incerteza estimada para todos os elementos e gamas de calibração mostraram-se adequadas tendo em conta essa incerteza alvo.

Estes detalhes comprovam a adequação dos procedimentos de medição desenvolvidos para a caracterização de águas naturais.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Midões and J. Fernandes, “Água Subterrânea - Conhecer para Proteger e Preservar,” *Proj. N° P-IV-1052 do Programa Ciência Viva*, pp. 1–24, 2006.
- [2] *Decreto-Lei n° 103/2010*, vol. N°187, no. 1ª Série. Diário da República, 2010, pp. 4289–4296.
- [3] I. Inag, “Critérios para a Classificação do Estado das Massas de Água Superficiais- Rios e Albufeiras,” *Ministério do Ambient. do Ordenam. do Territ. e do Desenvolv. Reg. Inst. da Água, I.P.*, 2009.
- [4] M. F. Giné, *Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente - ICP-AES*. Universidade de São Paulo, 1998.
- [5] C. B. Boss and K. J. Fredeen, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, 3rd ed. PerkinElmer Life and Analytical Sciences, 2004.
- [6] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, and S. R. Crouch, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed. Brooks/Cole, Cengage Learning, 2014.
- [7] X. Hou and B. T. Jones, “Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry,” *Encycl. Anal. Chem.*, 2008.
- [8] A. G. Correia, “Desenvolvimento de Modelos Metrológicos Detalhados da Determinação de Metais Pesados em Corretivos Orgânicos - Dissertação de Mestrado,” Faculdade de Ciências Universidade de Lisboa, 2012.
- [9] CITAC/Eurachem, “Guide to Quality in Analytical Chemistry,” 2002.
- [10] I. P. de Acreditação, “Guia Para a Aplicação Da NP EN ISO/IEC 17025 - OGC001,” 2010.
- [11] “Guia RELACRE 13 : Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química,” 2000.
- [12] B. Magnusson and U. Ornermark, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd Editio. 2014.
- [13] R. J. N. Bettencourt da Silva and M. F. Camões, “The Quality of Standards in Least Squares Calibrations,” *Anal. Lett.*, vol. 43, no. 7–8, pp. 1257–1266, 2010.
- [14] W. Penninckx, C. Hartmann, D. L. Massart, and J. Smeyers-Verbeke, “Validation of the calibration procedure in atomic absorption spectrometric methods,” *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 11, no. 4, p. 237, 1996.
- [15] R. J. N. Bettencourt da Silva, “Modelação do Desempenho de Métodos Analíticos Complexos - Tese de Doutoramento,” 2011.
- [16] I. P. da Qualidade, *Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos Fundamentais e Gerais e Termos Associados*, 1ª Edição . 2012.

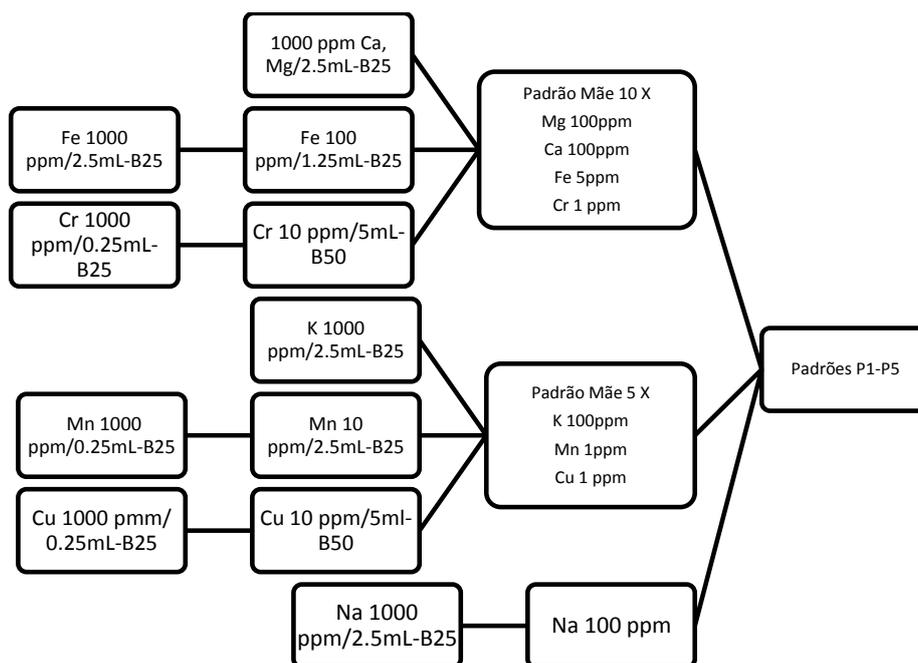
- [17] Eurachem, "Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes," p. 52, 2011.
- [18] P. De Bièvre and H. Günzler, "Traceability in chemical measurement," *Traceability Chem. Meas.*, pp. 1–297, 2005.
- [19] "Guia Relacre 3. Validação de Resultados em Laboratórios Químicos," 1996.
- [20] "ISO 7870-2 Control Charts - Shewhart Control Charts," 2013.
- [21] I. P. de Acreditação, "Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos - OGC 002," p. 12, 2011.
- [22] *Guia RELACRE 9 - Alguns Exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química*. 1998.
- [23] Citac and Eurachem, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, vol. 3rd. 2012.
- [24] V. Barwick and S. Ellison, "Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part ( d ): Protocol for uncertainty evaluation from validation data," in *VJ Barwick, SLR Ellison, VAM Project*, no. January, 2000.
- [25] APHA, AWWA, and WEF, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 1999.
- [26] J. N. Miller and J. C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Sixth Edit. Pearson Education Limited, 2010.
- [27] R. J. N. B. da Silva, J. R. Santos, and M. F. G. F. C. Camões, "Worst case uncertainty estimates for routine instrumental analysis.," *Analyst*, vol. 127, no. 7, pp. 957–963, 2002.
- [28] R. da Silva, "Setting Target Measurement Uncertainty in Water Analysis," *Water*, vol. 5, no. 3, pp. 1279–1302, 2013.
- [29] *Decreto-Lei 83/2011*, vol. N<sup>o</sup>117, no. 1<sup>a</sup> Série. Diário da República, 2011, pp. 3584–3587.

**ANEXOS**

## Anexo 1 ESQUEMAS DE PREPARAÇÃO DOS PADRÕES DE CALIBRAÇÃO AGRUPADOS EM DUAS GAMAS

Preparação Padrões de Calibração Gama Baixa

Ca – (0.2-2) mg/L, Mg – (0.2-2) mg/L, K – (0.4-2) mg/L, Na – (0.5-5) mg/L, Fe – (10-100) µg/L,  
Mn – (4-20) µg/L, Cu – (4-20) µg/L, Cr – (2-20) µg/L

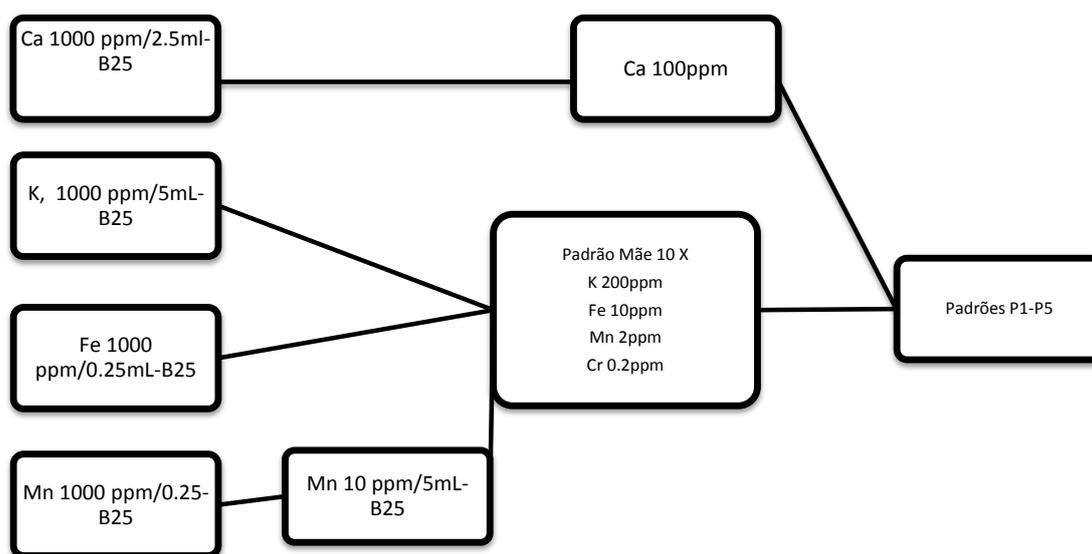


Volume (mL)	P1	P2	P3	P4	P5	PC	PLQ
Padrão Mãe 10X	0.1	.3	0.6	.8	1	0.5	0.1
Padrão Mãe 5X	0.2	.4	0.6	.8	1	0.6	0.2
Na 100 ppm	0.25	.75	1.5	2	2.5	1.25	0.25

**Balão de 50ml**

### Preparação Padrões de Calibração Gama Alta

**Ca** – (2-6) mg/L, **K** – (2-20) mg/L, **Na** – (5-50) mg/L, **Fe** – (0.1-1) mg/L, **Mn** – (20-200) µg/L,



Volume (mL)	P1	P2	P3	P4	P5	PC	PLQ
Padrão Mãe	0.5	1.5	3	4	5	2.5	0.5
Na 1000ppm	0.25	1	1.5	2	2.5	1.25	-
Ca 100ppm	1	1.5	2	2.5	3	2	-

**Balão de 50ml**

## Anexo 2      TESTES DE VALORES ABERRANTES

Os testes recomendados pela ISO para a detecção de valores aberrantes únicos, emparelhados e antagónicos são os testes de Grubbs.

O teste de Grubbs de valores aberrantes únicos compara a diferença do valor suspeito (i.e. o máximo ou mínimo da amostra) para a média da amostra de valores estudada considerando o desvio padrão da amostra. No entanto este teste é ineficaz quando ocorrem pares emparelhados de valores aberrantes. Estas ocorrências têm uma probabilidade suficientemente elevada que indicam o seu despiste. Para tal utiliza-se o teste de Grubbs de valores aberrantes emparelhados ou antagónicos que compara o desvio padrão da amostra original com o desvio padrão da amostra após a exclusão dos dois valores mais altos ou mais baixos, ou o mais alto e o mais baixo (valores antagónicos). Ambos os testes de Grubbs assumem que os valores da amostra têm uma distribuição normal.

Ambos os testes de Grubbs começam com uma organização dos  $n$  valores  $x_h$  por ordem crescente em que  $x_1$  ( $h=1$ ) e  $x_n$  ( $h=n$ ) são os valores mais altos e mais baixos da amostra:  $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_n$ .

Para avaliar se o maior e menor valor da amostra são aberrantes únicos, calculam-se as seguintes razões,  $T_n$  e  $T_1$ , respetivamente:

$$T_n = \frac{x_n - \bar{x}}{s}$$

$$T_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{s}$$

Sendo que  $\bar{x}$  e  $s$  representam a média e o desvio padrão de todos os valores da amostra. O valor de  $T_n$  e  $T_1$  é depois comparado com uma tabela de valores críticos, que pode ser observada na Tabela 14, dependente do número de resultados e do nível de confiança do teste. Quando o valor de  $T_n$  ou  $T_1$  é superior ao valor tabelado, considera-se que o valor é aberrante.

Para o teste de valores aberrantes emparelhados e antagónicos, calcula-se o valor de  $\mathfrak{R}$ :

$$\mathfrak{R}(\%) = 100 \left( 1 - \frac{s_2}{s} \right)$$

Sendo que  $s$  é o desvio padrão de todos os valores da amostra e  $s_2$  o desvio padrão de todos os valores excluindo o par que está a ser avaliado ( $x_1$  e  $x_2$ ,  $x_{n-1}$  e  $x_n$ , ou  $x_1$  e  $x_n$ ). Se o valor de  $\mathfrak{R}$  exceder um valor crítico, que podem ser observadas na Tabela 15, dependente do número de resultados e do nível de confiança do teste, então o par de resultados analisados é considerado aberrante emparelhado ou antagónico.

A avaliação dos valores da amostra deve-se iniciar pelo teste para valores aberrantes únicos e só depois deve-se realizar o teste de valores aberrantes emparelhados ou antagónicos. Caso sejam detetados valores aberrantes eles devem ser eliminados dos resultados caso a remoção de resultados não seja significativa considerando o número total de valores. Por exemplo, caso os testes de valores aberrantes indiquem a remoção de mais de metade dos valores deve-se questionar o pressuposto de normalidade dos valores.

Tabela 14 - Valores Críticos de T1 e Tn para o teste de valores aberrantes únicos de Grubbs

n	Nº de Observações		Níveis de confiança	
	99%	97.5%	95%	90%
3	1,155	1,155	1,153	1,148
4	1,492	1,481	1,463	1,425
5	1,749	1,715	1,672	1,602
6	1,944	1,887	1,822	1,729
7	2,097	2,02	1,938	1,828
8	2,221	2,126	2,032	1,909
9	2,323	2,215	2,11	1,977
10	2,41	2,29	2,176	2,036
11	2,485	2,355	2,234	2,088
12	2,55	2,412	2,285	2,134
13	2,607	2,462	2,331	2,175
14	2,659	2,507	2,371	2,213
15	2,705	2,549	2,409	2,247
16	2,747	2,585	2,443	2,279
17	2,785	2,62	2,475	2,309
18	2,821	2,651	2,504	2,335
19	2,854	2,681	2,532	2,361
20	2,884	2,709	2,557	2,385

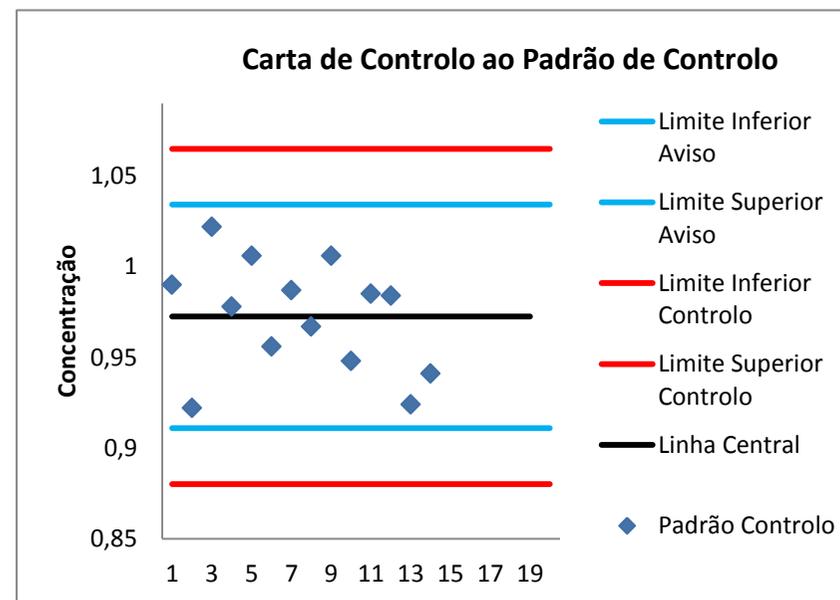
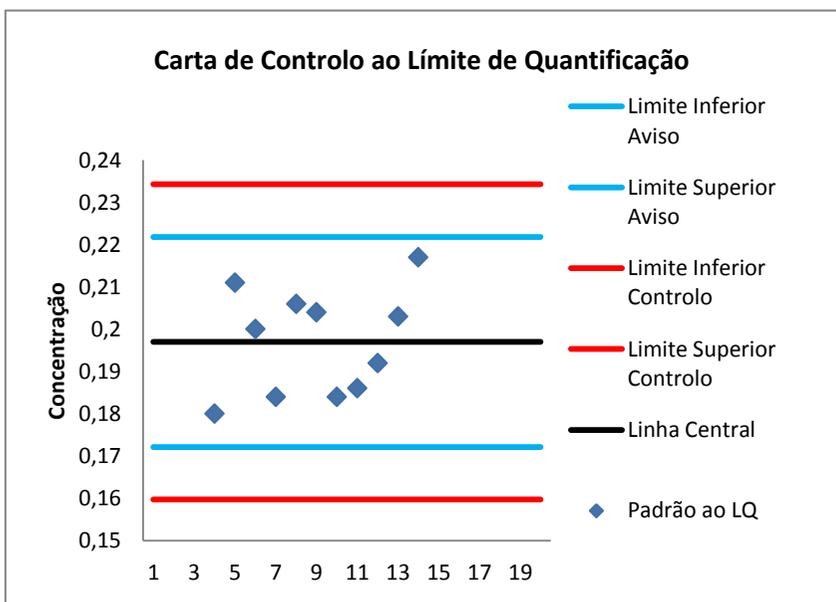
Tabela 15 - Valores críticos de  $\mathfrak{R}$  para o teste de valores aberrantes emparelhados únicos e antagônicos de Grubbs.

Nº De Observações n	Níveis de confiança		
	90%	95%	99%
4	97,1	98,6	99,7
5	85	89,5	95,4
6	73,9	79,6	88,4
7	65,3	71,2	81,3
8	58,7	64,5	74,9
9	53,4	59	69,4
10	49,2	54,5	64,6
11	45,6	50,7	60,4
12	42,6	47,4	56,8
13	40,1	44,6	53,6
14	37,8	42,1	50,6
15	35,9	40	48,2
16	34,1	38	46
17	32,6	36,3	43,9
18	31,2	34,7	42,1
19	29,9	33,3	40,4
20	28,7	32	38,8

## Anexo 3 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 0,2-2 MG/L DE CÁLCIO

EB	Optimização		PLQ	PC	Ordenada na Origem	Declive	R^2
	Eb	Ptopo					
mg/L	cps		mg/L				
-0,031				0,99	97,6	2298	0,999
-0,026				0,92	48,3	2241	0,999
-0,015				1,02	42,4	2057	1,000
0,004			0,18	0,98	37,5	2237	0,998
0,005	16	4306	0,21	1,01	-4,1	2096	0,999
-0,007	38	4159	0,20	0,96	12,6	1901	0,999
-0,005	0	4174	0,18	0,99	10,0	2026	0,999
-0,001	8	4134	0,21	0,97	8,7	2072	0,999
-0,001	0	4241	0,20	1,01	4,4	2078	1,000
-0,016	5	4595	0,18	0,95	32,8	2156	1,000
-0,014	3	3982	0,19	0,99	11,5	1995	1,000
-0,015	3	4134	0,19	0,98	27,0	1980	1,000
-0,011	1	3738	0,20	0,92	-0,2	1893	1,000
-0,008	2	3938	0,22	0,94	12,7	1914	1,000

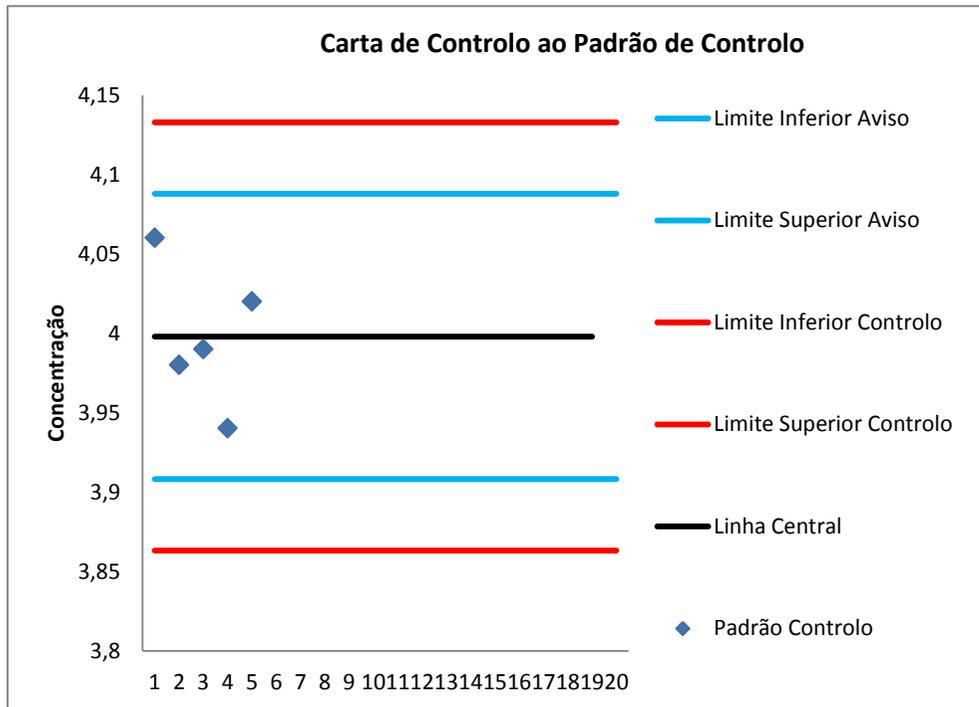
Unidades		Unidades			
mg/L	mg/L	mg/L	g		
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
0,467	0,2	49,65	50	0,681	108,63%
0,372	1,0	49,5	50	1,372	100,37%
1,372	0,4	49,8	50	1,708	85,37%
0,888	0,5	24,75	25	1,383	100,78%
0,888	1,0	24,5	25	1,729	85,88%
0,713	1	23,25	25	1,676	101,29%
0,815	0,4	24,1	25	1,196	102,59%
0,732	1,2	24,35	25	1,853	95,00%
0,291	1,2	24,15	25	1,464	98,57%
0,822	0,4	24,55	25	1,245	109,45%
0,724	0,4	24,55	25	1,116	101,26%
0,665	1,2	47,3	50	1,774	95,41%
0,393	0,2	49,45	50	0,602	106,66%
0,766	0,6	48,55	50	1,305	93,54%
0,413	1,2	47,3	50	1,521	94,19%
0,297	0,2	49,45	50	0,506	106,13%
0,742	1,2	9,42	10	1,879	98,34%



## Anexo 4 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 2-6 MG/L DE CÁLCIO

EB mg/L	Optimização		PC mg/L	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo cps				
-0,025	36	6351	4,06	37,04943902	1027,057	0,999748
-0,013	20	6711	3,98	29,36976847	1080,066	0,999577
-0,01	13	5903	3,99	24,29189285	993,0058	0,999909
-0,017	19	6534	3,94	32,40688804	1072,553	0,999772
-0,015	12	6044	4,02	26,99024895	1007,668	0,999755

Unidades		Unidades			
mg/L	mg/L			mg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
3,239	2,0	9,8	10	5,189	100,74%
3,359	2,0	9,8	10	5,322	101,51%
3,595	2,0	49	50	5,484	98,05%
3,662	2,0	49	50	5,703	105,71%
3,439	2,0	49	50	5,362	99,59%
2,854	2,0	49	50	4,932	106,75%
2,874	2,0	49	50	5,047	111,52%
2,810	2,0	49	50	4,583	91,46%
2,862	2,0	49	50	4,577	88,61%
2,794	2,0	49	50	4,698	97,99%
3,608	2,0	49	50	5,47	96,71%
3,69	2,0	49	50	5,724	105,39%
3,739	2,0	49	50	5,745	104,04%

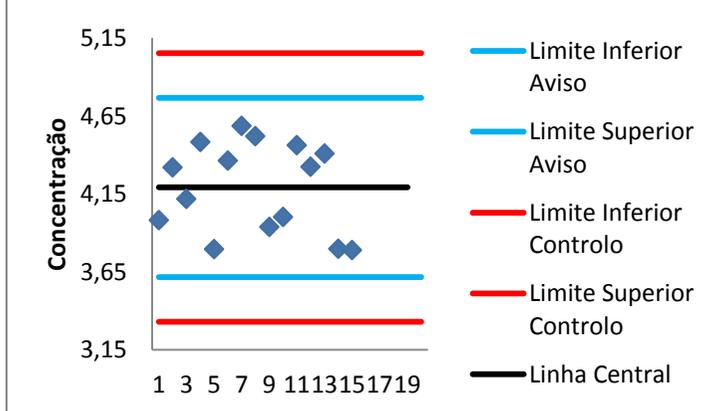


## Anexo 5 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 4-20 µG/L DE COBRE

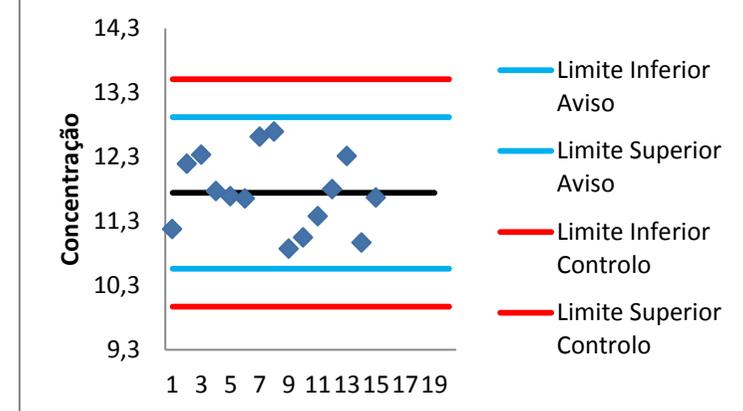
EB	Optimização		PLQ	PC	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo					
µg/L	cps		µg/L				
-0,06	442	1614	4,0	11,2	456,95	53,65	0,997462
0,70	437	1560	4,3	12,2	409,69	51,96	0,999384
-0,03	407	1555	4,1	12,3	414,51	55,41	0,998646
-0,39	388	1462	4,5	11,8	413,59	52,65	0,99485
0,18	436	1617	3,8	11,7	465,76	57,01	0,998759
-0,29	452	1559	4,4	11,6	460,43	52,81	0,999428
0,63	378	1 447	4,6	12,6	391,89	58,39	0,998796
-0,36	389	1 516	4,5	12,7	379,05	57,46	0,999933
0,22	390	1657	3,9	10,9	417,09	62,09	0,99953
0,19	443	1560	4,0	11,0	474,09	56,62	0,993472
0,30	329	1423	4,5	11,4	346,50	53,06	0,99958
-0,06	425	1499	4,3	11,8	454,75	53,00	0,99852
	380	1601	4,4	12,3	406,05	56,95	0,998049
	395	1561	3,8	11,0	178,06	60,94	0,999497
	390	1577	3,8	11,7	436,76	59,61	0,997805

Unidades		Unidades			
µg/L	µg/L			µg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
4,107	12	24,1	25	15,373	95,12%
11,839	4	24,35	25	16,132	115,02%
0,223	12	24,15	25	12,042	98,55%
1,732	4	24,55	25	6,068	109,18%
1,301	16	20,5	25	16,447	96,13%
-0,153	8	44,95	50	7,708	98,07%
2,006	12	47,3	50	13,654	97,97%
0,993	4	49,45	50	4,823	96,02%
1,104	8	48,55	50	7,981	86,36%
0,956	12	47,3	50	11,608	89,20%
0,163	4	49,45	50	4,381	105,49%
0,764	8	8,99	10	9,319	107,90%
1,216	4	48,15	50	5,002	95,77%
0,345	4	48,15	50	4,473	103,52%
0,651	8	8,99	10	8,766	102,26%
0,685	8	8,99	10	7,728	88,90%
0,162	8	8,99	10	7,745	94,99%

Carta de Controle ao LQ



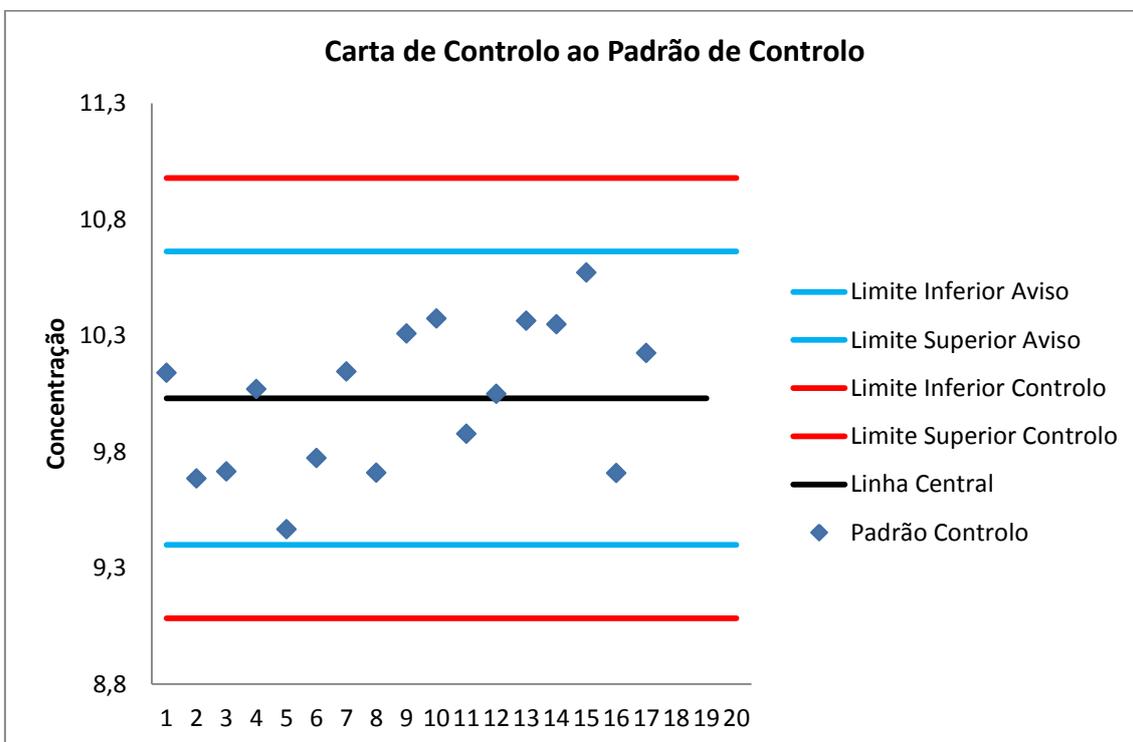
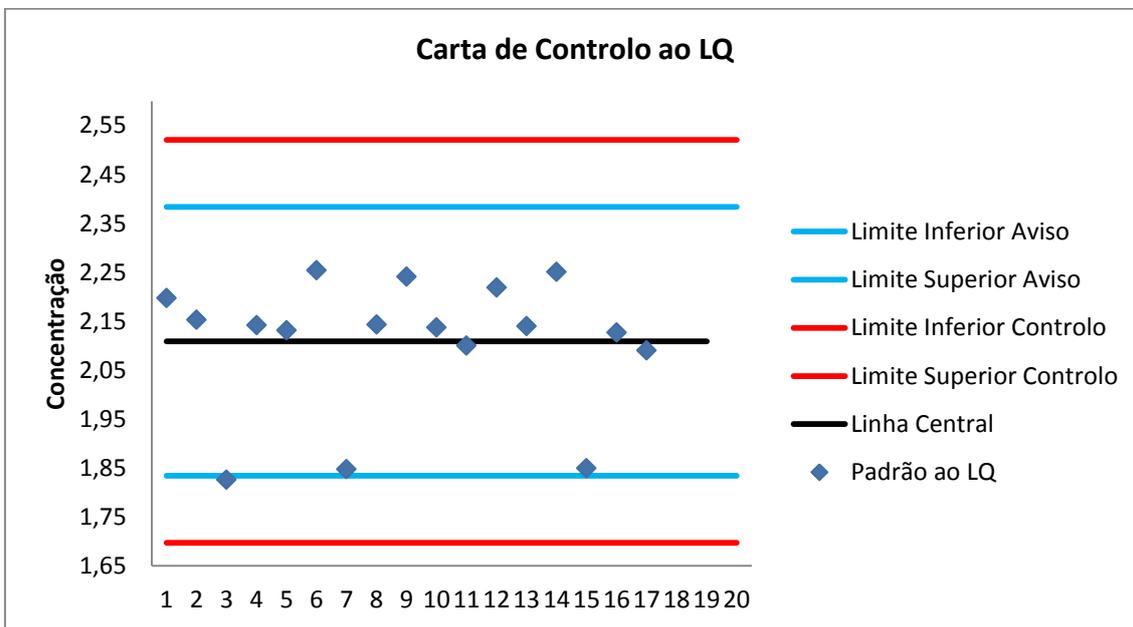
Carta de Controle ao Padrão de Controlo



## Anexo 6      DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 2-20 µG/L DE CRÓMIO

EB µg/L	Optimização		PLQ µg/L	PC µg/L	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo cps					
-0,02	13	826	2,197	10,1	17,40123529	39,15051	0,998082
0,41	16	805	2,153	9,7	10,74420588	43,19692	0,999667
0,09	26	869	1,826	9,7	11,09088235	43,52508	0,998769
-0,19	26	725	2,142	10,1	19,93647059	36,36156	0,998893
0,09	16	785	2,131	9,5	21,00811765	39,91556	0,998865
-0,19	16	686	2,254	9,8	21,88235294	34,65546	0,999241
0,24	20	665	1,847	10,1	18,70588235	33,10294	0,99818
-0,363	12	758	2,143	9,7	25,80985294	36,75418	0,99974
0,059	26	769	2,241	10,3	19,96388235	37,19533	0,999466
0,042	19	707	2,137	10,4	18,77714706	37,82164	0,999705
0,31	18	802	2,1	9,9	22,70361765	38,79474	0,999313
-0,009	21	750	2,219	10,0	16,79902941	37,20966	0,99926
0,075	19	745	2,14	10,4	16,20323529	39,33433	0,99957
0,1	20	732	2,251	10,3	15,79114706	36,38807	0,999966
-0,168	10	680	1,849	10,6	10,09241176	35,9996	0,999684
-0,149	6	746	2,127	9,7	15,09294208	36,92307	0,999873
-0,005	23	695	2,09	10,2	17,34221236	36,34059	0,999837

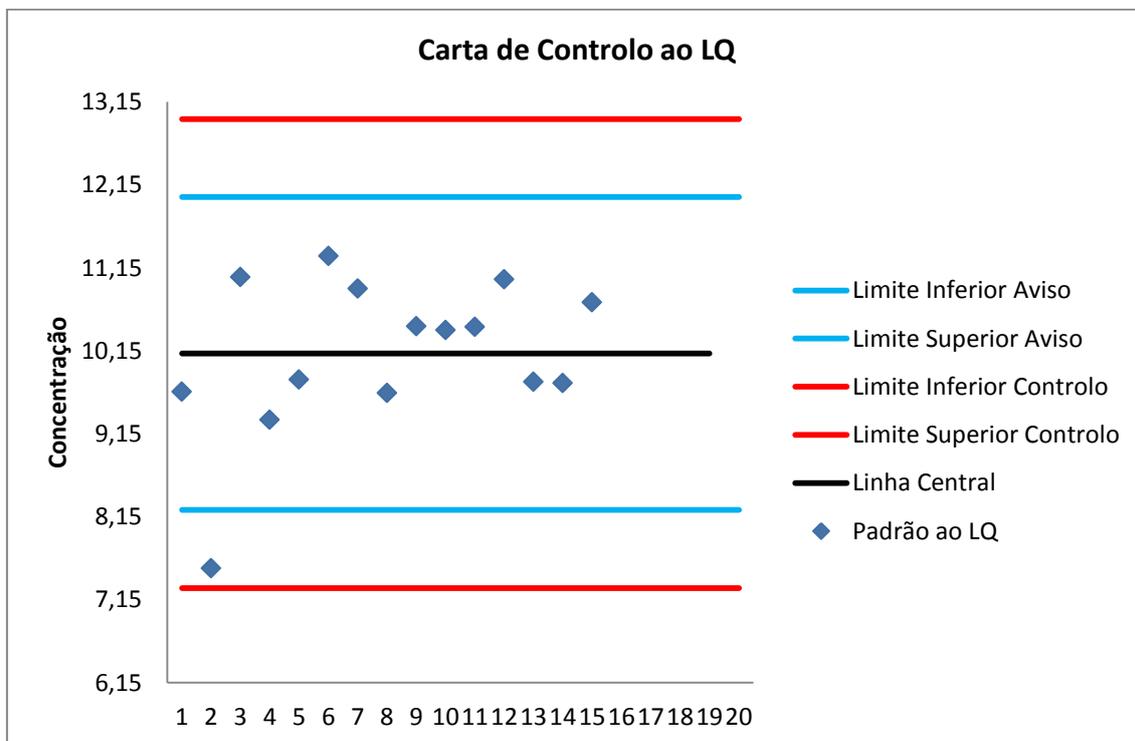
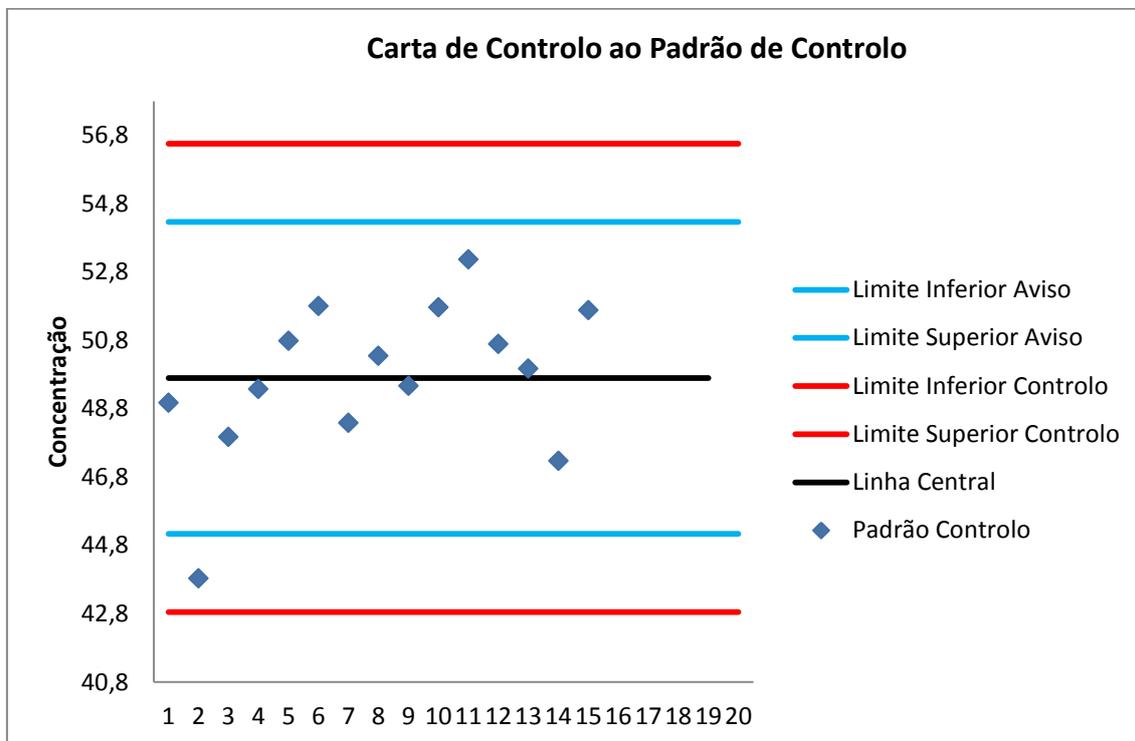
Unidades µg/L		Unidades µg/L		Unidades µg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
0,2	4	24,1	25	3,8	90,18%
0,1	12,0	24,3	25	11,4	94,19%
0,113	12	24,15	25	11,674	96,37%
0,221	4	24,55	25	4,24	100,57%
0,285	4,0	24,55	25	4,352	101,80%
0,414	6	45	50	6,687	105,24%
0,414	6	45	50	6,406	100,56%
-0,181	12	20,5	25	12,283	103,60%
0,243	6	44,95	50	6,156	98,96%
0,067	6	44,95	50	6,304	104,06%
-0,169	12	47,3	50	11,843	100,02%
0,1	2	49,45	50	2,216	105,86%
0,381	6	48,55	50	6,052	94,70%
0	12	47,3	50	11,841	98,68%
0,08	2	49,45	50	2,233	107,69%
0,268	6	8,99	10	6,788	109,12%
0,797	2	48,15	50	2,862	104,72%
0,318	2	48,15	50	2,242	96,79%
0,171	6	8,99	10	6,011	97,62%
0,034	6	8,99	10	5,934	98,39%
0	6	8,99	10	6,636	110,60%
0,191	6	8,99	10	6,201	100,49%
0,311	6	8,99	10	5,992	95,21%
0,124	6	8,99	10	6,312	103,34%
0,123	6	8,99	10	5,821	95,17%



## Anexo 7 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 10-100 µG/L DE FERRO

EB µg/L	Optimização		PLQ µg/L	PC µg/L	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo					
		cps					
-0,582			9,656	48,975	63,97191032	38,99264	0,998674
-1,221			7,531	43,836	44,35743464	39,06926	0,997055
0,588			11,037	47,972	44,38916122	40,25854	0,999619
-1,103			9,32	49,376	22,95629085	28,25648	0,998534
0,421			9,803	50,789	61,34906046	38,29704	0,999574
0,689	25	4059	11,294	51,805	0,991898148	39,16553	0,998102
0,175	24	4045	10,9	48,379	4,728485839	39,0272	0,999293
-0,387	15	4025	9,643	50,345	3,299087691	41,09586	0,999384
-0,355	7	3628	10,447	49,465	25,84919662	36,89228	0,999479
-0,169	3	3708	10,401	51,769	28,40815632	36,53667	0,999564
-0,301	22	3685	10,438	53,17	22,02941176	39,58151	0,999852
-0,711	20	4082	11,013	50,694	26,58449074	40,97454	0,999994
-0,714	5	3841	9,778	49,972	27,06284041	38,40139	0,999135
-0,042	13	3883	9,76	47,275	20,3202667	38,91327	0,999976
	26	3655	10,733	51,677	7,631104319	37,93207	0,999732

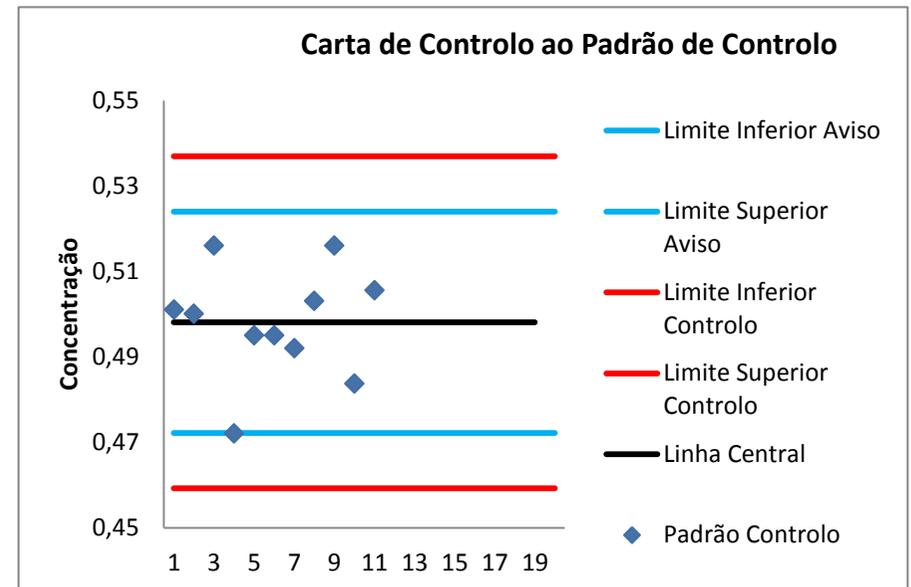
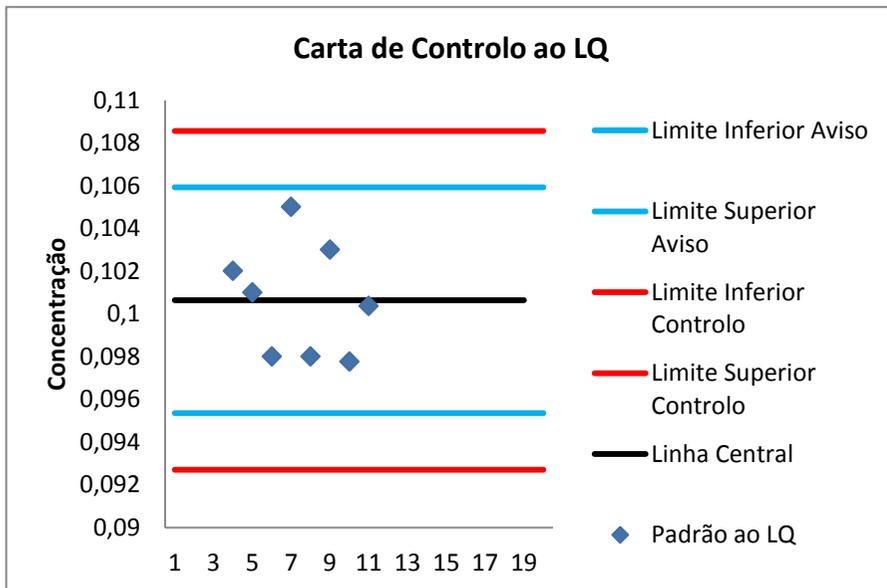
Unidades µg/L		Unidades µg/L		Unidades µg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
10,441	50	49,5	50	63,43	106,19%
6,335	50	24,5	25	49,948	87,48%
6,335	25	24,75	25	33,057	107,14%
17,028	50	23,25	25	66,324	100,98%
5,071	30	23,87	25	37,843	110,00%
34,076	20	24,1	25	52,784	99,67%
30,565	60	24,35	25	88,109	97,23%
14,588	60	24,15	25	71,898	96,34%
18,871	20	24,55	25	40,748	111,08%
14,386	20	24,55	25	36,981	114,27%
8,127	60	47,3	50	67,032	98,91%
6,847	10	49,45	50	17,009	102,37%
9,684	30	48,55	50	38,226	96,08%
20,005	60	47,3	50	69,78	84,76%
12,332	10	49,45	50	22,805	106,09%
5,067	60	47,3	50	66,769	103,29%
7,241	60	47,3	50	70,851	106,67%
20,717	60	9,42	10	82,129	104,36%



## Anexo 8 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 0,1-1 MG/L DE FERRO

EB	Optimização		PLQ	PC	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo					
mg/L	cps		mg/L				
0				0,501	2,04828093	1891,804	0,999846
0,01				0,500	-11,24246293	1365,671	0,99945
0,007	2	1564		0,516	-10,47903435	1608,626	0,998743
0,004	-2	1120	0,102	0,472	0,094210832	1099,541	0,998839
-0,002	3	1529	0,101	0,495	0,995558663	1608,242	0,999853
-0,003	-2	1531	0,098	0,495	6,064450147	1493,634	0,999978
0	2	1506	0,105	0,492	-2,020296847	1585,321	0,999752
-0,007	-2	1510	0,098	0,503	12,01784635	1504,631	0,999755
0,002	3	1356	0,103	0,516	3,750215419	1381,387	0,999886
-0,006	-1	1471	0,098	0,484	0,161670685	1479,004	0,999928
-0,007	0	1434	0,100	0,506	4,713394227	1473,906	0,999917

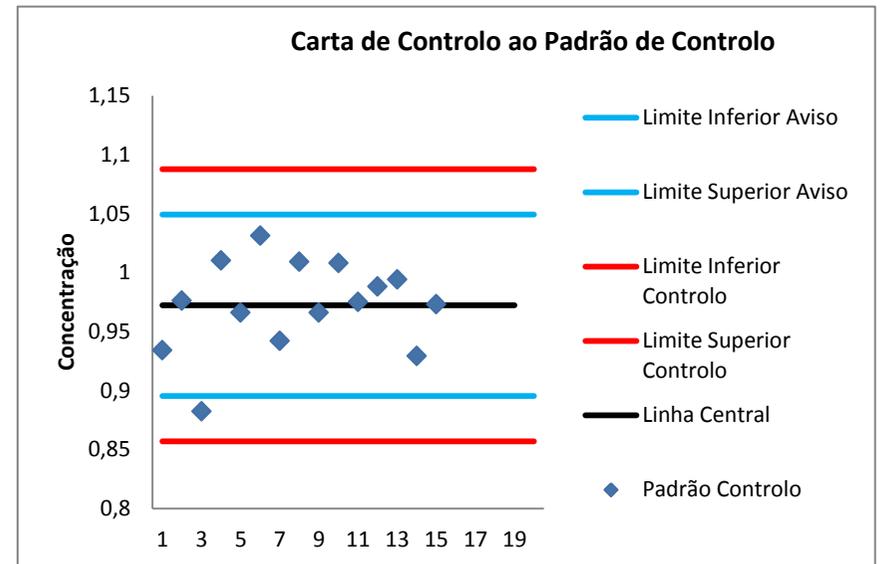
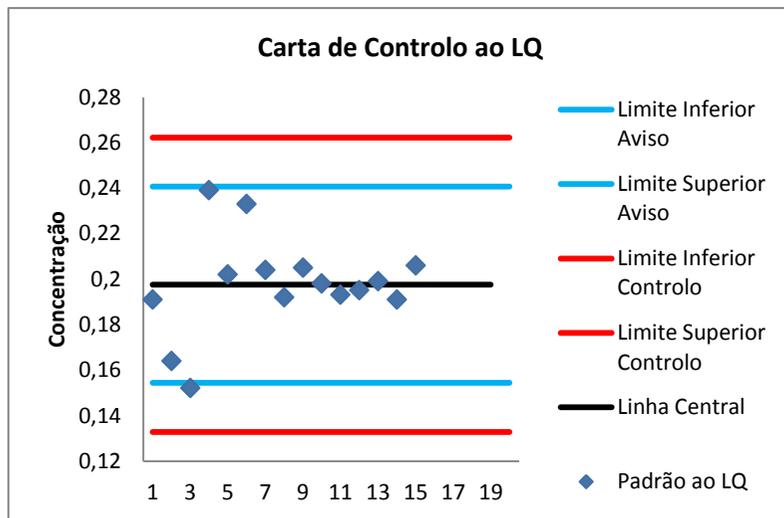
Unidades		Unidades		Unidades	
mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
0,004	0,5	45,75	50	0,482	95,67%
0,034	0,2	24,15	25	0,227	97,08%
0,013	0,3	45	50	0,316	101,43%
0,013	0,3	45	50	0,319	102,43%
0,039	0,6	20,5	25	0,584	92,00%
0,023	0,3	44,95	50	0,32	99,77%
0,007	0,3	44,95	50	0,297	96,90%
0,011	0,3	8,99	10	0,304	98,04%
0	0,1	48,15	50	0,104	104,00%
0,021	0,1	48,15	50	0,116	95,78%
0,013	0,3	8,99	10	0,298	95,44%
0,011	0,3	8,99	10	0,286	92,04%
0,014	0,3	8,99	10	0,309	98,80%



## Anexo 9 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 0,2-2 MG/L DE MAGNÉSIO

EB	Optimização		PLQ	PC	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo					
mg/L		cps	mg/L				
-0,016			0,191	0,934	47,87908497	5701,618	0,999323
0,001			0,164	0,976	76,06267509	4211,612	0,998708
-0,005			0,152	0,882	14,95789356	4093,135	0,997496
0,005			0,239	1,01	15,88724465	3961,918	0,999692
0,008			0,202	0,966	-8,021388784	3955,635	0,998824
0,002	7	7252	0,233	1,031	-23,72630719	3446,914	0,999253
-0,001	2	7394	0,204	0,942	-4,081699346	3569,413	0,999479
-0,008	-10	7603	0,192	1,009	0,674019608	3760,87	0,999163
-0,006	1	7405	0,205	0,966	30,97140523	3696,048	0,999571
-0,013	4	7522	0,198	1,008	29,61111111	3679,831	0,999703
-0,014	1	7872	0,193	0,975	47,75490196	3835,848	0,999501
-0,014	3	7251	0,195	0,988	30,83169935	3643,494	0,99973
-0,014	0	7295	0,199	0,994	48,128	3552,288	0,99976
0	-14	5712	0,191	0,929	18,00858001	2925,505	0,99992
	-5	6805	0,206	0,973	5,945195195	3388,667	0,999909

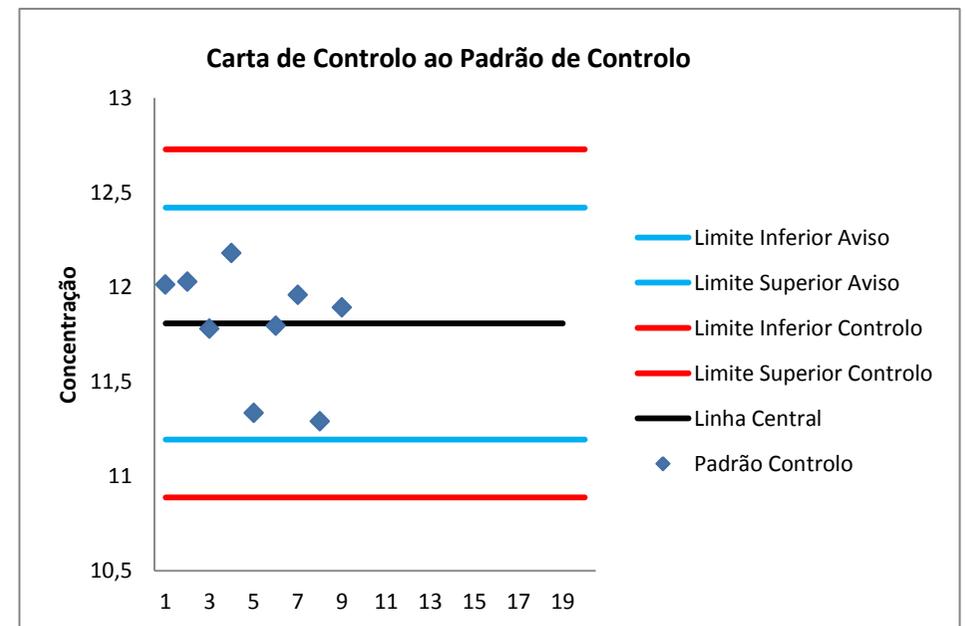
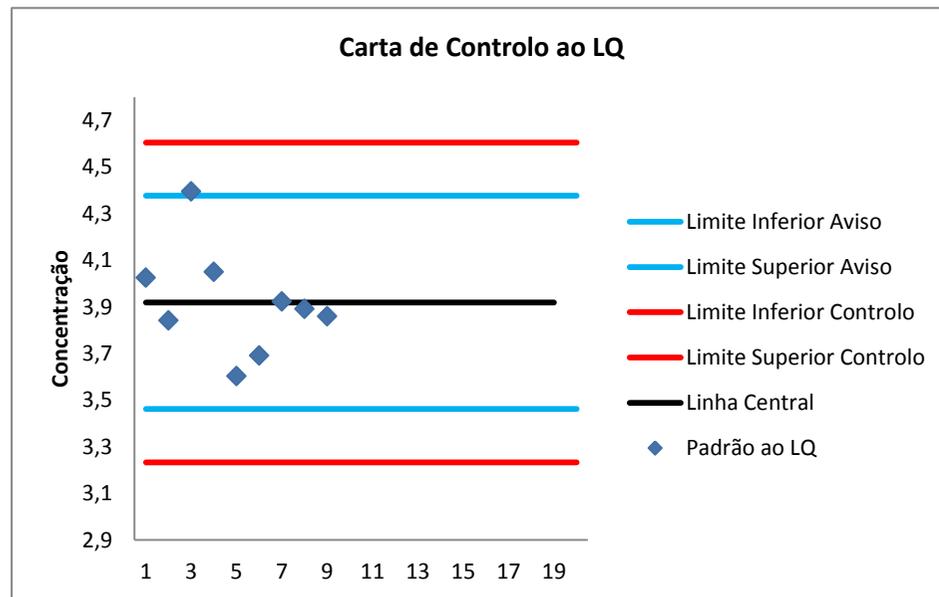
Unidades		Unidades			
mg/L	mg/L	mg/L		mg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
0,412	0,2	48,9	50	0,58	88,53%
0,412	0,4	49,8	50	0,77	89,91%
0,282	0,5	24,75	25	0,808	105,76%
0,282	1	24,5	25	1,124	84,76%
0,349	1	23,25	25	1,303	97,84%
0,343	0,4	24,1	25	0,729	99,59%
0,325	1,2	24,35	25	1,45	94,45%
0,16	1,2	24,15	25	1,331	98,04%
0,377	0,4	24,55	25	0,768	99,45%
0,241	0,4	24,55	25	0,643	101,58%
0,238	1,2	47,3	50	1,382	96,40%
0,17	0,2	49,45	50	0,369	100,44%
0,271	0,6	48,55	50	0,823	93,31%
0,172	1,2	47,3	50	1,329	97,19%
0,079	0,2	49,45	50	0,279	100,43%
0,312	1,2	9,42	10	1,43	94,67%



## Anexo 10 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 4-20 µG/L DE MANGANÊS

EB	Optimização		PLQ	PC	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo					
µg/L	cps		µg/L				
0,18	10	4556	4,025	12,012	-10,91402116	211,5946	0,999664
0,048	14	4551	3,841	12,027	17,5542328	222,0187	0,999154
-0,04	52	4401	4,395	11,779	104,3597884	215,5867	0,998171
-0,136	27	4486	4,049	12,178	76,58730159	219,5524	0,998371
-0,23	43	4810	3,602	11,333	89,67989418	228,4635	0,999778
-0,239	43	4366	3,69	11,795	44,64021164	217,673	0,99994
-0,078	30	4457	3,923	11,958	65,04497354	212,6978	0,999334
-0,141	2	4945	3,891	11,289	30,26647834	251,2559	0,999998
-0,049	23	4981	3,859	11,891	28,02024482	240,9021	0,999953

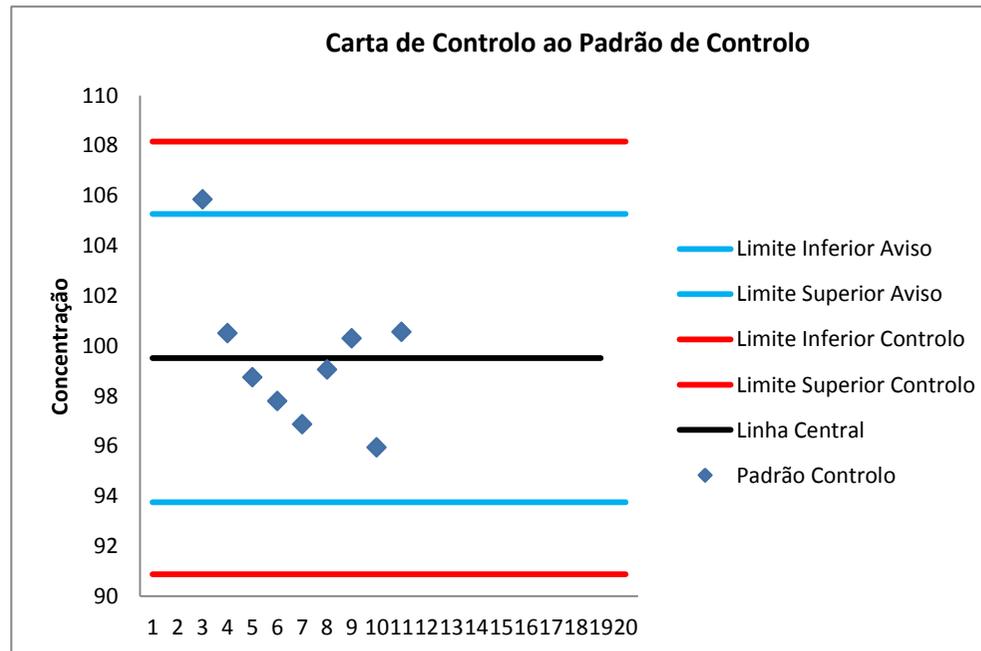
Unidades		Unidades			
µg/L	µg/L			µg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
0,412	0,2	48,9	50	0,58	<b>88,53%</b>
0,412	0,4	49,8	50	0,77	<b>89,91%</b>
0,282	0,5	24,75	25	0,808	<b>105,76%</b>
0,282	1	24,5	25	1,124	<b>84,76%</b>
0,349	1	23,25	25	1,303	<b>97,84%</b>
0,343	0,4	24,1	25	0,729	<b>99,59%</b>
0,325	1,2	24,35	25	1,45	<b>94,45%</b>
0,16	1,2	24,15	25	1,331	<b>98,04%</b>
0,377	0,4	24,55	25	0,768	<b>99,45%</b>
0,241	0,4	24,55	25	0,643	<b>101,58%</b>
0,238	1,2	47,3	50	1,382	<b>96,40%</b>
0,17	0,2	49,45	50	0,369	<b>100,44%</b>
0,271	0,6	48,55	50	0,823	<b>93,31%</b>
0,172	1,2	47,3	50	1,329	<b>97,19%</b>
0,079	0,2	49,45	50	0,279	<b>100,43%</b>
0,312	1,2	9,42	10	1,43	<b>94,67%</b>



## Anexo 11 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 20-200 µG/L DE MANGANÊS

EB µg/L	Optimização		PC µg/L	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo cps				
0,18	37	38419	105,846	-155,6320058	196,1476	0,998625
0,048	5	41,264	100,504	237,8357602	202,228	0,999206
-0,04	30	44235	98,735	418,6126082	213,3154	0,999638
-0,136	28	42031	97,786	374,0697966	200,8823	0,999636
-0,23	15	45187	96,858	583,9849626	213,1228	0,999114
-0,239	34	41106	99,05	472,3785306	198,9521	0,999602
-0,078	39	44895	100,295	398,7900168	209,3761	0,999633
-0,141	2	40617	95,938	316,802465	223,1814	0,999773
-0,049	23	43387	100,549	349,3685704	209,2473	0,999735

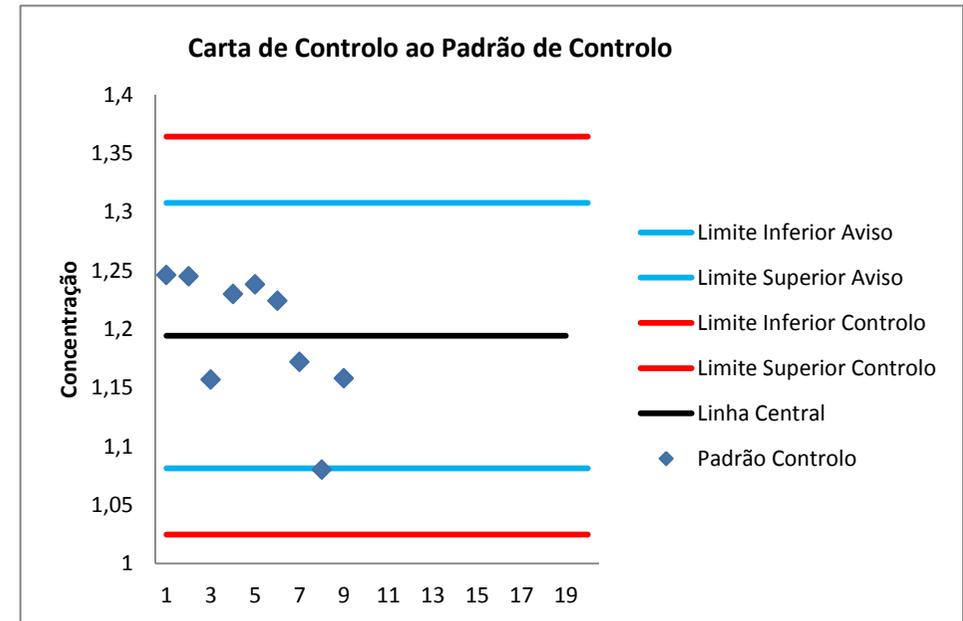
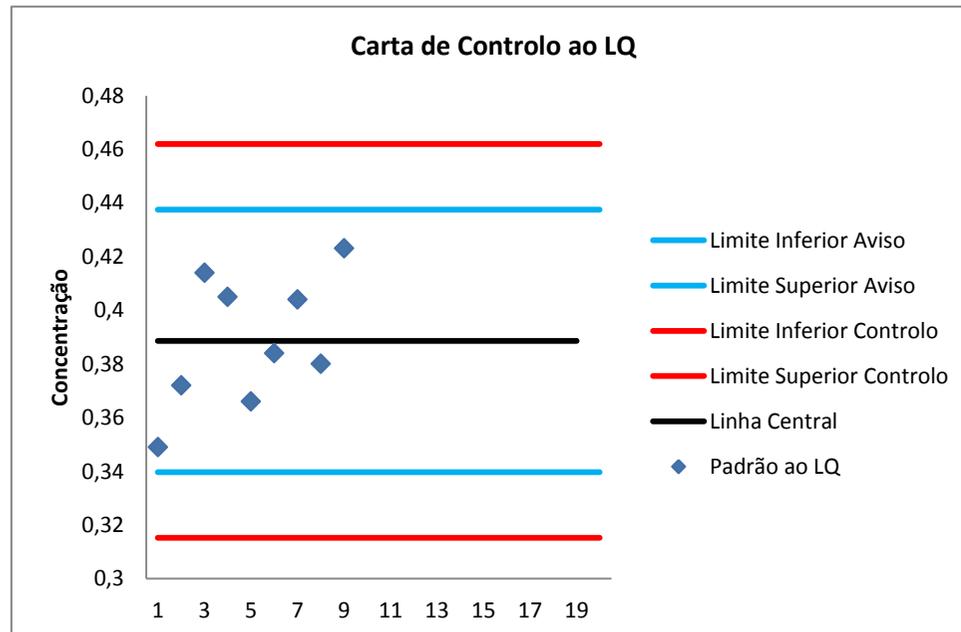
Unidades				Unidades	
µg/L	µg/L			µg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
1,15	100	45,75	50	97,224	96,17%
1,817	40	24,15	25	43,284	103,82%
1,711	60	45	50	63,323	102,97%
1,711	60	45	50	62,716	101,96%
4,787	120	20,5	25	119,415	96,24%
0	60	44,95	50	63,819	106,37%
0	60	44,95	50	59,947	99,91%
0	60	8,99	10	60,184	100,31%
0	20	48,15	50	18,109	90,55%
3,643	20	48,15	50	22,745	96,18%
0,072	60	8,99	10	55,545	92,47%
0,208	60	8,99	10	53,263	88,46%
0,185	60	8,99	10	58,396	97,05%
0	60	8,99	10	60,486	100,81%



## Anexo 12 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 0,4-2 MG/L DE POTÁSSIO

EB	Optimização		PLQ	PC	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo					
mg/L	cps		mg/L				
0,18	0	1171	0,349	1,246	61,66787919	557,748	0,997369
0,048	3	1233	0,372	1,245	-10,54938272	599,162	0,998585
-0,04	40	1188	0,414	1,157	38,43364198	570,7801	0,999417
-0,136	52	1206	0,405	1,23	20,31878307	577,5863	0,999132
-0,23	60	1222	0,366	1,238	34,47001764	597,6731	0,999807
-0,239	41	1247	0,384	1,224	10,28361993	606,8672	0,998535
-0,078	80	1240	0,404	1,172	35,31161817	569,0561	0,99823
-0,141	10	1267	0,38	1,08	25,43734306	597,8963	0,999378
-0,049	47	1203	0,423	1,158	62,63182674	597,1722	0,9993

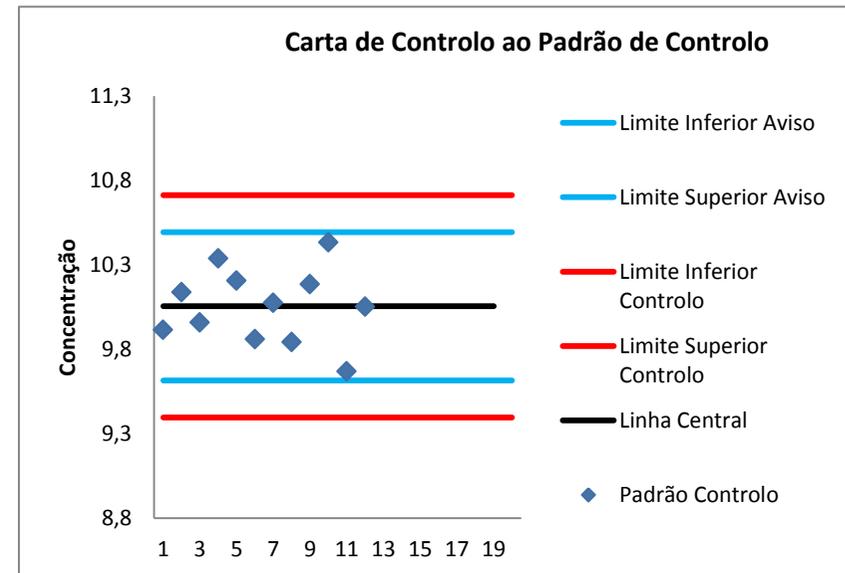
Unidades		Unidades			
mg/L	mg/L			mg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
0,387	1	23,25	25	1,368	100,81%
0,472	0,4	24,1	25	0,873	104,50%
0,398	1,2	24,35	25	1,46	89,36%
0,062	1,2	24,15	25	1,235	97,93%
0,284	1,2	47,3	50	1,439	97,53%
0,182	0,4	49,45	50	0,636	114,00%
0,497	0,8	48,55	50	1,322	104,93%
0,262	1,2	47,3	50	1,409	96,76%
0,082	0,5	49,45	50	0,551	93,98%
0,697	1,2	47,3	50	1,962	108,55%



### Anexo 13 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 2-20 MG/L DE POTÁSSIO

EB	Optimização		PC	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo				
mg/L	cps		mg/L			
-0,002			9,913	3,38107447	609,1022	0,999867
0,279			10,137	-109,1832286	574,471	0,999258
-0,01			9,957	16,04537935	599,6556	0,999833
0,154	15	10782	10,336	-34,71216646	559,127	0,998083
-0,106	10	10216	10,205	71,30912223	535,52	0,998528
0,011	19	11017	9,859	46,74437056	568,2929	0,999981
-0,082	43	10819	10,073	88,17199155	531,9027	0,999566
-0,109	32	11702	9,841	59,06337227	602,6174	0,999906
-0,069	72	11327	10,184	95,54566225	566,588	0,999881
-0,066	64	10923	10,431	89,43700725	537,1607	0,999883
-0,081	10	11558	9,668	3,306032918	584,0191	0,999994
-0,108	47	11385	10,05	87,26883215	579,1506	0,999934

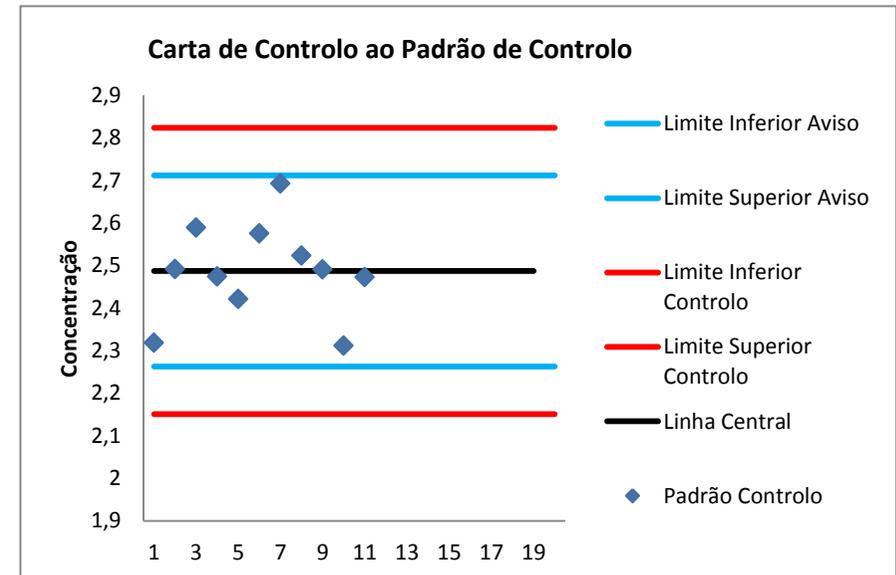
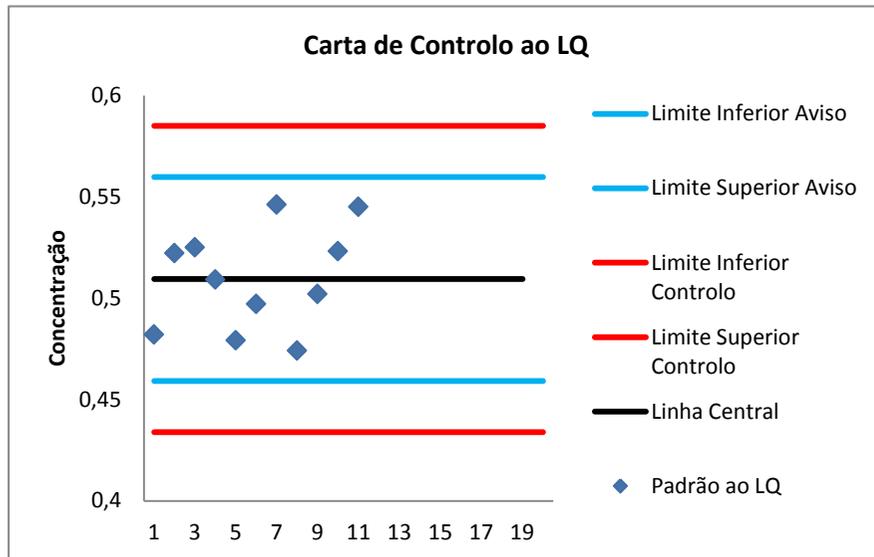
Unidades		Unidades			
mg/L	mg/L	mg/L		mg/L	
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
2,788	10	45,75	50	12,21	96,59%
1,032	4	24,15	25	4,818	95,53%
3,118	6	23,87	25	8,977	100,00%
2,982	6	45	50	8,756	101,20%
2,982	6	45	50	8,858	102,90%
1,535	12	20,5	25	12,573	94,29%
2,211	6	44,95	50	8,061	101,22%
1,426	6	44,95	50	7,223	99,02%
1,478	6	8,99	10	7,268	98,99%
1,941	2	48,15	50	3,894	101,24%
1,922	2	48,15	50	3,85	99,96%
1,964	6	8,99	10	7,531	96,09%
1,968	6	8,99	10	7,392	93,71%
1,937	6	8,99	10	7,722	99,68%
1,615	6	8,99	10	7,685	103,89%



## Anexo 14 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 0,5-5 MG/L DE SÓDIO

EB mg/L	Optimização		PLQ mg/L	PC mg/L	Ordenada na Origem	Declive	R <sup>2</sup>
	Eb	Ptopo cps					
0,007			0,482	2,318	84,69014568	1142,92	0,9999304
-0,001	29	9106	0,522	2,491	0,167177288	1765,116	0,9994036
0,02	-7	8681	0,525	2,589	-26,21037582	1725,954	0,9994757
0,039	9	8948	0,509	2,474	-48,47252859	1816,836	0,9996106
0,038	31	8613	0,479	2,421	41,42657271	1743,901	0,9998915
0,02	-26	8743	0,497	2,575	29,80218546	1704,938	0,9998519
0,027	98	6044	0,546	2,692	75,09517974	1267,045	0,9997281
-0,002	80	6704	0,474	2,523	87,21262255	1326,074	0,9998834
-0,032	-38	10658	0,502	2,49	30,64	1796,138	0,99997
-0,008	21	8356	0,523	2,311	66,67956349	1706,79	0,9995339
0,025	12	7307	0,545	2,472	27,66818157	1670,802	0,9997697

Unidades mg/L		Unidades mg/L			
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
3,072	2	48,9	50	4,84	91,78%
2,642	2,5	23,25	25	4,952	99,80%
2,135	2	24,1	25	3,973	95,74%
1,909	1	24,35	25	2,771	91,16%
1,639	1	24,15	25	2,589	100,57%
2,795	1	24,55	25	3,754	100,93%
2,075	1	24,55	25	3,077	103,94%
2,186	3	47,3	50	4,849	92,70%
1,642	0,5	49,45	50	2,161	107,41%
2,353	1,5	48,55	50	3,898	107,55%
1,571	3	47,3	50	4,432	98,19%
1,771	0,5	49,45	50	2,22	93,70%



### Anexo 15 DADOS DE VALIDAÇÃO DA GAMA 5-50 MG/L DE SÓDIO

EB mg/L	Optimização		PC mg/L	Ordenada na Origem	Declive	R^2
	Eb	Ptopo cps				
-0,249			24,625	386,6621055	1226,729	0,999774
0,317			24,979	-236,7870169	1057,482	0,999291
-0,17			24,889	285,6792739	1188,177	0,999786
-0,198	12	73641	25,902	324,1964298	1515,243	0,999131
-0,555	68	46160	25,72	588,7014442	904,7133	0,998975
-0,37	43	77463	25,434	698,1235343	1594,749	0,999384
-0,536	84	76230	25,79	974,3473557	1503,687	0,998669
-0,564	-3	81072	24,953	954,2372042	1671,584	0,999452
-0,51	46	76810	25,932	819,5589247	1549,031	0,999595
-0,436	43	74158	25,958	682,1804357	1472,931	0,999627
-0,423	21	74808	24,75	636,7133703	1554,06	0,999341
-0,438	12	65471	25,875	741,509336	1535,112	0,998872

Unidades mg/L		Unidades mg/L			
Cnativa	Cfortificação	Vamostra (mL)	V6 (mL)	Cobs	Resultado (%)
12,481	25	45,75	50	34,202	91,13%
4,948	10,0	24,15	25	13,887	91,07%
13,807	15,2	23,87	25	28,486	100,68%
13,579	20	45	50	32,026	99,02%
13,579	20,0	45	50	32,203	99,91%
7,087	20	20,5	25	25,806	99,97%
10,189	15	44,95	50	24,592	102,88%
7,192	15	44,95	50	21,498	100,22%
7,912	15	8,99	10	22,26	100,98%
9,903	5	48,15	50	14,787	105,01%
8,771	5	48,15	50	13,653	104,13%
9,265	15	8,99	10	23,155	98,84%
9,188	15	8,99	10	22,543	95,22%
9,323	15	8,99	10	22,759	95,85%
8,331	15	8,99	10	23,63	107,60%

