

**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

**Implementação e validação de catões por cromatografia iónica**

Ricardo Filipe da Silva Machado

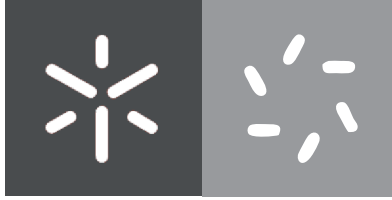
**Implementação e validação de catões por  
cromatografia iónica**

Ricardo Filipe da Silva Machado

UMinho | 2021

novembro de 2021





**Universidade do Minho**  
Escola de Ciências

Ricardo Filipe da Silva Machado

**Implementação e validação de catiões por  
cromatografia iónica**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Professora Doutora Maria Dulce Silva Geraldo**

e sob coorientação de  
**Manuela Raquel Guimarães Peixoto**

## Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho:



Atribuição - Não Comercial - Compartilha Igual

CC BY-NC-SA

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

## Agradecimentos

Chegado o fim do processo de escrita acadêmico desta dissertação, não poderia terminar totalmente sem deixar as devidas palavras de agradecimento a todos aqueles que não só facilitaram a ultrapassagem dos obstáculos normais que foram aparecendo, como também me acompanharam, desde sempre, ao longo do percurso acadêmico.

Primeiramente agradecer à minha família, pai, mãe e irmã, que são a base e o suporte principal que estive, está e estará sempre presente. Agradecer à minha namorada, Carolina, por tornar sempre tudo mais bonito, por ser a generosidade e a bondade em pessoa, e por me ensinar a ser melhor todos os dias.

Seguidamente agradeço à Doutora Dulce Geraldo, por ser o expoente máximo da importância de ser lecionado por professores incríveis, motivadores e dedicados e cuja paixão pela química e pelo ensino em harmonia da mesma me comove sempre.

Agradeço à empresa Águas do Norte, S.A. e ao Engenheiro Marco Silva por permitirem a oportunidade de estagiar e colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos durante a formação acadêmica. À responsável técnica Raquel Peixoto por me ter acompanhado ao longo de todo o processo experimental e pela forma gentil e acolhedora no trato, que me fez sentir sempre feliz e focado nos objetivos traçados. A todos os membros do laboratório (Ana, José Nuno, Patrícia C, Patrícia F, Diana, Carolina, Carlos, Pedro e Paulo) pela forma afável como sempre me receberam e, por todos os momentos passados que guardarei como bonitas lembranças na memória.

Por fim, mas nem por isso menos importante, resta-me agradecer a todos os meus amigos mais próximos, não só por me terem acompanhado ao longo de todo o percurso acadêmico mas também por todos os bons momentos vividos ao longo destes anos, que venham mais.

O meu mais sincero obrigado a todos!

## Declaração de integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

## Resumo

A presente dissertação, desenvolvida no âmbito da unidade curricular Projeto Individual do Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química do departamento de Química da Universidade do Minho, foi realizada na empresa Águas do Norte, situada em Areias de Vilar no concelho de Barcelos. Esta dissertação teve como objetivo a implementação, a validação e o controlo de qualidade do método analítico de determinação de alguns catiões em águas de consumo e águas naturais superficiais doces, com recurso à cromatografia iónica com supressão química.

O estudo da validação do método analítico de determinação dos catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio foi efetuado através da avaliação dos parâmetros de desempenho tais como, a gama de trabalho, a linearidade, a sensibilidade, a seletividade, os limiares analíticos, a precisão, a justeza e a robustez. A estimativa da incerteza de medição foi também determinada e, posteriormente, foi monitorizado o controlo de qualidade interno com recurso a cartas de controlo. Os resultados obtidos nos parâmetros avaliados foram comparados com os critérios de aceitação definidos pelo próprio laboratório e com os valores estabelecidos no Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto de 1998 e no Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de dezembro de 2017, uma vez que, o Laboratório da Águas do Norte consta da lista de laboratórios aptos emitida pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos.

O método analítico apresentou uma boa linearidade e limiares analíticos adequados, para todos os catiões. A sensibilidade foi confirmada e o método apresentou taxas de recuperação dentro dos valores estipulados, concluindo que o método é seletivo para as gamas de concentração estabelecidas. A precisão avaliada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia apresentou coeficientes de variação e erro relativo satisfatórios. Na avaliação da justeza do método através de ensaios de recuperação, MRC e ensaios interlaboratoriais, obtiveram-se valores de taxas de recuperação e *Z-score* satisfatórios. A incerteza de medição do método estimada mediante a norma ISO 11352:2012 demonstrou ser adequada para o uso. O controlo de qualidade interno permitiu confirmar a fiabilidade dos resultados e que, por conseguinte, todo o processo se encontra sob controlo.

**Palavras-chave:** Cromatografia iónica; Parâmetros de desempenho; Quantificação de catiões; Validação.

## Abstract

This dissertation was developed within the scope of the course unit Individual Project of the Master's Degree in Techniques of Characterization and Chemical Analysis of the Chemistry Department of the University of Minho and was carried out in the company Águas do Norte, located in Areias de Vilar, in the council of Barcelos. This dissertation aimed the implementation, validation, and quality control of the analytical method for the determination of cations in fresh drinking water and surface fresh natural water, using ion chromatography with chemical suppression.

The validation study of the analytical method for the determination of sodium, ammonium, magnesium, and calcium cations was carried out by evaluating the performance parameters such as working range, linearity, sensitivity, selectivity, analytical thresholds, precision, accuracy, and robustness. The estimated measurement uncertainty was also determined, and subsequently internal quality control was monitored using control charts. The results obtained for the parameters assessed were compared with the acceptance criteria defined by the laboratory itself and with the values established in Decree-Law No. 236/98 of 1 August 1998 and Decree-Law No. 152/2017 of 7 December 2017, since the Águas do Norte Laboratory is on the list of suitable laboratories issued by the Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos.

The analytical method showed good linearity and adequate analytical thresholds for all cations. The sensitivity was confirmed, and the method presented recovery rates within the stipulated values, concluding that the method is selective for the concentration ranges established. The precision evaluated under repeatability and intermediate precision conditions presented satisfactory coefficients of variation and relative error. In the evaluation of the method accuracy by recovery tests, CRM and interlaboratory assays, satisfactory recovery rates and Z-score values were obtained. The method measurement uncertainty estimated according to ISO 11352:2012 proved to be suitable for use. Internal quality control confirmed the reliability of the results and that the entire process is therefore under control.

**Key words:** Cations quantification; Ionic chromatography; Performance parameters; Validation.



## Índice

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros .....	i
Agradecimentos .....	ii
Declaração de integridade .....	iii
Resumo .....	iv
Abstract .....	v
Lista de abreviaturas e símbolos.....	ix
Índice de Figuras.....	xiv
Índice de Tabelas .....	xvi
I - Introdução.....	1
1 Enquadramento do Tema.....	2
1.1 Apresentação da Empresa .....	2
1.2 Água .....	5
1.3 Monitorização da Qualidade da água.....	9
1.3.1 Legislação aplicada à qualidade da água .....	9
1.3.2 Planeamento.....	10
1.3.3 Amostragem .....	10
1.3.4 Colheita de amostras.....	10
1.3.5 Preservação das amostras.....	11
2 Determinação dos catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio.....	14
2.1 Cromatografia.....	14
2.1.1 Cromatografia Iónica .....	15
2.2 Métodos alternativos.....	20
3 Validação.....	22
3.1 Curva de Calibração .....	24
3.2 Gama de Trabalho .....	26
3.3 Linearidade .....	27
3.4 Sensibilidade .....	29
3.5 Seletividade.....	29
3.6 Limiares analíticos.....	30
3.6.1 Limite de Detecção .....	30
3.6.2 Limite de Quantificação .....	31
3.7 Precisão .....	32
3.8 Justeza.....	34

3.8.1	Materiais de Referência Certificados .....	35
3.8.2	Ensaio Interlaboratoriais .....	38
3.8.3	Ensaio de Recuperação .....	39
3.9	Robustez .....	39
3.10	Incerteza de medição.....	40
3.10.1	Incerteza associada aos erros aleatórios .....	42
3.10.2	Incerteza associada aos erros sistemáticos .....	43
3.11	Garantia de Controlo de Qualidade.....	46
3.11.1	Controlo de qualidade interno.....	46
II – Materiais e Métodos .....		49
4	Materiais e Métodos.....	50
4.1	Materiais .....	50
4.2	Reagentes .....	51
4.3	Preparação de soluções.....	52
4.3.1	Solução eluente de MSA 28,0 mM (CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H) .....	52
4.3.2	Soluções utilizadas para a curva de calibração.....	52
4.3.3	Padrões independentes e padrões de controlo da curva de calibração.....	53
4.4	Condições experimentais .....	55
4.5	Procedimento experimental.....	56
4.5.1	Curva de calibração.....	56
4.5.2	Amostras .....	56
4.5.3	Ensaio de recuperação .....	56
4.5.4	Teste de robustez.....	56
4.6	Colheita e transporte de amostras.....	56
4.7	Análise e Apresentação de resultados .....	57
III – Apresentação e Discussão de Resultados.....		58
5	Validação do método de determinação de cationes por cromatografia iónica .....	59
5.1	Curva de Calibração .....	60
5.2	Gama de Trabalho .....	63
5.3	Linearidade .....	64
5.4	Sensibilidade .....	65
5.5	Seletividade.....	65
5.6	Limiars analíticos.....	66
5.7	Precisão .....	69
5.7.1	Repetibilidade .....	69

5.7.2	Precisão Intermédia .....	70
5.8	Justeza.....	76
5.9	Robustez.....	79
5.10	Incerteza de medição.....	81
5.11	Controlo de qualidade do método .....	84
5.11.1	Controlo de Qualidade Interno .....	85
6	Outras atividades desenvolvidas no Laboratório .....	92
IV	– Conclusão.....	93
7	Conclusão.....	94
V	– Bibliografia.....	97
VI	– Anexos.....	107
Anexo A	- Frases de advertência de perigo e recomendações de prudência.....	108
Anexo B	– Incerteza expandida da concentração de soluções padrão .....	109
Anexo C	– Instruções de funcionamento do Cromatógrafo ICS 1000 .....	110
Anexo D	– Estudo da Gama de Trabalho.....	111
Anexo E	– Sensibilidade ao longo do tempo .....	112
Anexo F	– Ensaios de recuperação em duas matrizes para o estudo da seletividade.....	113
Anexo G	– Limiares analíticos do método.....	114
Anexo H	– Precisão do método em condições de repetibilidade.....	115
Anexo I	– Precisão do método em condições de precisão intermédia.....	116
Anexo J	– Estudo da robustez.....	118
Anexo K	– Cartas de controlo .....	119

## Lista de abreviaturas e símbolos

a – Ordenada na origem

ANOVA - Análise de variâncias

b - *Bias*

b - Declive da reta de calibração

b - Desvio relativamente à recuperação completa ou à média

$b_{rms}$  - Valor quadrático médio (ou raiz quadrada média) dos desvios dos ensaios de recuperação

$C_a$  - Concentração do analito na amostra não fortificada

$C_{af}$  - Concentração amostra fortificada

CC - Cartas de Controlo

CEE – Comunidade Económica Europeia

$C_f$  - Concentração do analito adicionado à amostra fortificada

CQ - Controlo de Qualidade

CQE - Controlo de qualidade externo

CQI - Controlo de qualidade interno

CQO - Carência química de oxigénio

CV - Coeficiente de variação

$CV_i$  - Coeficiente de variação de precisão intermédia

$CV_m$  - Coeficiente de variação do método

$CV_r$  – Coeficiente de variação de repetibilidade

$d_2$  - Fator para o cálculo do desvio padrão do intervalo médio de amplitudes

DQA - Diretiva Quadro da Água

$DS^2$  - Diferença entre variâncias

DST – Tecnologia do substrato definido (do inglês *Defined Substrate Technology*)

EAA – Espectroscopia de Absorção Atómica

EIL - Ensaio Interlaboratoriais

$E_n$  - Erro normalizado

ER - Ensaio de recuperação

Er - Erro relativo

ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos

ETA – Estação de tratamento de águas

ETAR – Estação de tratamento de águas residuais

F - Valor tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor*

GL - Graus de liberdade

GQ - Garantia de Qualidade

H - Frases de perigo

IC - Cromatografia Iónica (do inglês *Ion Chromatography*)

ICP-AES – Espetrometria de Emissão com Plasma de Acoplamento Indutivo

ICP-MS - Espetrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo

IPAC - Instituto Português de Acreditação

IPE – Investimentos e Participações do Estado

IRMM - Instituto de Materiais de Referência e Medidas (do inglês *Institute for Reference Materials and Measurements*)

ISE – Eléctrodo seletivo de iões (do inglês *Ion Selective Electrode*)

ISO - Organização Internacional de Padronização (do inglês *International Organization for Standardization*)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

k - Fator de expansão

LA - Limite de aceitação

LA - Limite de aviso

LIA - Limite inferior de aviso

LSA - Limite superior de aviso

LC - Limite de controlo

LC - Linha central

LIC - Limite inferior de controlo

LSC - Limite superior de controlo

LD - Limite de deteção

LQ - Limite de quantificação

MRC - Material de Referência Certificado

MRI – Material de Referência Interno

$MQ_b$  - Quadrado das médias “entre os grupos”

$MQ_w$  - Quadrado das médias “dentro do grupo”

MSA – Ácido metanossulfônico

MUG - 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glicuronídeo

n - Número de determinações em replicado

n - Número de padrões

NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês *National Institute of Standards and Technology*)

$n_m$  - Número de ensaios do *bias* realizados com o material de referência

$n_r$  – Número de ensaios de recuperação efetuados

OMS - Organização Mundial da Saúde

ONPG - *ortho*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

P - Frases de prudência

p - Número de grupos

PCQA - Programa de Controlo da Qualidade da Água

PG - Razão entre variâncias

PNA - Plano Nacional da Água

$\bar{R}$  - Diferença entre dois valores num duplicado de amostras

R - Taxa de recuperação

r - Coeficiente de correlação

r - Limite de repetibilidade

R - Limite de reprodutibilidade

RE - Resultado experimental obtido no ensaio

R – Efeito de cada fator

s - Desvio padrão

$s'_0$  - Desvio padrão corrigido

$s_{10}$  - Variância da resposta da solução padrão de maior concentração  
 $s_1$  - Variância da resposta da solução padrão de menor concentração  
 $S_a$  - Desvio padrão da ordenada na origem  
 $S_b$  - Desvio padrão do declive  
 $s_b$  - Desvio padrão dos valores medidos do material de referência  
 $S_{between}$  - Desvio padrão “entre grupos”  
SGQ - Sistema de Gestão da Qualidade  
 $s_i$  - Desvio padrão de precisão intermédia  
 $S_m$  - Desvio padrão do método  
 $SQ_b$  - Quadrado da soma “entre grupos”  
 $SQ_{tot}$  - Quadrado da soma total  
 $SQ_w$  - Quadrado da soma “dentro do grupo”  
 $s_r$  - Desvio padrão de repetibilidade  
 $S_R$  - Desvio padrão de reprodutibilidade  
 $s_{RW}$  - Desvio padrão de amostras de controlo  
 $s_{y/x}$  - Desvio padrão residual  
 $s_{y,2}$  - Desvio padrão residual da função quadrática  
 $t$  - Parâmetro  $t$  de student  
 $t$  - Teste de hipóteses  
 $t_R$  - Tempo de retenção  
 $U$  - Incerteza expandida  
 $u_{add}$  - Incerteza da concentração de analito adicionada  
 $u_b$  - Incerteza padrão do *bias*  
 $u_{b,rel}$  - Incerteza padrão do *bias* relativo  
 $u_c$  - Incerteza padrão combinada  
 $u_{conc}$  - Incerteza da concentração da solução utilizada para a fortificação  
 $u_{Cref}$  - Incerteza padrão do material de referência  
 $U_{lab}$  - Incerteza obtida pelo laboratório

$U_{MRC}$  - Incerteza expandida do material de referência certificado

$u_{ref}$  - Incerteza do material de referência certificado

$u_{RW}$  - Incerteza padrão de precisão intermédia

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês *United States Environmental Protection Agency*)

$u_v$  - Incerteza associada ao volume adicionado

$\bar{X}$  - Média

$\hat{X}$  - Concentração das amostras

$x_i$  - Valor usado experimentalmente

$X_{lab}$  - Valor obtido experimentalmente ou a média aritmética dos valores obtidos

$X_{ref}$  - Valor aceite como verdadeiro

$y$  - Resultado instrumental obtido

$\hat{y}_i$  - Sinal interpolado na reta de calibração para uma concentração  $C_i$

$y_i$  - Resultado obtido experimentalmente

$Z$  - Fator de desempenho *Z-score*

$Z$  - Metade do número de ensaios efetuados

$\Delta_{crit}$  - Amplitude admissível

$\Delta x$  - Variação da concentração

$\Delta y$  - Variação da resposta



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de operações do Grupo Águas de Portugal. <sup>2</sup> .....	2
<b>Figura 2.</b> Mapa do sistema multimunicipal de abastecimento de água e saneamento do norte de Portugal, efetuado pela Águas do Norte, S.A. ....	3
<b>Figura 3.</b> Percurso urbano da água. <sup>9</sup> .....	4
<b>Figura 4.</b> Distribuição global da água no planeta Terra. <sup>22</sup> .....	6
<b>Figura 5.</b> Consumo de água em Portugal nos diferentes setores. Adaptado de Relatório do Estado do Ambiente 2019. <sup>33</sup> .....	7
<b>Figura 6.</b> Tipo de origens de água utilizadas em 2017 por concelho. <sup>33</sup> .....	8
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do sistema de cromatografia iónica. ....	17
<b>Figura 8.</b> Esquema ilustrativo da cromatografia iónica de catiões com coluna de supressão. <sup>63</sup> .....	19
<b>Figura 9.</b> Implementação e processo de validação de um método analítico. <sup>99,102</sup> .....	23
<b>Figura 10.</b> Parâmetros de desempenho típicos de um estudo de validação de métodos analíticos. ....	23
<b>Figura 11.</b> Diagrama “espinha de peixe” para identificação das fontes de incerteza na preparação de uma solução por diluição de uma solução stock. <sup>120</sup> .....	41
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo do procedimento para a estimativa da incerteza do método baseada em dados de validação e/ou controlo de qualidade. <sup>104</sup> .....	42
<b>Figura 13. a) –</b> Exemplo de carta de indivíduos. <b>b) –</b> Exemplo de carta de amplitudes. ....	47
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de uma solução padrão mista de Na <sup>+</sup> – 20,000 mg/L; NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> – 0,4995 mg/L; Mg <sup>2+</sup> – 1,968 mg/L; Ca <sup>2+</sup> – 10,000 mg/L nas condições experimentais indicadas na secção Material e métodos. ....	59
<b>Figura 15.</b> Representação gráfica da reta de calibração das áreas dos picos em função da concentração das soluções padrão de: A) Na <sup>+</sup> ; B) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; C) Mg <sup>2+</sup> e D) Ca <sup>2+</sup> . ....	61
<b>Figura 16.</b> Cartas de aceitação de duplicados (LA – 10%), tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método para cada catião: A) Na <sup>+</sup> ; B) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; C) Mg <sup>2+</sup> e D) Ca <sup>2+</sup> . ....	85
<b>Figura 17.</b> Cartas de controlo de médias para o padrão de menor concentração, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para cada catião: A) Na <sup>+</sup> ; B) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; C) Mg <sup>2+</sup> e D) Ca <sup>2+</sup> . ....	87
<b>Figura 18.</b> Cartas de controlo de médias para o padrão de maior concentração da curva de calibração, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para cada catião: A) Na <sup>+</sup> ; B) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; C) Mg <sup>2+</sup> e D) Ca <sup>2+</sup> . ....	89
<b>Figura 19.</b> Cartas de controlo de indivíduos para o acompanhamento da curva de calibração, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para cada catião: A) Na <sup>+</sup> ; B) NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ; C) Mg <sup>2+</sup> e D) Ca <sup>2+</sup> . ....	90
<b>Figura 20.</b> Kit Quanti-Tray/2000 do teste Colilert (97 poços). As cavidades a amarelo identificam as bactérias coliformes totais, ao passo que as cavidades fluorescentes demonstram a presença de E.coli. <sup>147,148</sup> .....	92
<b>Figura B1.</b> Diagrama espinha de peixe para a identificação das fontes de incerteza da concentração da solução padrão de amónio de 0,50 mg/L. ....	109

**Figura B2.** Cálculos auxiliares para a determinação das incertezas associadas ao volume da micropipeta, do balão volumétrico e da incerteza combinada e expandida da concentração de uma solução padrão de amónio de 0,50 mg/L.....109

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Métodos analíticos geralmente utilizados para a determinação dos cátions sódio, amónio, magnésio e cálcio, assim como os limites de deteção e as gamas de concentração típicos de cada metodologia analítica. ...	21
<b>Tabela 2.</b> Dados obtidos num ensaio através da ANOVA unifatorial.....	33
<b>Tabela 3.</b> Características do sistema de purificação Milli-Q® IQ 7000.....	50
<b>Tabela 4.</b> Material utilizado na realização do procedimento experimental e respetivas incertezas. ....	50
<b>Tabela 5.</b> Reagentes utilizados para a preparação do eluente tendo em vista a realização do procedimento experimental. ....	51
<b>Tabela 6.</b> Soluções padrão comerciais da marca Merck® utilizadas durante a realização do procedimento experimental. ....	51
<b>Tabela 7.</b> Volumes da solução padrão mãe ( $V_{\text{spm}}$ ) para a preparação dos padrões da curva de calibração no volume de 100 mL, para cada catião.....	53
<b>Tabela 8.</b> Concentrações das soluções padrão utilizadas na preparação das soluções padrão da curva de calibração, para cada catião. ....	53
<b>Tabela 9.</b> Volumes da solução padrão mãe ( $V_{\text{spm}}$ ) para a preparação dos padrões independentes de controlo da curva de calibração em volume de 50 mL, para cada catião. ....	54
<b>Tabela 10.</b> Concentrações das soluções padrão independentes, para cada catião. ....	54
<b>Tabela 11.</b> Especificações das condições definidas e do material do cromatógrafo iónico ICS1000.....	55
<b>Tabela 12.</b> Dados obtidos a partir do cromatograma de uma solução padrão mista.....	60
<b>Tabela 13.</b> Valores de concentração e área de pico utilizados para a construção da curva de calibração, para cada catião.....	60
<b>Tabela 14.</b> Dados obtidos a partir dos cromatogramas de solução padrão mistas que originaram as representações gráficas da <b>Figura 11</b> . ....	62
<b>Tabela 15.</b> Intervalos de confiança da ordenada na origem ( $tS_0$ ) e do declive ( $tS_1$ ) da curva de calibração, para 95 % de probabilidade, assim como os valores obtidos do desvio padrão do método ( $S_m$ ) e coeficiente de variação do método ( $CV_m$ ), para cada catião. ....	62
<b>Tabela 16.</b> Valores obtidos das variâncias das áreas dos picos para cada solução padrão dos cátions analisados, para o estudo do ajuste da gama de trabalho, através da aplicação do teste de homogeneidade de variâncias..	63
<b>Tabela 17.</b> Valores obtidos e utilizados na aplicação do Teste de Mandel, para cada catião, com o intuito de confirmar a linearidade.....	64
<b>Tabela 18.</b> Valores obtidos da média, desvio padrão e coeficiente de variação, tendo em vista a avaliação da sensibilidade do método.....	65
<b>Tabela 19.</b> Taxa de recuperação média obtida em dez ensaios de recuperação, em duas matrizes diferentes, assim como o desvio padrão obtido para os ensaios de recuperação, pelo laboratório. ....	66

<b>Tabela 20.</b> Parâmetros determinados através da análise de dez réplicas de brancos fortificados, nomeadamente, a média, o desvio padrão e o desvio padrão corrigido obtidos. ....	67
<b>Tabela 21.</b> Limiares analíticos do método de determinação dos catiões em estudo. ....	67
<b>Tabela 22.</b> Parâmetros determinados através da análise de vinte réplicas independentes do padrão de menor concentração da curva de calibração, nomeadamente, a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o erro relativo. ....	68
<b>Tabela 23.</b> Resultados obtidos dos parâmetros de avaliação da precisão, em condições de repetibilidade.....	69
<b>Tabela 24.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para três níveis de concentração, ao longo do tempo, tendo em vista a determinação da precisão intermédia do método para o catião sódio.....	70
<b>Tabela 25.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para cada nível de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o catião amónio. ....	71
<b>Tabela 26.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para três níveis de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o catião magnésio. ....	72
<b>Tabela 27.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para cada nível de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o catião cálcio. ....	72
<b>Tabela 28.</b> Resultados obtidos da precisão em condições de repetibilidade (CV) e de precisão intermédia (CV) do padrão referente ao limite de quantificação, para cada catião recorrendo à ANOVA. ....	73
<b>Tabela 29.</b> Resultados dos parâmetros obtidos na ANOVA univariada efetuada para a determinação da precisão intermédia do padrão de concentração intermédia da curva de calibração, para cada catião. ....	74
<b>Tabela 30.</b> Resultados dos parâmetros obtidos na ANOVA univariada efetuada para a determinação da precisão intermédia do padrão de maior concentração da curva de calibração, para cada catião. ....	75
<b>Tabela 31.</b> Resultados obtidos através da análise de um MRC, com o intuito de avaliar a exatidão do método de determinação dos catiões. ....	77
<b>Tabela 32.</b> Resultados obtidos no ensaio Interlaboratorial da AQUACHECK efetuado, para os iões sódio, magnésio e cálcio. ....	78
<b>Tabela 33.</b> Resultados obtidos nos ensaios de recuperação efetuados de amostras reais fortificadas, para a avaliação da exatidão do método para a determinação do ião amónio. ....	79
<b>Tabela 34.</b> Fatores experimentais testados no teste de Youden. ....	80
<b>Tabela 35.</b> Matriz de teste de Youden aplicada, para 3 fatores, e respetivos resultados de $RE_i$ e $R_i$ para cada catião. ....	80

<b>Tabela 36.</b> Valores obtidos do teste de t tendo em vista avaliação da significância estatística dos resultados obtidos nas condições. ....	81
<b>Tabela 37.</b> Resultados obtidos experimentalmente referentes a oito ensaios independentes do MRC para a determinação da componente associada à reprodutibilidade intralaboratorial, para cada catião. ....	82
<b>Tabela 38.</b> Resultados obtidos experimentalmente referentes a oito ensaios independentes do padrão de concentração intermédia da curva de calibração, tendo em vista a determinação da componente associada à reprodutibilidade intralaboratorial, para o ião amónio. ....	82
<b>Tabela 39.</b> Resultados obtidos através do MRC da SCP Science utilizados de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método, para os catiões designados. ....	83
<b>Tabela 40.</b> Resultados obtidos através dos seis ensaios de recuperação efetuados de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método, para o ião amónio. ....	83
<b>Tabela 41.</b> Valores obtidos da incerteza combinada e expandida do método, para cada catião. ....	84
<b>Tabela 42.</b> Metodologia estabelecida pelo laboratório para o controlo de qualidade. ....	84
<b>Tabela 43.</b> Resultados dos parâmetros obtidos através da análise do padrão de menor concentração da curva de calibração, utilizado para a construção da carta de controlo. ....	86
<b>Tabela 44.</b> Valores definidos em termos de concentração (mg/L) para os limites de controlo e de aviso tendo em vista a construção da carta de controlo de médias do padrão de menor concentração da curva de calibração, para cada catião. ....	86
<b>Tabela 45.</b> Resultados dos parâmetros obtidos através da análise do padrão de maior concentração da curva de calibração, utilizado para a construção da carta de controlo. ....	88
<b>Tabela 46.</b> Valores definidos em termos de concentração (mg/L) para os limites de controlo e de aviso tendo em vista a construção da carta de controlo de médias do padrão de maior concentração da curva de calibração, para cada catião. ....	89
<b>Tabela A1.</b> Frases de advertência de perigo e recomendações de prudência para o eluente e para as soluções padrão utilizado na realização da parte experimental. ....	108
<b>Tabela D1.</b> Valores obtidos das áreas dos picos para o estudo da gama de trabalho de dez soluções independentes do padrão mais baixo e mais alto para cada catião. ....	111
<b>Tabela E1.</b> Valores obtidos da sensibilidade do método para a determinação dos catiões. ....	112
<b>Tabela F1.</b> Valores de concentração obtidos em amostras reais, através de ensaios de recuperação para o estudo da seletividade. $[X^o]$ e $[X^o + f.]$ representa a concentração do catião X na amostra original e a concentração do catião X na solução fortificada respetivamente. ....	113
<b>Tabela G1.</b> Concentração resultante da análise de dez réplicas de brancos fortificados, em condições de repetibilidade, para cada catião. ....	114

<b>Tabela G2.</b> Avaliação do padrão de menor concentração da curva de calibração, em condições de precisão intermédia, para cada catião, de forma a confirmar o LQ do método de determinação dos catiões em estudo...	114
<b>Tabela H1.</b> Dados obtidos da avaliação da precisão do método, em condições de repetibilidade, para cada catião.....	115
<b>Tabela I1.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do padrão mais diluído, para cada catião.....	116
<b>Tabela I2.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do padrão de concentração intermédia da curva de calibração, para cada catião.....	116
<b>Tabela I3.</b> Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do padrão de maior concentração da curva de calibração, para cada catião.....	117
<b>Tabela J1.</b> Matriz de teste de Youden aplicada considerando três fatores.....	118
<b>Tabela J2.</b> Dados obtidos dos ensaios efetuados em triplicado para o estudo da robustez do método.....	118
<b>Tabela J3.</b> Média dos resultados obtidos para cada ensaio tendo em vista a avaliação da robustez do método.....	118
<b>Tabela K1.</b> Concentração determinada do padrão de menor concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a construção da carta de controlo, para cada catião.....	119
<b>Tabela K2.</b> Réplicas obtidas do padrão de menor concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a monitorização do controlo de qualidade, para cada catião.....	119
<b>Tabela K3.</b> Concentração determinada do padrão de maior concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a construção da carta de controlo, para cada catião.....	120
<b>Tabela K4.</b> Réplicas obtidas do padrão de maior concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a monitorização do controlo de qualidade, para cada catião.....	120

## I - Introdução

# 1 Enquadramento do Tema

## 1.1 Apresentação da Empresa

O ano de 1993 marcou o arranque de uma verdadeira revolução no abastecimento de água e no saneamento de águas residuais em Portugal. Em resultado da integração na Comunidade Económica Europeia (CEE), foi possível implementar uma gestão empresarial, liderada pela Águas de Portugal em parceria com os municípios. É constituída a Águas de Portugal, integrada no IPE – Investimentos e Participações do Estado, com a responsabilidade pelo desenvolvimento dos Sistemas Multimunicipais de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais.<sup>1</sup>

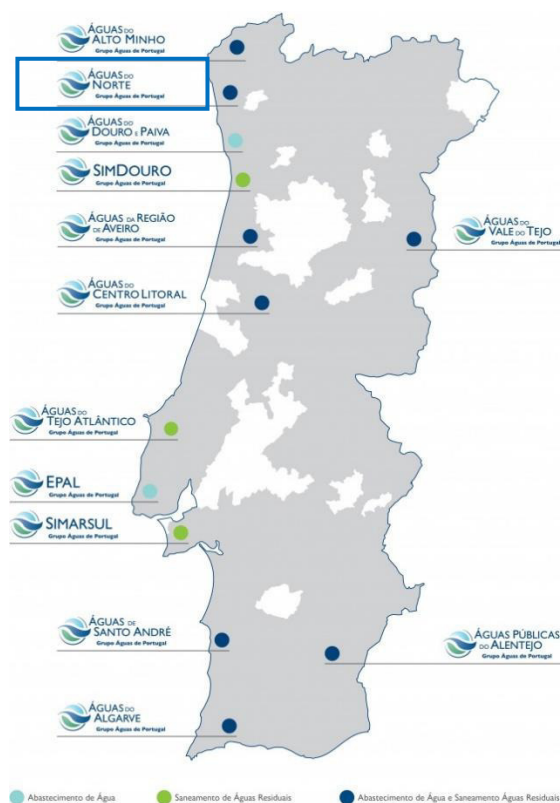


Figura 1. Mapa de operações do Grupo Águas de Portugal.<sup>2</sup>

Hoje, as empresas do Grupo Águas de Portugal (Figura 1) prestam serviços, direta ou indiretamente, em todo o território continental nos domínios do abastecimento de água e do saneamento de águas residuais. Além disso, operam na área das energias renováveis, em serviços partilhados e em mercados internacionais.<sup>1,2</sup>

A 5 de Novembro de 1993, por Decreto-Lei n.º 379/93, Capítulo 2, Artigo 3º, Ponto 3, alínea d), ocorreu a criação do sistema multimunicipal de captação, tratamento e abastecimento de água do norte da área do Grande Porto e do sistema multimunicipal de captação, tratamento e abastecimento de água do sul da área do Grande Porto. Os sistemas multimunicipais são aqueles que servem pelo menos dois



municípios, e exijam a intervenção do Estado em função de razões de interesse nacional. A exploração e a gestão dos sistemas multimunicipais podem ser concessionadas a entidade pública de natureza empresarial ou a empresa que resulte da associação de entidades públicas, ou diretamente efetuadas pelo Estado.<sup>3-5</sup>

A partir do Decreto-Lei n.º 41/2010, de 29 de abril, ocorreu a criação do sistema multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento do Noroeste e a constituição da respetiva concessionária, a sociedade Águas do Noroeste, S.A., mediante a fusão das sociedades Águas do Cávado, S.A., Águas do Minho e Lima, S.A. e Águas do Ave, S.A.<sup>3,6</sup>

A Águas do Norte, S.A. foi constituída pelo Decreto-Lei n.º 93/2015, de 29 de maio, mediante a fusão das empresas Águas do Douro e Paiva, S.A., Águas do Noroeste, S.A., Águas de Trás-os-Montes e Alto Douro, S.A. e SIMDOURO – Saneamento do Grande Porto, S.A., integradas no Grupo Águas de Portugal (Figura 2).



**Figura 2.** Mapa do sistema multimunicipal de abastecimento de água e saneamento do norte de Portugal, efetuado pela Águas do Norte, S.A.

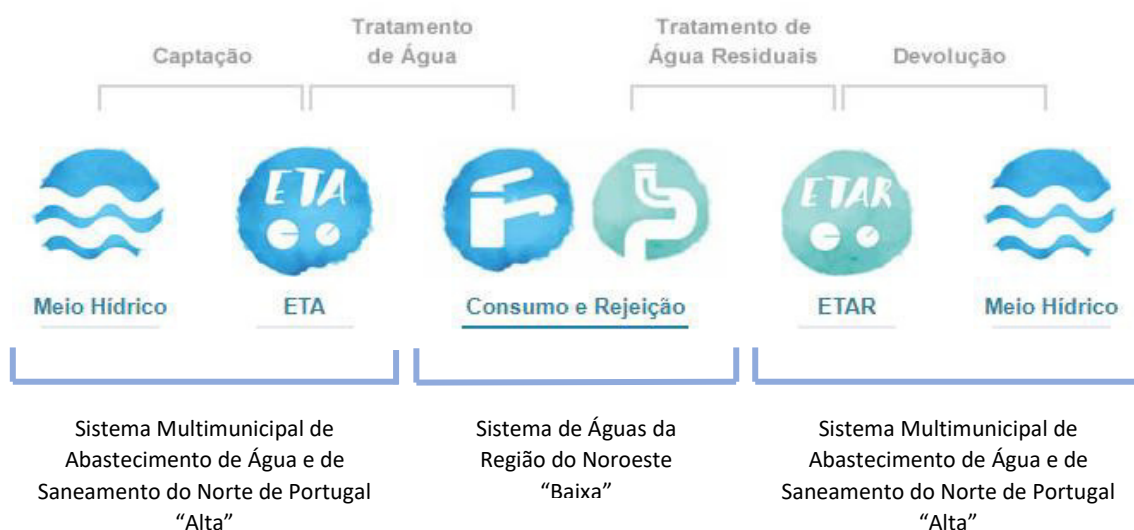
Em sequência, foi atribuída à empresa Águas do Norte, S.A, pelo Estado Português, em regime de exclusividade, a concessão da exploração e da gestão do sistema multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento do Norte de Portugal, pelo prazo de trinta anos.<sup>3,7</sup>

De acordo com o Decreto-Lei n.º 16/2017, de 1 de fevereiro de 2017, ocorre a criação do sistema multimunicipal de abastecimento de água do sul do Grande Porto e o sistema multimunicipal de saneamento do Grande Porto, ambos por cisão do sistema multimunicipal de abastecimento de água e

de saneamento do Norte de Portugal, e as respetivas entidades gestoras, respetivamente, Águas do Douro e Paiva, S.A. e SIMDOURO - Saneamento do Grande Porto, S.A.<sup>3,8</sup>

Atualmente, a sede da Águas do Norte, S.A. localiza-se em Vila Real e os Polos situam-se em Barcelos e Guimarães. A Águas do Norte é a entidade gestora do sistema multimunicipal em “alta” responsável pela captação, tratamento e abastecimento de água para consumo público, pela recolha, tratamento e rejeição de efluentes domésticos, urbanos e industriais e de efluentes provenientes de fossas sépticas.

A Águas do Norte assume também a exploração e gestão do sistema de águas da região do Noroeste, em resultado da celebração de uma Parceria entre o Estado (Administração Central) e 8 Municípios (Administração Local), que concretiza um processo de verticalização que reuniu, numa única entidade gestora, os serviços de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais em “alta” (prestados aos Municípios) e em “baixa” (prestados aos utilizadores finais, os munícipes), de forma regular, contínua e eficiente, como representado na **Figura 3**.<sup>3,9</sup>



**Figura 3.** Percurso urbano da água.<sup>9</sup>

O Laboratório Águas do Norte está acreditado segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2018 num total de 74 ensaios, dos quais 67 físico-químicos e 7 microbiológicos, cuja monitorização é necessária não só para o cumprimento da legislação que regula a qualidade da água para consumo humano, através do Decreto-Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, como também no âmbito do Plano de Segurança da Água da empresa Águas do Norte.

As competências são reconhecidas pelo IPAC - Instituto Português de Acreditação no Anexo Técnico de Acreditação n.º L0328 disponível no site [www.ipac.pt](http://www.ipac.pt). A acreditação do Laboratório Águas do Norte

abrange ainda a colheita, preservação e transporte de amostras de água para consumo humano e águas naturais destinadas à produção de águas para consumo humano.<sup>10-14</sup>

Para assegurar o controlo da qualidade da água abastecida, a Águas do Norte tem implementado, no início de cada ano civil, um Programa de Controlo de Qualidade da Água (PCQA), que cumpre integralmente os requisitos do Decreto-Lei nº 152/2017, de 7 de dezembro, que é o diploma legal que regula a qualidade da água para consumo humano.<sup>14</sup>

Este PCQA é aprovado anualmente pela entidade competente, ERSAR (Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos), e consiste na avaliação da conformidade dos requisitos de qualidade definidos na legislação, através de análises dos parâmetros efetuadas nas entregas a outras entidades gestoras e na torneira do consumidor, em pontos selecionados de modo a obter-se uma amostragem representativa da água abastecida.

As análises à qualidade da água são realizadas em laboratórios acreditados, tal como o Laboratório Águas do Norte, cuja seleção é também aprovada pela entidade reguladora, ERSAR. Esta procede anualmente à aprovação dos programas de controlo da qualidade da água que cada entidade gestora está obrigada a elaborar, controla a fiabilidade dos resultados laboratoriais em coordenação com o IPAC e fiscaliza as entidades gestoras dos sistemas públicos de abastecimento para verificar se todos os requisitos da legislação são cumpridos.<sup>15,16</sup>

## 1.2 Água

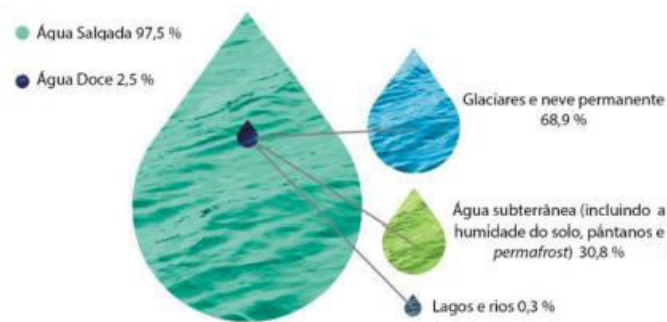
A água desempenha um papel imprescindível e insubstituível no equilíbrio ecológico, sendo o recurso natural mais importante à manutenção da vida na Terra, é o componente mais abundante nos sistemas vivos, constituindo mais de 70 % do peso da maioria dos organismos. Sem água, a vida humana não é sustentável por mais do que alguns dias, uma vez este recurso valioso funciona como solvente para reações metabólicas e transporte de nutrientes, hormonas e produtos residuais, uma hidratação adequada é vital para a maioria dos processos corporais, incluindo a regulação do ritmo cardíaco, pressão sanguínea, metabolismo e temperatura corporal, bem como para uma adequada função renal, gastrointestinal, e cognitiva.<sup>17,18</sup>

Tem propriedades que lhe são únicas, é incolor, inodora, pode ser encontrada na Natureza em três estados, sólido, líquido e gasoso, é um bom solvente, entre outras, que a diferenciam da maioria dos outros líquidos. A disponibilidade de água é fundamental para o bem-estar do Mundo, o ciclo da água é o motor de toda a vida na Terra.<sup>19-21</sup>

A Terra é o planeta azul, o que permite aferir a não existência de falta de água, aliás, existem 1,2 trilhões de metros cúbicos de água em todo o planeta (71% da Terra), e, como tal, nenhum outro recurso natural é mais ignorado pelos países desenvolvidos e contestado nos países subdesenvolvidos do que a água.<sup>22-</sup>

24

No entanto, cerca de 97,5 % da água presente no planeta é salgada e cerca de 2 % dos 2,5 % de água doce existentes, encontra-se congelada nos polos, o que indica que menos de 1 % da água efetivamente resta para a Humanidade em termos de consumo, sendo que a maioria se encontra no subsolo tornando-se difícil e dispendiosa a extração de água potável (**Figura 4**). Isto levou a espécie humana a instalar-se perto de águas superficiais, como rios e lagos, o que demonstra o facto de mais de 90 % da população mundial viver a menos de 10 Km de uma fonte de água doce.<sup>22-26</sup>



**Figura 4.** Distribuição global da água no planeta Terra.<sup>22</sup>

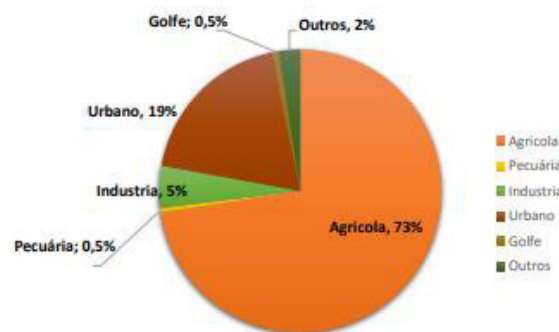
A busca por água potável foi uma das maiores lutas da História da Humanidade, as civilizações que “dominaram” a água prosperaram, ao passo que as que não o fizeram caíram. Atualmente, 7 em cada 10 pessoas na Terra têm água corrente em casa. Ainda assim, algumas cidades nos dias de hoje aproximam-se do dia zero (necessidade do fecho indefinido do abastecimento de água), e mais chegarão se não for controlado o consumo de água, isto porque o consumo de água aumentou sete vezes este século e as alterações climáticas tornam a água disponível cada vez mais irregular, uma vez existirem zonas no mundo que estão a passar por períodos de seca cada vez mais longos, tornando a disponibilidade de água cada vez mais desigual, quer do ponto de vista da quantidade, quer da qualidade, em todo o planeta e para todos os seus habitantes.<sup>27-31</sup>

A gestão cuidada e rigorosa da interferência humana no ciclo hidrológico é fulcral para assegurar o futuro da própria humanidade. A quantidade de água disponível, desde que bem monitorizada, é globalmente suficiente para qualquer cenário de crescimento demográfico, mas para que a água não seja um fator

limitante do desenvolvimento e, mesmo, de sobrevivência em vastas zonas do mundo, é essencial que seja muito bem gerida, certamente melhor que hoje, e num contexto adverso de alterações climáticas.<sup>23,31</sup>

A água destinada ao consumo humano encontra-se definida como: “Toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais; Toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinados ao consumo humano, assim como a utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada”.<sup>32</sup>

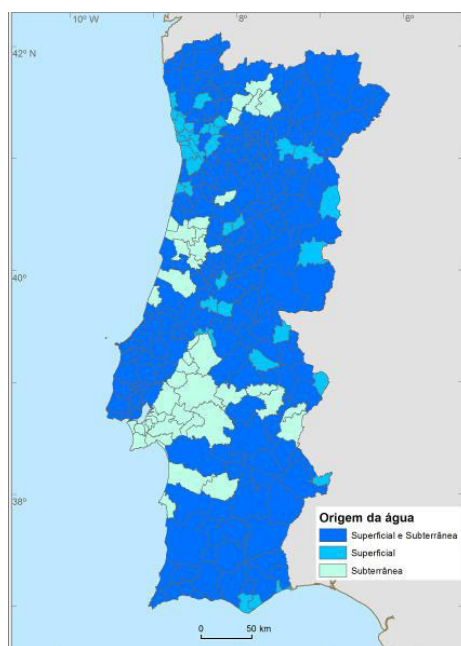
O ser humano necessita de consumir diariamente, cerca de 2 a 3 litros de água potável, somando as necessidades básicas de higiene são necessários perto de 50 litros por dia, ainda assim, o setor da agricultura continua a ser o grande responsável pelo consumo de água a nível nacional (**Figura 5**) e mundial.<sup>29,30,33</sup>



**Figura 5.** Consumo de água em Portugal nos diferentes setores. Adaptado de Relatório do Estado do Ambiente 2019.<sup>33</sup>

Desde 2004, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem desenvolvido uma abordagem relativa aos planos de segurança da água, com base na avaliação de risco e nos princípios de gestão de risco estabelecidos nas suas diretrizes para a qualidade da água potável. De tal forma, a água destinada ao consumo humano deve respeitar os valores paramétricos presentes no anexo I do Decreto-Lei n.º 152/2017 e a verificação de conformidade da qualidade da água realiza-se de acordo com o descrito no PCQA e no anexo II do mesmo.<sup>14,34</sup>

De acordo com o Relatório do Estado do Ambiente de 2019, água destinada ao consumo humano tem origem, essencialmente, em fontes de água superficial, tal como apresentado na **Figura 6**. Em 2017, a percentagem total de água subterrânea utilizada foi de 27,35% e a de água superficial de 72,65%.<sup>33</sup>



**Figura 6.** Tipo de origens de água utilizadas em 2017 por concelho.<sup>33</sup>

O controlo de qualidade da água é essencial tendo em vista dois objetivos principais, comprovar o nível de qualidade da água aliado ao cumprimento da legislação em vigor através da manutenção de um controlo operacional que permita detetar possíveis anomalias na qualidade da água, ocasionais ou de carácter sistemático, de modo a permitir que sejam postas em prática medidas preventivas/corretivas eficazes.

Tendo em vista um controlo de qualidade da água mais eficiente e rigoroso, é efetuada a avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, através de análises específicas e sucessiva avaliação dos respetivos valores paramétricos. A água para consumo humano exige uma contínua monitorização do controlo de qualidade, com base nas análises que garantam conformidade entre o tratamento/distribuição e os objetivos/regulamentos previstos, sendo que esta é caracterizada pelo conjunto de valores de parâmetros microbiológicos e físico-químicos fixados nas partes I, II e III do anexo I do Decreto-Lei n.º 152/2017. Estas análises devem ser realizadas periodicamente em laboratórios acreditados e especializados.<sup>14,32,35-37</sup>

## 1.3 Monitorização da Qualidade da água

### 1.3.1 Legislação aplicada à qualidade da água

A monitorização da água é uma medida do controlo do estado dos sistemas hídricos e da eficácia e eficiência das medidas implementadas. Decorrente deste processo, a União Europeia tem procurado adotar uma política global para garantir a qualidade das águas superficiais e subterrâneas por toda a Europa. Nesse sentido estabeleceu um quadro de ação comunitária relativa à água sendo o principal diploma legislativo da União Europeia, a Diretiva Quadro da Água (DQA) que veio introduzir uma abordagem universal para a gestão e a proteção das águas superficiais e subterrâneas com base na bacia hidrográfica. Foi transposta para o direito nacional através da Lei n.º 58/2005, de 29 de Dezembro.<sup>38-40</sup>

A DQA tem objetivos que se prendem com a qualidade ecológica, nomeadamente o objetivo de não deteriorar o “estado” das águas, através da conservação e melhoramento da qualidade do ambiente aquático com o intuito de atingir o “bom estado” que engloba o “bom estado químico” e o “bom estado ecológico”. Além disso, indica que se deve incluir uma estratégia que permita a operacionalização de programas de monitorização otimizados e coerentes, uma vez que a contínua monitorização é vital em vários aspetos, tais como avaliação do estado das massas de águas, sistemas de classificação das águas e implementação de programas de medidas efetivas.<sup>31,33,37,39</sup>

No Decreto-Lei n.º 58/2005, de 29 de dezembro, encontra-se descrito o Plano Nacional da Água (PNA) que, enquanto documento estratégico e prospetivo, é o instrumento de gestão das águas que estabelece as grandes opções da política nacional da água e os princípios e as regras de orientação dessa política, a aplicar pelos planos de gestão de bacias hidrográficas e por outros instrumentos de planeamento das águas.<sup>40</sup>

Atualmente, o regime da qualidade da água para consumo humano é legislado pelo Decreto-Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro. O presente Decreto-Lei tem como objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação da água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e equilibrada na sua composição. Os Estados-membros da União Europeia estabeleceram programas de controlo para verificar se a água destinada ao consumo humano respeita os requisitos da lei em vigor e esses programas de controlo encontram-se adequados às necessidades locais além de respeitarem os requisitos de controlo mínimos estabelecidos.<sup>14,31,37</sup>

### 1.3.2 Planeamento

A fase inicial de qualquer processo/procedimento é o planeamento, tendo como objetivo a definição das atividades de colheitas, preservação, manuseamento e transporte de amostras, de modo a garantir todas as informações necessárias de forma precisa, com o menor custo possível.<sup>37,41</sup>

Assim, a instituição de um plano de amostragem eficiente no contexto do processo analítico permite garantir que as etapas subsequentes, tais como, ensaios laboratoriais, interpretação de dados, elaboração de relatórios, e tomada de decisões pressupõe de credibilidade inequivocamente fundamentada.<sup>41-43</sup>

### 1.3.3 Amostragem

A amostragem define-se como um procedimento estabelecido, no qual ocorre a retirada de uma parte de um material ou produto de um todo, tendo em vista a colheita de uma parte suficientemente grande para os fins analíticos a que se propõe e que simultaneamente seja representativa do material/produto a ser amostrado.<sup>42,43</sup>

De acordo com a norma ISO 17025:2017<sup>10</sup> o laboratório deve possuir um plano de amostragem e procedimentos para a realização de amostragens de substâncias, materiais, produtos para ensaios ou calibrações subsequentes. O plano e o método de amostragem deve considerar os fatores a serem controlados de forma a garantir a validade dos resultados obtidos, baseando-se em métodos estatísticos apropriados e rigorosos.<sup>10,44</sup> A amostragem de água pode ter diferentes objetivos, tais como, a determinação da sua conformidade com a legislação em vigor, a caracterização ou a identificação de fontes de poluição.

Assim, a amostragem é um elemento fulcral e indispensável do programa de controlo da qualidade da água porque o resultado da análise posterior efetuada não corresponderá ao valor real, mesmo que utilizado um método analítico rigoroso, se a amostra não for representativa da água a controlar.<sup>43,44</sup>

### 1.3.4 Colheita de amostras

O controlo analítico da água inicia-se com a colheita da amostra, devendo esta ser efetuada de modo correto, ser recolhida no recipiente adequado e nas condições de conservação e transporte apropriadas até à análise no laboratório.<sup>43-45</sup>

O método de amostragem depende, não só do objetivo da amostragem e ensaio, mas também da natureza da amostra. No caso da caracterização microbiológica há a necessidade de considerar que as amostras apresentam um grau de variabilidade inerente pois os microrganismos vivos quando presentes



água, não formam uma solução perfeitamente homogênea. O mesmo não acontece quando é efetuada uma caracterização química pois as amostras são genericamente homogêneas na sua constituição.<sup>44,45</sup>

Existem alguns ensaios físico-químicos que devem preferencialmente ser realizados no local de colheita, para se obter resultados mais rigorosos. Noutros casos é conveniente recorrer a técnicas de conservação da amostra para que estas se mantenham no seu estado químico original.<sup>44,45</sup> A técnica a ser adotada para a colheita de amostras depende do tipo de amostragem (amostra simples, composta ou integrada) e da matriz a ser amostrada (água superficial, em profundidade, subterrânea, tratada, residuária, biota aquática, entre outras), aliados aos ensaios a serem solicitados (ensaios físico-químicos, microbiológicos, biológicos e toxicológicos).<sup>42,43</sup>

O Laboratório Águas do Norte é responsável pela análise de águas de diferentes procedências, nomeadamente águas naturais doces (superficiais e subterrâneas), água para consumo humano e águas residuais. Os protocolos de amostragem seguem as Normas ISO 5667-1, ISO 5667-3, ISO 5667-4 (águas de lagos, naturais e artificiais), ISO 5667-5 (água para consumo humano), ISO 5667-6, ISO 5667-10 (águas residuais) e ISO 5667-11 (águas subterrâneas).<sup>45-51</sup>

### 1.3.5 Preservação das amostras

A preservação é indispensável para a manutenção de todas as características das amostras, independentemente da sua natureza, sendo o tempo de preservação contabilizado imediatamente após a colheita. As águas, sobretudo as águas naturais, possuem propriedades suscetíveis de sofrerem alterações através de reações físicas, químicas e biológicas que podem ocorrer entre o momento da colheita e o início das análises. A extensão destas alterações depende de diversos fatores, entre os quais, a natureza química e biológica da amostra, a sua temperatura, exposição à luz, natureza do recipiente em que é colocada a amostra, tempo entre a colheita e a análise e condições a que é sujeita durante o transporte e armazenamento. O Laboratório Águas do Norte segue as Normas ISO 5667-1, ISO 5667-3 para os parâmetros analisados em rotina.<sup>43-46</sup>

Assim, a preservação adequada e rigorosa de amostras assume uma importância indispensável no combate aos processos naturais que podem levar a alterações nas características das amostras, tais como, a volatilização, adsorção, atividade microbiológica, precipitação, fotodecomposição, reatividade química e/ou absorção.<sup>45,46</sup>

### *1.3.5.1 Refrigeração ou Congelamento*

O processo de refrigeração ou congelamento permite uma redução eficaz da atividade microbiológica e enzimática além de retardar reações físico-químicas, desde que aplicado o mais brevemente possível. No entanto, os recipientes das amostras destinadas a serem congeladas, não devem ser colocados no congelador completamente cheios para não serem danificados.<sup>43-46</sup>

**Refrigeração** – Reduz a atividade biológica (as taxas de respiração são muito reduzidas a baixas temperaturas) e as reações químicas e processo físicos são retardados. É inadequada para amostras com atividade enzimática.

**Congelamento** – Reduz ao mínimo reações enzimáticas e oxidativas. Pode provocar rotura da estrutura celular. Amostras destinadas a análises microbiológicas não devem ser congeladas.<sup>43-46</sup>

### *1.3.5.2 Filtração ou Centrifugação*

A filtração e/ou centrifugação permitem a separação de formas insolúveis de analitos a determinar tais como, matéria em suspensão, sedimentos, algas e outros microrganismos que podem ser removidos. No entanto, existem precauções importantes a reter, sobretudo, a prevenção da contaminação por parte do equipamento de filtração, a presença de vários compostos metálicos e materiais orgânicos que podem ser adsorvidos pela superfície da membrana e a presença de compostos solúveis existentes na membrana podem ser lixiviados para a amostra.<sup>43-46</sup>

### *1.3.5.3 Adição de preservantes*

A adição de preservantes é amplamente utilizada tendo em vista a estabilização de constituintes de interesse através da adição seletiva de determinados compostos químicos: biocidas, ácidos ou bases (ajuste de pH), antioxidantes e anticoagulantes. O ajuste de pH é o mais utilizado em rotina.

**pH < 2** – Diminuição da atividade biológica e química, os iões metálicos mantêm-se no estado dissolvido, previne precipitação e floculação de compostos metálicos e adsorção à parede dos recipientes. O ácido deve ser escolhido de acordo com o parâmetro e método de ensaio.

**pH > 10** – Diminuição da atividade biológica, impede a volatilização de compostos voláteis, como por exemplo, ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S).

Ainda assim, são necessárias precauções de forma a manter a eficácia prolongada dos compostos a analisar, como por exemplo, preservar o mais brevemente possível, precaver a introdução de fatores de diluição dos analitos, verificar a ocorrência de solubilização dos constituintes coloidais ou sólidos, testar

a qualidade dos agentes preservantes e a possibilidade de existir interferência com outros parâmetros. Se necessário, colher amostras separadas, uma vez que o  $\text{HNO}_3$  pode interferir com carência química de oxigênio (CQO).<sup>43-46</sup>

#### *1.3.5.4 Proteção da Luz*

A degradação fotoquímica pode ser evitada armazenando as amostras no escuro ou em frascos de vidro escuro, cobertos por folha de alumínio.<sup>44-47</sup>

#### *1.3.5.5 Volatilização*

Utilização de recipientes de colheita que possam ser selados e armazenados no frio para reduzir a pressão de vapor.<sup>44-47</sup>

## 2 Determinação dos cátions sódio, amónio, magnésio e cálcio

De acordo com o Decreto-Lei n.º 152/2017, de 7 de dezembro, os valores paramétricos estipulados para os cátions sódio e amónio são 200 e 0,50 mg/L, respetivamente. No caso dos cátions magnésio e cálcio apenas se recomenda que a concentração não seja superior a 50 e 100 mg/L, respetivamente.<sup>14</sup>

O cátion sódio é omnipresente na água, devido a inúmeros fatores, tais como, intrusão salina, depósitos minerais, água do mar, efluentes de esgotos e sal utilizado no degelo das estradas que contribuem para as quantidades significativas observadas de sódio na água. Em geral os sais de sódio não são tóxicos para o ser humano, uma vez que são eficientemente excretados pelos rins.<sup>30</sup>

O cátion amónio encontra-se presente na água de diversas formas uma vez que é altamente solúvel em água. É biologicamente ativo encontrado na maioria das águas como um produto de degradação biológica de matéria orgânica azotada (proteínas), e encontra-se presente na água potável como resultado da desinfecção com cloraminas. Se a concentração de ião amónio for superior ao recomendado, o sabor e o odor da água tornam-se desagradáveis.<sup>30,52,53</sup>

O magnésio e outros metais alcalinos terrestres são responsáveis pela dureza da água, depois do sódio, é o cátion mais comumente encontrado nos oceanos, estando presente também em rios e águas pluviais, fazendo com que se dissemine naturalmente pelo ambiente. Como mencionado anteriormente, a introdução de limites legais para o magnésio na água potável é rara, pois não há provas científicas de toxicidade do mesmo.<sup>54</sup>

O cálcio está naturalmente presente na água. Uma das principais razões para a abundância de cálcio é a sua ocorrência natural na crosta terrestre. O cálcio é também um constituinte dos corais. À semelhança do magnésio é responsável pela dureza da água, no entanto, apresenta bastante toxicidade aquando do consumo de elevadas quantidades, influenciando negativamente a saúde humana de diversas formas.<sup>30,54</sup>

### 2.1 Cromatografia

As técnicas de separação são extremamente importantes em síntese, na química industrial, nas ciências biomédicas, e nas análises químicas. Os principais objetivos de uma técnica de separação analítica são geralmente eliminar ou reduzir os interferentes de modo a que a informação analítica quantitativa possa ser obtida a partir de misturas complexas.<sup>55-57</sup>

A cromatografia é uma das técnicas de separação analítica mais importantes, visto que pode ser aplicada para resolver uma grande variedade de problemas analíticos. Esta versatilidade é refletida no elevado

número de técnicas cromatográficas que são utilizadas com sucesso nos dias de hoje. Sendo assim, nenhum outro método de separação é tão poderoso e globalmente aplicável como a cromatografia.<sup>55,57-59</sup>

Os componentes de uma mistura são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel, e as separações são assim, baseadas nas diferenças existentes na mobilidade dos componentes de uma amostra.<sup>55,57,59-64</sup> Os componentes com uma maior afinidade para com a fase estacionária possuem uma menor mobilidade na fase móvel, devido à retenção na coluna e, portanto, vão eluir mais tarde que os compostos que apresentem pouca afinidade com a fase estacionária e uma maior mobilidade na fase móvel. Assim, à medida que os componentes da amostra vão sendo detetados, vão dando origem a picos cromatográficos, de acordo com os diferentes tempos que decorrem entre a injeção da mistura na coluna e a chegada do composto da amostra ao detetor, este parâmetro designa-se tempo de retenção ( $t_r$ ).<sup>57,63</sup>

Diversas variáveis físico-químicas, tais como o comprimento da coluna, o número de pratos teóricos, o fator de retenção, o tipo de fase estacionária utilizada, a temperatura ou o fluxo da fase móvel, influenciam as taxas de separação e a resolução dos picos obtidos e, portanto, as condições cromatográficas utilizadas devem ser constantes e bem definidas.<sup>57,65</sup>

Ainda assim, a cromatografia é a técnica de separação mais utilizada nos laboratórios químicos, onde é utilizada em análise, isolamento e purificação, isto porque possui excelentes características e resultados analíticos, tais como, a sua elevada sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, precisão e exatidão.<sup>59,64</sup>

### 2.1.1 Cromatografia Iónica

A cromatografia iónica (IC), também designada cromatografia de troca iónica, é uma subdivisão da cromatografia líquida. Em 1975, Hamish Small *et al*/descreveram um novo método cromatográfico de troca iónica para a separação e deteção condutimétrica de aniões e catiões, através da introdução da supressão de condutividade do eluente. Esta técnica analítica inovadora é eficaz em quase todos os tipos de moléculas carregadas, incluindo grandes proteínas, pequenos nucleótidos e aminoácidos. Assim graças à sua eficiência na separação e determinação de iões, permite que possa ser uma alternativa extremamente viável na purificação de proteínas, análise dos iões em água e águas residuais e em controlo de qualidade.<sup>37,57,74,66-73</sup>

Ainda que a troca iónica (utilizada no processo experimental deste trabalho), continue a ser o modo de separação predominante na cromatografia iónica, outros métodos relacionados, tais como a exclusão iónica, ou a cromatografia iónica de quelação, também podem ser utilizados com elevada eficácia.<sup>66,69-73</sup>

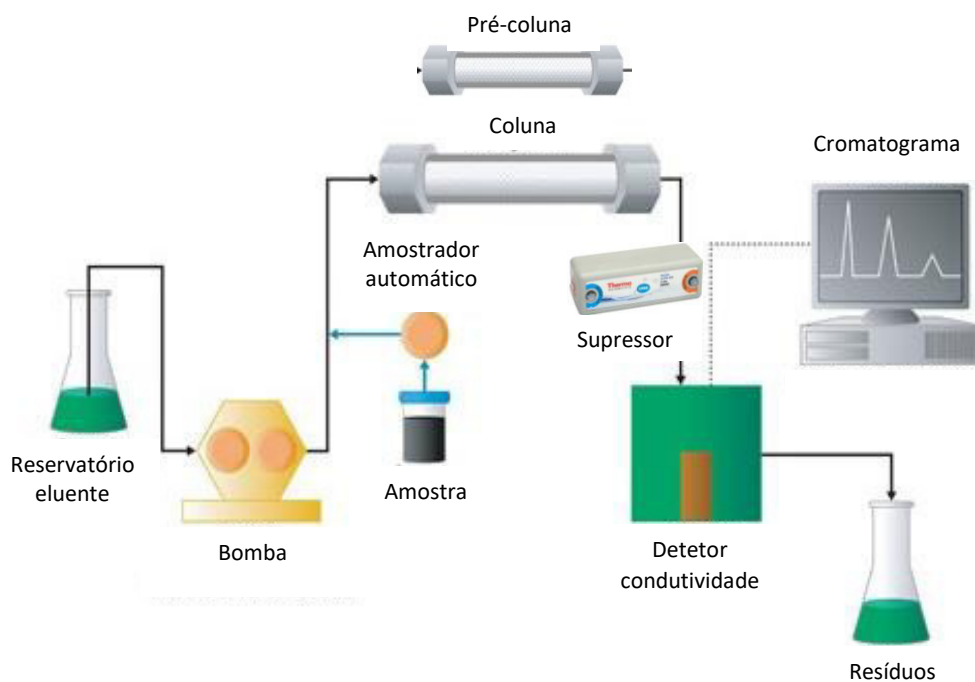
A cromatografia de troca iónica é uma técnica que se destina à análise de iões inorgânicos e orgânicos com pKa inferior a 7. Assim esta técnica pode ser aplicada para a determinação de solutos iónicos, tais como, aniões inorgânicos, catiões inorgânicos (incluindo metais alcalinos, metais alcalinoterrosos, metais pesados e de transição), ácidos e bases orgânicas de baixo peso molecular.<sup>37,62,66,67,71,73-75</sup>

Usualmente, a cromatografia de troca iónica, consiste na combinação de uma coluna de troca iónica com um supressor acoplado a um detetor de condutividade eléctrica. Na coluna de separação os analitos são separados, o supressor minimiza a condutividade do eluente e aumenta consideravelmente a proporção sinal/ruído obtida, o que permite uma maior sensibilidade e seletividade quando comparada com a deteção condutimétrica sem supressão, além da possibilidade da utilização de eluentes com elevada força iónica.<sup>37,62,67,73,74,76-78</sup>

Os trocadores catiónicos contém grupos carregados negativamente que atraem solutos catiónicos, e os trocadores aniónicos contém grupos carregados positivamente que atraem solutos aniónicos. A fase móvel é um tampão aquoso que deve ser rigorosamente controlado pois, mesmo pequenas alterações no pH e na força iónica do eluente, podem afetar drasticamente a retenção e a eficiência, afetando assim, a seletividade, a forma dos picos, a resolução e a reprodutibilidade.<sup>37,62,63,70,73,76,79,80</sup>

Assim, através da cromatografia iónica é possível determinar diversos iões com elevada seletividade, sensibilidade e rapidez. A utilização desta técnica permite a análise simultânea de diferentes componentes (iões) em águas, e a obtenção de resultados quantitativos numa fração do tempo anteriormente necessário para os métodos tradicionais. Por conseguinte, consoante a coluna e a fase móvel utilizada na separação, podem ser analisados uma extensa panóplia de iões, tais como, cálcio, sódio, potássio, magnésio, amónio, cloreto, sulfato, lítio, nitrato, nitrito, fosfato, fluoreto, brometo, entre outros.<sup>66,73,81-83</sup>

A **Figura 7** representa o esquema típico de um sistema de cromatografia iónica. Desde o seu início, o núcleo deste sistema não sofreu grandes alterações, com a exceção do supressor. O sistema de cromatografia iónica é então, formado por um eluente líquido, uma bomba de alta pressão, uma válvula de injeção de amostras, uma pré-coluna, uma coluna analítica, um detetor de condutividade com ou sem supressão química e um sistema de recolha de dados.<sup>62,80,82,83</sup>



**Figura 7.** Representação esquemática do sistema de cromatografia iônica.

O eluente, ou fase móvel, é responsável por arrastar/eluir os iões da amostra num curto espaço de tempo, em bandas bem definidas, além de competir com os iões da amostra pelos iões da fase estacionária, através do ião de competição presente na sua composição. Esta competição pode ser descrita de acordo com a **equação 1**:



Neste processo o catião  $\text{M}^+$  do eluente foi substituído pelo catião do analito  $\text{C}^+$  ligado ao anião  $\text{X}^-$  que se encontra fixo na superfície da fase estacionária (S). Assim, a escolha do eluente deve ser rigorosa, para não afetar a eluição dos componentes da amostra a analisar, no caso do estudo de catiões, a utilização do ácido metanossulfónico (MSA) permite uma eluição eficiente. Esta pode ser isocrática (efetuada na realização do processo experimental), em que a composição do eluente permanece constante ao longo da separação cromatográfica ou por gradiente, em que a composição da fase móvel é alterada continuamente numa série de passos durante a análise, sendo esta última, a forma de eluição mais utilizada.<sup>57,62,80,82,84</sup>

A bomba de cromatografia iônica é considerada um dos componentes mais importantes do sistema, pois tem de fornecer um fluxo constante e contínuo do eluente através do injetor, da coluna, e do detetor.<sup>62</sup>

A introdução da amostra pode ser realizada de várias formas. A metodologia mais simplificada e utilizada ao longo do procedimento experimental, consiste na utilização de um amostrador automático. A amostra

é colocada num vial próprio e injetada automaticamente para a coluna do cromatógrafo iónico, pelo amostrador automático.<sup>37,57,62</sup>

A pré-coluna é colocada antes da coluna e apresenta o mesmo revestimento da coluna analítica. Tem como função reter pequenas partículas e contaminantes, permitindo o aumento do tempo de vida da coluna analítica e a manutenção da eficiência da coluna ao nível da resolução e sensibilidade, daí também se chamar coluna de guarda.<sup>57,62,63,85</sup>

A coluna analítica utilizada, contém no seu interior a fase estacionária, carregada com os grupos ativos funcionais (ácido carboxílico) de carga contrária aos iões dos analitos. O empacotamento da coluna é constituído por uma resina polimérica com uma percentagem de 55% de reticulação com divinilbenzeno, que se encontra ligada covalentemente aos grupos funcionais carregados com uma carga fixa negativa ( $\text{CO}_2^-$ ). Os iões do eluente (MSA) com carga oposta, designados por contra iões, encontram-se ligados a estes grupos funcionais e durante a análise serão substituídos pelos iões dos analitos.<sup>63,80,82,86</sup>

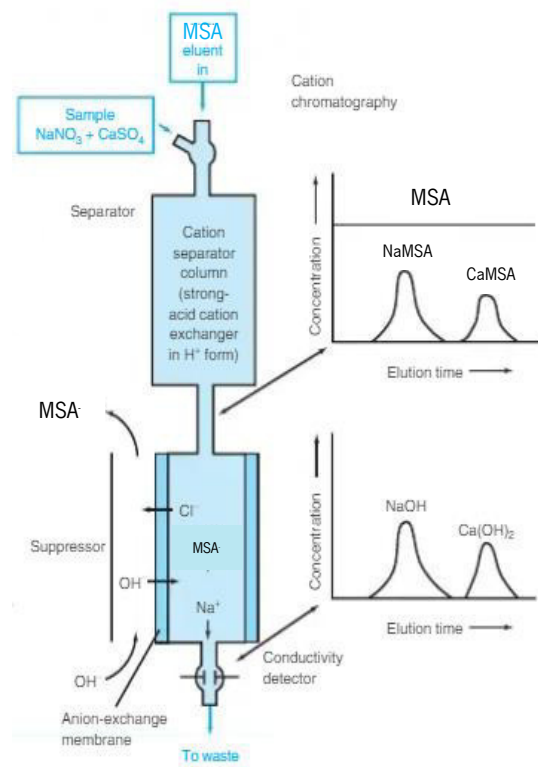
Quando a amostra percorre a coluna ocorrem sucessivos equilíbrios entre os iões da amostra e os contra iões fixos da fase estacionária. O processo de separação baseia-se na interação eletrostática entre os iões presentes na fase estacionária e os iões da amostra. Assim, durante a separação cromatográfica, os contra iões do eluente são substituídos pelos iões da amostra, ficando estes temporariamente retidos na fase estacionária, enquanto que os iões com a mesma carga dos grupos funcionais são eluídos. Os componentes da amostra ficam retidos durante um período de tempo característico na coluna, que difere de acordo com a afinidade à fase estacionária.<sup>37,80,82,87</sup>

Imediatamente após a coluna analítica e antes do detetor, é introduzida uma coluna supressora empacotada com uma segunda resina de troca iónica capaz de eficazmente promover a eliminação química dos iões do eluente. Os aniões do eluente são substituídos por hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), enquanto que os catiões do eluente trocam com iões hidrogénio ( $\text{H}^+$ ) o que permite a conversão dos iões contido no eluente em água e reduzir o efeito da elevada condutividade do eluente nos resultados, permitindo uma melhoria significativa dos mesmos.<sup>57,62,75,78,82,85,86</sup>

A partir da **Figura 8**, é possível compreender as reações que ocorrem durante a separação de catiões na coluna analítica e na coluna supressora. Simultaneamente à redução da condutividade do eluente para valores muito baixos, devido à conversão maioritária em água, o supressor aumenta a condutividade inerente ao analito de forma a aumentar a deteção, devido ao acréscimo do rácio sinal/ruído. Para isso,



ocorre a conversão dos aniões para a forma ácida e no caso dos catiões da amostra na forma de hidróxido.<sup>74,75,78,85,86</sup>



**Figura 8.** Esquema ilustrativo da cromatografia iônica de catiões com coluna de supressão.<sup>63</sup>

Sendo assim, e de acordo com a **equação 2**, ocorrem dois processos de troca iônica em simultâneo que visam diminuir acentuadamente a condutividade do eluente e ao mesmo tempo aumentar a condutividade da amostra em análise.



Os aniões (MSA) do eluente são trocados pelos íons hidróxido presentes na coluna supressora, isto permite a formação de água que possui uma baixa condutividade. A conversão dos catiões em hidróxidos permite não só um aumento da detecção, mas também da sensibilidade devido à elevada mobilidade iônica do anião OH.<sup>63,82</sup>

Isto permite aferir que a supressão química acoplada à detecção de condutividade em cromatografia iônica possui um bom desempenho, e assume-se como uma técnica rigorosa de separação e detecção de espécies iônicas.<sup>74,75,85,86</sup>

Atualmente, existem diversos métodos de detecção que podem ser utilizados em cromatografia iônica para a detecção de diferentes analitos. Dividem-se em duas grandes classes, os eletroquímicos, tais como,

os detetores amperométricos, potenciométricos e de condutividade, e os espectroscópicos, dos quais fazem parte os detetores UV/Visível, quimioluminescência, fluorescência, índice de refração, espectrometria de absorção atômica, espectrometria de emissão atômica, espectrometria de massa, entre outros.<sup>66,74,75,82,85,86</sup>

A detecção eletroquímica utilizando um detetor de condutividade é a mais comum e utilizada na indústria química, sendo aplicável em aniões e catiões com pKa ou pKb inferiores a 7, respetivamente. Apesar de ter sido pela primeira vez utilizado como método de detecção de iões em 1951 por James *et al*, ganhou maior preponderância após a introdução de uma coluna supressora capaz de eliminar quimicamente a condutividade do eluente e de aumentar a mesma inerente ao analito, permitindo uma melhoria da qualidade dos resultados obtidos.<sup>82,88-90</sup>

A condutividade elétrica de uma solução é a propriedade distintiva dos iões, de facto, esta é a propriedade que distingue eletrólitos (compostos iónicos) de não eletrólitos (compostos de moléculas não carregadas). Assim, a medição da condutividade elétrica pelo detetor baseia-se na capacidade das soluções eletrolíticas (colocadas num campo elétrico entre dois eléctrodos de platina) de conduzir a corrente elétrica. Os eléctrodos são feitos de metais nobres, o que evita reações químicas nas suas superfícies.<sup>69,85</sup>

No entanto devido à elevada capacidade de algumas colunas analíticas em eluir grande parte dos iões presentes numa solução, é necessária a utilização de grandes quantidades de eluente, mas graças à utilização de uma coluna supressora, a condutividade associada ao eluente é eliminada para valores próximos de zero, permitindo que não interfira com a condutividade real presente na amostra em análise, o que trará uma detecção mais eficiente e rigorosa.<sup>37,75,82</sup>

## 2.2 Métodos alternativos

Enquanto que os catiões alcalinos e alcalinoterrosos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) são normalmente determinados por técnicas espectroscópicas, como absorção atômica (EAA), Espectrometria de Emissão com Plasma de Acoplamento Indutivo (ICP-AES), ou Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS), o catião amónio não pode ser medido por técnicas de absorção atômica. Os métodos analíticos mais utilizados para águas de consumo e águas residuais encontram-se representados na **Tabela 1**, assim como os limites de detecção e a gama de trabalho de cada metodologia analítica.<sup>91,92</sup>

**Tabela 1.** Métodos analíticos geralmente utilizados para a determinação dos catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio, assim como os limites de deteção e as gamas de concentração típicos de cada metodologia analítica.

Catiões	Método analítico	LD (mg/L)	Gama de concentração (mg/L)	Referências
<b>Na<sup>+</sup></b>	ICP-MS	0,0001	0,0003 – 0,1	92
	EAA	0,002	0,03 - 1	91
	ICP-AES	0,03	0,1 - 100	93
	Cromatografia Iónica	0,11	2 - 20	-
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	Cromatografia Iónica	0,0063	0,025 – 0,5	-
	Voltametria	0,09	0,5 - 90	94
	Espectrofotometria UV-Vis	0,6	0,85 - 5	95
	ISE	1,6	5 - 100	95
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	ICP-MS	0,000001	0,000003 – 0,001	92
	EAA	0,0005	0,02 - 2	91
	Cromatografia Iónica	0,0083	0,2 - 2	-
	ICP-AES	0,02	0,06 - 100	93
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	ICP-MS	0,0001	0,0003 – 0,1	92
	EAA	0,003	0,2 - 20	91
	ICP-AES	0,01	0,03 - 100	91,93
	Cromatografia Iónica	0,099	1 - 10	-

Apesar de a cromatografia apresentar um limite de deteção superior para o catião sódio, magnésio e cálcio, comparativamente com outras metodologias analíticas, mantém-se como uma alternativa vantajosa, uma vez que, além de ser menos dispendiosa ao nível do equipamento e utilização de reagentes, que técnicas como ICP-MS/AES, não necessita da presença do operador aquando durante a leitura das amostras, como acontece com a técnica EAA. No caso do catião amónio, a cromatografia iónica mostra ser o método mais sensível permitindo a análise de amostras com concentrações de amónio bastante reduzidas. Assim, é possível aferir que a cromatografia iónica assume-se como uma técnica analítica robusta e fiável para a determinação dos catiões.<sup>91,92,96</sup>

### 3 Validação

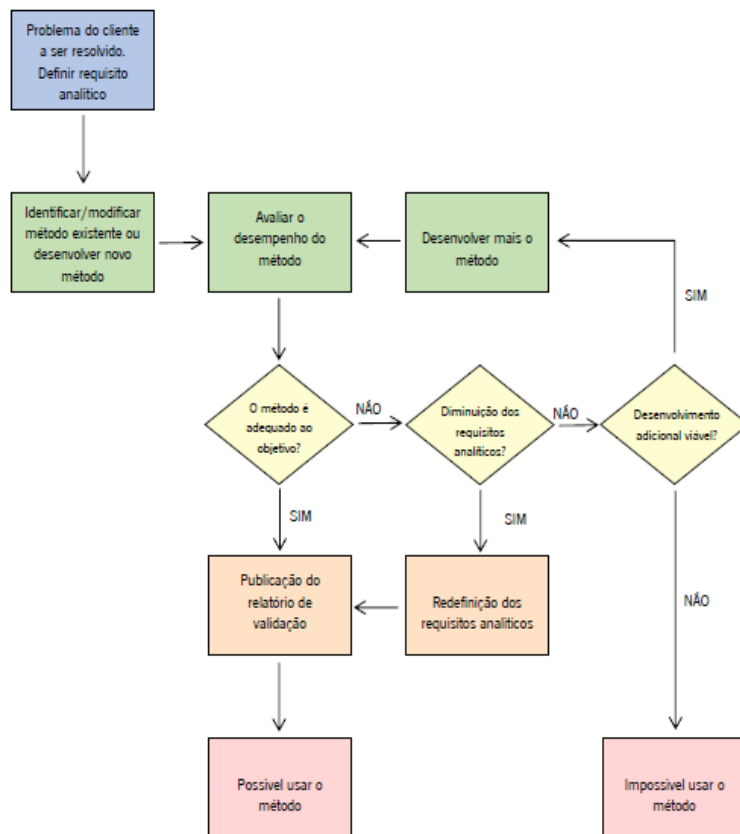
Atualmente, são efetuadas milhões de medições analíticas em diferentes laboratórios, nas mais diversas áreas, que envolvem elevados custos e que afetam praticamente todos os aspectos da sociedade, sendo, portanto, de relevante importância a obtenção de uma medição correta.<sup>97-99</sup>

A cromatografia iônica, como qualquer outro método analítico, é um processo que envolve a possibilidade da ocorrência de erros (sistemáticos e/ou aleatórios), que podem conduzir à alteração significativa do resultado final. Assim sendo, é fundamental que os Laboratórios, não obstante o âmbito de análise, demonstrem através da validação, que o método analítico que executam, leva a resultados adequados à qualidade pretendida.<sup>97,100</sup>

A validação de métodos analíticos é então definida como uma verificação na qual os requisitos especificados são adequados para o propósito. Deste modo, o fornecimento de evidência objetiva de que um dado item satisfaz os requisitos especificados, permite não só, a garantia do desempenho e cumprimento das funções pretendidas, mas também a satisfação e benefício para o cliente.<sup>10,97-99,101</sup>

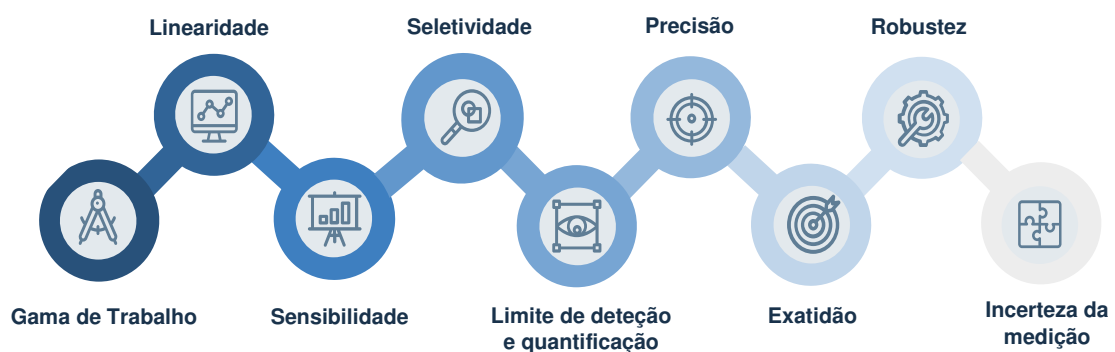
Os laboratórios procedem à validação de métodos sempre que utilizam métodos não normalizados (que não segue integralmente uma norma de ensaio), métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório e métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização previsto, ou de outra forma modificados. A validação não é exigida para métodos normalizados (que seguem um documento normativo ou norma equivalente), ainda assim o laboratório necessita de verificar o seu desempenho, de forma a aferir a sua capacidade de reproduzir o método no seu meio. A extensão da validação deverá ser a necessária de modo a cumprir com as necessidades de determinado campo de aplicação.<sup>10,11,97-99</sup>

O processo de validação consiste na determinação característica dos parâmetros de desempenho do método utilizando equipamentos que estejam de acordo com as especificações do fabricante, devidamente calibrados e a funcionar corretamente. Estes parâmetros são obtidos durante o desenvolvimento do método por analistas qualificados, para que possam tomar as decisões corretas, necessárias e competentes no âmbito do trabalho em desenvolvimento, e para que as entidades tenham a garantia da sua habilidade em satisfazer as necessidades dos clientes (**Figura 9**).<sup>97-99</sup>



**Figura 9.** Implementação e processo de validação de um método analítico.<sup>99,102</sup>

Assim, para um controlo de resultados que se deseja efetivo, que permita uma fácil interpretação e, por conseguinte, um grau de confiança elevado, o método analítico é sujeito a diversas etapas de avaliação, que permitem a sua validação. Os parâmetros requeridos para o estudo da validação de um método analítico, encontram-se abaixo representados, na **Figura 10**.



**Figura 10.** Parâmetros de desempenho típicos de um estudo de validação de métodos analíticos.

Assim, graças à avaliação das características de desempenho analítico, é possível o desenvolvimento de inúmeros métodos que irão permitir a progressão e a evolução de diversas áreas da sociedade, desde que estes sejam consistentes com os requisitos especificados e relevantes para a necessidade e

satisfação dos clientes. Além disto, permite a detecção e identificação das potenciais causas de erro, e a sua eliminação, permitindo o total controlo sobre o processo analítico em questão.<sup>10,101,103</sup>

A implementação de um método analítico ou a validação do mesmo, é um processo lento e que não deve ser de alguma forma apressado, pois as consequências de erros a longo prazo, traduzem-se na perda de recursos, tempo e dinheiro. Assim, para além dos parâmetros de desempenho avaliados de forma direta e indireta, é também, segundo a norma ISO 11352:2012, estimada a incerteza.<sup>37,98,104</sup>

### 3.1 Curva de Calibração

A curva de calibração permite estabelecer uma relação entre o sinal obtido pelo equipamento e a concentração, ou quantidade de uma substância conhecida, a partir da mesma, obtém-se dados estatísticos da intersecção, equação de regressão, coeficiente de correlação e de determinação e a concentração estimada a partir das soluções padrão.<sup>37,97,99,103</sup>

O traçado da curva de calibração deve ser efetuado a partir de padrões com concentrações equidistantes de acordo com a gama de trabalho determinada. A curva de calibração deve conter dez pontos, sendo que esse número pode ser reduzido até um mínimo de cinco. Numa curva de calibração, é relevante aferir de que forma ocorre a relação entre a resposta obtida e a concentração, podendo ser linear, quadrática, logarítmica, curvilínea, entre outros. A norma ISO 8466/1 refere-se aos modelos lineares, enquanto na perspetiva dos modelos quadráticos, recorre-se à norma ISO 8466/2.<sup>100,105,106</sup>

A partir do método dos mínimos quadrados, representa-se a resposta instrumental obtida no equipamento o eixo vertical (eixo y) e no eixo horizontal, (eixo x) representa-se as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados às concentrações dos padrões são ínfimos e portanto desprezáveis, tendo em conta a precisão associada à resposta instrumental. Além disto, pressupõe-se que o sinal obtido assume uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias desta mesma resposta, ao longo da reta.<sup>97-100</sup>

Assim, a correlação matemática entre o sinal obtido e a concentração do analito, é representada algebricamente pela curva de calibração indicada na **equação 3**:

$$y = bx + a \quad \text{Equação 3}$$

Em que, y representa o sinal obtido, b indica o declive da reta, x a concentração do analito e a a ordenada na origem. A partir desta equação é assim, possível determinar concentrações de amostras desconhecidas por interpolação na reta.<sup>100,107</sup>

O coeficiente de correlação é um dos parâmetros utilizados para a avaliação de uma calibração analítica, permitindo analisar a qualidade do ajuste dos pontos experimentais. Idealmente, as curvas de calibração devem ter valores de coeficiente de correlação superiores a 0,995, sendo que estes podem variar entre -1 e 1. A expressão que permite a determinação do coeficiente de correlação traduz-se na **equação 4**<sup>100</sup>:

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}} \quad \text{Equação 4}$$

Através da curva de calibração é possível calcular o desvio padrão residual,  $S_{y/x}$ , que exprime a dispersão dos resultados instrumentais obtidos em função da reta de calibração, representado pela **equação 5**:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Equação 5}$$

Em que,  $n$  designa o número de padrões utilizados para o traçado da reta de calibração, e  $(\hat{y}_i)$  representa o sinal obtido ( $y$ ) quando se interpola o valor de uma determinada concentração ( $x_i$ ).<sup>100,105</sup>

Os desvios padrão da ordenada na origem ( $a$ ) e do declive ( $b$ ), são expressos pelas **equações 6 e 7**, respetivamente.

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 6}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{y/x}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 7}$$

Seguidamente, os intervalos de confiança, tanto da ordenada na origem como do declive podem ser calculados a partir das **equações 8 e 9**:

$$b \pm tS_b \quad \text{Equação 8}$$

$$a \pm tS_a \quad \text{Equação 9}$$

Assim, a equação da reta de calibração contendo as incertezas da ordenada na origem e do declive, com um intervalo de confiança de 95 %, n-2 graus de liberdade, encontra-se abaixo representada pela **equação 10**.<sup>37,98,100</sup>

$$y = (b \pm tS_b)x + (a \pm tS_a) \quad \text{Equação 10}$$

## 3.2 Gama de Trabalho

A escolha da gama de trabalho ótima é fundamental para que os analistas tenham a capacidade de definir o intervalo de concentrações em que o analito alvo possa ser determinado e quantificado de forma precisa, exata e com a linearidade exigida, de acordo com as condições definidas pelo método.<sup>108,109</sup>

A gama de trabalho define-se então, como o intervalo de concentrações em que o método fornece resultados com uma incerteza aceitável. A extremidade inferior da gama de trabalho é o limite de quantificação e a extremidade superior é o limite de aplicabilidade onde se encontram as concentrações a partir da qual se observam anomalias significativas na sensibilidade do método. Para que a avaliação da gama de trabalho seja possível, é necessário considerar o procedimento de calibração proposto e a linearidade do método, além disto, é relevante considerar separadamente os dois tipos existentes: a gama de trabalho instrumental (efetuada durante o processo experimental) e a gama de trabalho do método.<sup>97-99,105,107,108</sup>

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho instrumental pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade das variâncias. Nesta gama de trabalho, a resposta do equipamento em função da concentração obedece a uma relação conhecida, e, portanto, a validação dessa mesma relação é necessária. Sendo que se recomenda a norma ISO 8466-1 para modelos lineares<sup>105</sup> e a norma ISO 8466-2<sup>106</sup> para modelos polinomiais de 2º grau.<sup>98-100</sup>

O estudo da homogeneidade das variâncias permite aferir se o método mantém um comportamento constante e similar ao longo de toda a gama de trabalho pretendida. De acordo com a norma ISO 8466-1 são recomendados dez pontos de calibração, não devendo ser em número inferior a cinco, distribuindo-se de igual modo na gama de concentrações.<sup>97-100,105</sup>

O primeiro e o último padrão são analisados em 10 réplicas independentes, sendo posteriormente efetuada a comparação estatística das variâncias destas soluções padrão de forma a avaliar a existência



de diferenças significativas entre eles. As variâncias associadas ao primeiro e último padrão ( $S_1$  e  $S_{10}$ ) foram determinadas de acordo com a **equação 11**:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{Equação 11}$$

Em que,  $i$  designa o número do padrão ( $1 \leq i \leq 10$ ) e  $j$  o número de repetições efetuadas para cada padrão.<sup>100,105</sup>

A partir dos valores obtidos pela expressão indicada pela **equação 11**, é possível o cálculo do valor de teste PG dado pelas **equações 12 e 13**, e é efetuado o teste de homogeneidade de variâncias:

$$PG = \frac{S_1^2}{S_{10}^2}, \text{ se } S_1 > S_{10} \quad \text{Equação 12}$$

$$PG = \frac{S_{10}^2}{S_1^2}, \text{ se } S_{10} > S_1 \quad \text{Equação 13}$$

Em que,  $S_1^2$  corresponde à variância da resposta da solução padrão de menor concentração e  $S_{10}^2$  à variância da resposta da solução padrão de maior concentração. Por fim, procede-se à comparação do valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor / Fisher* bicaudal ( $F_{\text{critico}}$ ), para  $n-1$  graus de liberdade:

Se  $PG \leq F$  significa que as diferenças nas variâncias não são significativas e a gama de trabalho está bem ajustada. No caso de se verificar a condição  $PG > F$ , as diferenças das variâncias são significativas e a gama de trabalho deve ser reduzida até que as variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitam obter a condição  $PG \leq F$ , ou em alternativa deve-se testar uma regressão ponderada.<sup>98,100,105</sup>

### 3.3 Linearidade

A análise da linearidade, tal como a gama de trabalho descrita anteriormente, deve ser efetuada durante a fase de implementação e validação de um método analítico. A linearidade consiste na capacidade de um determinado método de ensaio fornecer resultados instrumentais linearmente proporcionais à concentração do analito alvo, ou seja, o sinal instrumental obtido em função da concentração pode ser representado por uma função do 1º grau.<sup>37,97-99,105</sup>

A linearidade é avaliada pela conjugação da representação gráfica da função, aliada ao cálculo e análise do coeficiente de correlação (**equação 4**), que permite avaliar visualmente a proximidade dos pontos de

calibração face à reta.<sup>98,107</sup> Para além destes métodos, a linearidade é fundamentalmente avaliada com recurso a um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1<sup>105</sup>, designado teste de *Mandel*, que faz a comparação entre o ajuste dos valores experimentais para a função linear,  $S_{y/x}$  (**equação 5**), e o ajuste dos mesmos para a função quadrática  $S_{y2}$  (**equação 14**).

$$S_{y2} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}} \quad \text{Equação 14}$$

Em que,  $n$  designa o número de padrões utilizados para o traçado da reta de calibração, e  $(\hat{y}_i)$  representa o sinal obtido ( $y$ ) quando se interpola, na função quadrática, o valor de uma determinada concentração ( $x_i$ ).<sup>100,105</sup>

Seguidamente, procede-se ao cálculo da diferença de variâncias,  $DS^2$ , de acordo com a **equação 15**, abaixo representada:

$$DS^2 = (n - 2) \times S_{y/x}^2 - (n - 3) \times S_{y2}^2 \quad \text{Equação 15}$$

Em que,  $n$  representa o número de padrões da curva de calibração,  $S_{y/x}^2$ , designa o desvio-padrão residual da função de calibração linear e  $S_{y2}^2$ , o desvio-padrão residual da função de calibração não linear.<sup>100,105</sup>

Finalmente, calcula-se o valor de teste PG, de acordo com a **equação 16**, com o intuito de verificar a existência de diferenças significativas, por comparação com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor / Fisher* bicaudal ( $F_{\text{critico}}$ ), para um grau de liberdade, no que diz respeito à diferença de variâncias e  $n-3$  graus de liberdade, para o desvio-padrão residual da função de calibração não linear.<sup>97,98,100,105</sup>

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad \text{Equação 16}$$

Assim, se o valor de teste PG for inferior ou igual ao valor tabelado de F, a função de calibração é linear, ou seja, a função não linear não permite um melhor ajuste. No entanto, se o valor de teste PG for superior ao valor tabelado de F, a gama de trabalho deverá ser reduzida de forma a garantir uma calibração linear, ou por sua vez, proceder à verificação se, os dados de análise de amostras deverão ser avaliados através de uma função de calibração ponderada.<sup>100,105,106</sup>

### 3.4 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade de um método distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Assim, a sensibilidade define-se como a razão entre a variação da resposta ( $\Delta y$ ), que corresponde a uma variação na concentração de analito correspondente ( $\Delta x$ ), representada pela **equação 17**.<sup>98-100,110</sup>

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad \text{Equação 17}$$

Assim, um método é considerado sensível quando pequenas variações na concentração ( $x$ ) originam alterações significativas na resposta obtida ( $y$ ). A sensibilidade pode então definir-se como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. No caso de a curva de calibração ser definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa reta de calibração.<sup>37,97,98,100</sup>

A importância da sensibilidade como parâmetro de validação prende-se pela sua utilidade quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos, baseados em modelos lineares, para um mesmo analito, quando se pretende avaliar a evolução desta grandeza ao longo do tempo ou quando se compara a sensibilidade para vários analitos.<sup>100,110</sup>

### 3.5 Seletividade

A seletividade é geralmente objeto de estudo na fase inicial do processo de validação, pois sem o conhecimento de que a seletividade é aceitável, a verificação de outros parâmetros de desempenho apresenta escasso valor prático. A seletividade define-se como a medida da capacidade de um método identificar e diferenciar o(s) analito(s) numa mistura ou matriz complexa sem a interferência de outras substâncias de comportamento semelhante presentes.<sup>97-100,108</sup>

Um método analítico que tenha a competência de atingir um estado de seletividade perfeito, em que consiga distinguir completamente o analito relativamente a outros componentes presentes na amostra a analisar, diz-se específico. Num método analítico específico há a garantia de que o sinal instrumental obtido apenas provém do analito, ou seja, os interferentes não aumentam ou reduzem o sinal e os componentes presentes na matriz não afetam o sinal.<sup>97-100</sup>

Posteriormente é feita a análise da amostra com e sem fortificação e é analisado o desvio dos resultados obtidos em comparação com os esperados. Através da **equação 18**, calcula-se então, a taxa de recuperação do analito (R%).<sup>100,108</sup>

$$R(\%) = \left( \frac{C_{af} - C_a}{C_f} \right) \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

Em que,  $C_{af}$  designa a concentração do analito na amostra fortificada,  $C_a$  é a concentração do analito na amostra sem fortificação, e  $C_f$  a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.<sup>98</sup>

Assim, um método analítico pode ser considerado efetivamente seletivo/específico, quando, após a realização de ensaios de recuperação, se verificarem taxas de recuperação próximas de 100 %, dependendo das metodologias aplicadas, pois o critério para a aceitação de alguns métodos admite intervalos de recuperação mais ou menos alargados.<sup>100</sup>

### 3.6 Limiares analíticos

Os limiares analíticos podem ser calculados de diferentes formas, de acordo com as metodologias utilizadas em rotina num laboratório. Sempre que os laboratórios utilizem métodos em que as medições são feitas em baixas concentrações, existem alguns aspetos a considerar, sendo que a terminologia relacionada com todos estes conceitos é muito diversa e variável entre setores.<sup>98,99</sup>

Primeiramente, a necessidade de estabelecer um valor que indique um nível de analito que é significativamente diferente de zero. Este valor é conhecido como o valor crítico ou limite de decisão. Por fim, é importante conhecer a concentração mais baixa do analito que pode ser detetada e/ou quantificada pelo método a um nível de confiança especificado, em que o desempenho se torne aceitável para uma aplicação típica. Estes conceitos são usualmente denominados, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ).<sup>99,111</sup>

Estes limites dependem de diversos fatores que variam no tempo (contaminações, tipo de amostra, equipamento, operador...), devendo assim ser reavaliados sempre que haja variação nos mesmos.<sup>110</sup>

#### 3.6.1 Limite de Deteção

O limite de deteção corresponde à concentração mais baixa que um determinado método é capaz de detetar e distinguir, com uma certeza estatística razoável, normalmente 95 %, do sinal do branco, mas não necessariamente quantificada como valor exato.<sup>97-100,108-111</sup>

O limite de deteção do método é determinado a partir de análises de soluções (ou amostras) tendo em consideração todas as etapas que foram realizadas para a análise da amostra teste, e é calculado a partir das **equações 19 e 20**, abaixo expressas:

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 19}$$

$$LD = 3,3 \times s'_0 \quad \text{Equação 20}$$

Em que,  $s_0$  corresponde ao desvio padrão associado aos ensaios realizados (entre 10 e 20 amostras independentes), em condições de repetibilidade,  $s'_0$  representa o desvio padrão corrigido,  $n$  designa o número de réplicas efetuadas em análises de rotina e 3,3 designa a constante de distribuição normal, que para um nível de confiança de cerca de 99,7 %, pois assume-se que a lei de probabilidade de  $x_0$  é suficientemente conhecida e que a distribuição é gaussiana (distribuição normal de erros).<sup>97-100</sup>

### 3.6.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa que um determinado método é capaz de quantificar, com um determinado nível de confiança, em que se verifica que o desempenho do método é aceitável para uma determinada aplicação, com uma determinada veracidade e precisão.<sup>97-100,108,111</sup>

A gama entre o LD e o LQ deve ser entendida como uma zona de deteção qualitativa, e não quantitativa, pelo que não se devem reportar valores numéricos nesta gama. Na prática, o LQ corresponde ao padrão de concentração mais baixa usado para traçar a curva de calibração (excluindo o branco). A determinação quantitativa do LQ é semelhante ao cálculo do LD, sendo obtido pela expressão (**equação 21**):

$$LQ = 10 \times s'_0 \quad \text{Equação 21}$$

Em que,  $s'_0$  representa o desvio padrão corrigido calculado a partir da **equação 19**.<sup>37,97,98,100,112</sup>

O valor do LQ deve ser validado experimentalmente, com uma determinada justeza e precisão, devendo-se aferir se o valor obtido é satisfatório. Isto é possível através da análise, em condições de precisão intermédia, de uma solução padrão com concentração próxima do LQ, em dez réplicas independentes, permitindo o cálculo do coeficiente de variação (CV), também designado por desvio padrão relativo, e o erro relativo (E), devendo estes valores encontrarem-se abaixo dos 10 %, de forma a validar o LQ do método.

### 3.7 Precisão

A precisão define-se como o parâmetro que permite a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, variando com a gama de concentração.<sup>99,100,113</sup>

Existem duas medidas de precisão extremas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por precisão intermédia ou variabilidade intralaboratorial.<sup>114,115</sup>

A precisão é determinada de acordo com as condições em que este parâmetro é avaliado e pode ser representada sob a forma de desvio padrão,  $s$ , coeficiente de variação, CV (**equação 22**) e limite de repetibilidade,  $r$  (**equação 23**):

$$CV(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 22}$$

Em que  $s$  representa o desvio padrão e  $\bar{x}$  a média dos resultados obtidos.<sup>99,100</sup>

A repetibilidade exprime o grau de concordância entre resultados de várias medições efetuadas na mesma amostra, em condições de repetibilidade, ou seja, em condições tão homogêneas quanto possível (mesmo analista, equipamento, condições de calibração, laboratório, entre outros), durante um curto período de tempo. Assim, deve proceder-se à análise de dez padrões ou amostras, nas condições definidas, em vários níveis de concentração, dentro da gama de trabalho do analito, e calcular a média e o desvio padrão, de forma a obter o coeficiente de variação (**Equação 22**).<sup>97-100,103,116</sup>

O limite de repetibilidade é definido como o valor abaixo do qual se deve situar, para uma dada probabilidade (normalmente 95 %), a diferença entre dois ensaios obtidos em condições de repetibilidade. Na prática aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se  $|x_i - x_{i-1}| \leq r$ .<sup>117</sup>

$$r = 2,8 \times S_r \quad \text{Equação 23}$$

Em que,  $S_r$  corresponde ao desvio padrão dos resultados obtidos em condições de repetibilidade. Como referência, também devem ser calculados os desvios padrão e os coeficientes de variação (normalmente  $\leq 10\%$ ) e comparados com os existentes na norma em que se baseia o método, nas indicações da legislação ou qualquer outra referência normativa.<sup>37,97-100,117</sup>

A precisão, em condições de reprodutibilidade é avaliada através da análise de medições repetidas no mesmo objeto (ou em objetos similares), com o mesmo procedimento de medição, em diferentes laboratórios, com diferentes operadores, usando diferentes sistemas de medição (equipamento).<sup>97-99,116</sup>

A precisão intermédia exprime o grau de concordância entre resultados de várias medições efetuadas na mesma amostra, em condições de precisão intermédia, isto é, o mesmo método, no mesmo laboratório, medições repetidas no mesmo objeto (ou em objetos similares), podendo incluir outras condições que envolvam mudanças, tais como diferentes calibrações, diferentes operadores ou equipamento, ao longo dum período extenso de tempo.<sup>97-100</sup>

Para determinar a precisão intermédia, são efetuados n medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos para estudar este tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outras gamas de concentração.<sup>100</sup>

A determinação da precisão intermédia pode ser efetuada em simultâneo com a repetibilidade assim como também é possível determinar a repetibilidade e reprodutibilidade em simultâneo através da ferramenta estatística da análise de variâncias (ANOVA).<sup>98,99</sup>

A ideia central da ANOVA é que num conjunto de dados replicados agrupado de alguma forma, por exemplo, por analista, equipamento, dia, laboratório, método, entre outros, a variação total em todo o conjunto pode ser representada como a combinação das variâncias entre e dentro dos grupos. Assim, a abordagem baseada na ANOVA de um fator (do inglês, *one-way* ANOVA) é utilizada para obter informação acerca das fontes/origem de variação e desta forma avaliar a precisão intermédia. A informação que se obtém a partir da ANOVA de um fator, considerando, p grupos, com n replicados com um total de N análises (N=p×n) para GL, graus de liberdade, encontra-se esquematizada na **Tabela 2**, abaixo representada.<sup>37,102,118,119</sup>

**Tabela 2.** Dados obtidos num ensaio através da ANOVA unifatorial.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SQ)	Equações	Graus de liberdade (v)	Média quadrada (MQ)	Equações
Entre grupos (b)	$SQ_b = n \sum_i (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	24	p - 1	$MQ_b = \frac{SQ_b}{(p - 1)}$	25
Dentro dos grupos (w)	$SQ_w = n \sum_j \sum_i (x_{ij} - \bar{x})^2$	26	N - p	$MQ_w = \frac{SQ_w}{(N - p)}$	27
Total	$SQ_{tot} = SQ_b + SQ_w$	28	N - 1		

Cada linha da **Tabela 2** está relacionada com uma diferente fonte de variação. A primeira linha descreve a variação entre os grupos (**Equações 24 e 25**), a segunda linha indica a variação dentro dos grupos (**Equações 26 e 27**) e a terceira linha refere-se à variação do conjunto de dados como um todo (**Equação 28**).<sup>102</sup>

A informação obtida pela análise de variâncias permite calcular a precisão intermédia recorrendo a três etapas. Primeiramente, determina-se o desvio padrão dos resultados (dentro dos grupos), que permite estimar o desvio padrão de repetibilidade  $s_r$ , de acordo com a **equação 29**:

$$s_r = \sqrt{MQ_w} \quad \text{Equação 29}$$

Em que  $MQ_w$  representa o quadrado das médias “dentro do grupo”.

Seguidamente, procede-se ao cálculo do desvio padrão “entre grupos”, segundo a **equação 30**.

$$s_{between} = \sqrt{\frac{MQ_b - MQ_w}{n}} \quad \text{Equação 30}$$

Em que  $MQ_b$  representa o quadrado das médias “entre grupos”.

Por fim, o desvio padrão “entre grupos” é combinado com o desvio padrão de repetibilidade, a partir dos resultados para cada material, de modo a calcular o desvio padrão de precisão intermédia,  $s_i$ , **Equação 31**:

$$s_i = \sqrt{s_r^2 + s_{between}^2} \quad \text{Equação 31}$$

onde  $s_{between}$  representa o desvio padrão “entre os grupos”.<sup>37,98,102,118,119</sup>

### 3.8 Justeza

A justeza ou veracidade é o termo que designa o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência, assim, por esta definição, a veracidade não é uma grandeza, pois não é possível atribuir-lhe um valor numérico, e, portanto, não pode ser medida. Já o termo exatidão define-se como o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de uma grandeza (mensuranda).<sup>98,100</sup>



A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica a combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos, não devendo ser utilizada no lugar da justeza de medição ou precisão de medição.<sup>112</sup>

No entanto, a justeza pode ser expressa quantitativamente como uma estimativa do erro sistemático, designado *bias*. Este parâmetro tem a contribuição de erros sistemáticos, tanto do método, inerentes ao mesmo e não dependentes do laboratório, quer do laboratório (erros adicionais específicos que dependem do desempenho do mesmo).<sup>98,99</sup>

Assim, o parâmetro justeza pode ser avaliado quantitativamente através de Materiais de Referência Certificados (MRC) ou Internos (MRI), Ensaio Interlaboratoriais (EIL), ou Ensaio de Recuperação (ER).<sup>99,102</sup>

### 3.8.1 Materiais de Referência Certificados

Os materiais de referência são recursos essenciais no controlo de qualidade e, portanto, devem fazer parte do processo de validação de um determinado método. Além disso, estes materiais constituem uma excelente ferramenta no Controlo Externo da Qualidade de uma análise química.<sup>97,100,120</sup>

Por definição, um material de referência designa um material com elevado grau de homogeneidade e estabilidade, em determinadas propriedades, que foi preparado para uma utilização prevista numa medição ou para o exame de alguma propriedade, sendo que sempre que possível deve ser representativo relativamente a padrões reconhecidos nacional ou internacionalmente.<sup>120-125</sup>

Os materiais de referência certificados são acompanhados de documentação emitida por uma entidade qualificada, tais como, IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*), NIST (*National Institute of Standards and Technology*), US EPA (*US Environmental Protection Agency*), entre outros, fornecendo valores de uma ou mais propriedades especificadas e as incertezas e rastreabilidades associadas, usando procedimentos válidos.<sup>97,99,103,123-126</sup>

Frequentemente não existem disponíveis MRC adequados ou o seu custo é elevado, recomendando-se a preparação no laboratório de materiais de referência internos ou de trabalho (uso em rotina). Estes materiais devem ser calibrados através da utilização de materiais de referência certificados.<sup>112,120-122,124</sup>

A utilização correta de MRC assegura a exatidão de um método, além de permitir ao laboratório a verificação do desempenho do equipamento, procedimentos, sistemas e analistas, o que garante a possibilidade do laboratório concluir se os dados gerados pelo seu procedimento são corretos. O valor

obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e a justeza da análise. Conforme o rigor exigido para os seus resultados, o laboratório pode adotar diferentes critérios para aceitação dos resultados dos MRC.<sup>112,121,124</sup>

Os processos criteriosos para avaliação dos resultados obtidos da análise de um MRC são os seguintes<sup>100</sup>: *bias*, Teste de hipóteses (teste t), Fator de desempenho Z (*Z-score*) e o Erro normalizado ( $E_n$ ).

### 3.8.1.1 *Bias*

A determinação do *bias* e do *bias* relativo permite avaliar a exatidão de um determinado método e a expressão dos erros sistemáticos associados. O *bias* relativo é calculado através da análise de réplicas independentes ( $n \geq 10$ ) de MRC ou MRI, sendo posteriormente determinado o valor médio das réplicas e comparado com o valor médio obtido com os materiais de referência. O *bias* pode ser expresso em termos absolutos (**Equação 32**) ou relativos (**Equação 33**)<sup>98,100,103,127</sup>:

$$b = |\bar{x} - x_{ref}| \quad \text{Equação 32}$$

$$b (\%) = \frac{|\bar{x} - x_{ref}|}{x_{ref}} \times 100 \quad \text{Equação 33}$$

Em que,  $b$  é o *bias* absoluto,  $b (\%)$  é o *bias* relativo,  $\bar{x}$  representa a média aritmética dos valores obtidos experimentalmente para os materiais de referência e  $x_{ref}$  define o valor certificado do material de referência, aceite como verdadeiro.

Cada laboratório define o seu grau de exigência em termos de justeza do método, isto é, o desvio permitido (de acordo com o objetivo da análise), devendo assegurar a confirmação pelos dados bibliográficos relativos ao método, sendo usualmente considerado satisfatório um método cujo erro relativo seja inferior a 5 %.<sup>97-100</sup>

### 3.8.1.2 *Teste de hipótese*

Através do teste de hipótese (**Equação 34**) é possível a avaliação da presença de diferenças significativas entre os valores de  $\bar{x}$  e de  $x_{ref}$  além de possibilitar averiguar a existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada.<sup>118,127</sup>

$$t = \frac{(\bar{x} - x_{ref})\sqrt{n}}{s} \quad \text{Equação 34}$$

Em que,  $\bar{x}$  representa a média aritmética dos valores obtidos experimentalmente para os materiais de referência,  $x_{ref}$  define o valor certificado do material de referência, aceite como verdadeiro,  $n$  é o número de amostras analisadas e  $s$  designa o desvio padrão associado à média dos valores do laboratório para o MRC.

O valor de  $t$  em módulo  $|t|$  é comparado com o valor de  $t$  tabelado para  $n-1$  graus de liberdade. Assim, se  $|t| \leq t_{tabelado}$  significa que as diferenças entre os valores de  $\bar{x}$  e  $x_{ref}$  não são significativamente diferentes, além de não ser estatisticamente evidenciada a existência de desvios (erros sistemáticos) e, portanto, o ensaio é satisfatório. No entanto, se  $|t| > t_{tabelado}$ , os valores de  $\bar{x}$  e  $x_{ref}$  são significativamente diferentes, com evidência estatística da existência de erros sistemáticos, e, portanto, o ensaio não é satisfatório.<sup>97-100,118,127</sup>

### 3.8.1.3 Fator de desempenho $Z$ (Z-score)

O fator de desempenho é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do desempenho do laboratório na análise de um MRC. O seu cálculo é efetuado de acordo com a expressão (**Equação 35**), abaixo representada.

$$Z = \frac{(x_{lab} - x_{ref})}{d} \quad \text{Equação 35}$$

Em que,  $x_{lab}$  é o valor obtido pelo laboratório,  $x_{ref}$  designa o valor aceite como verdadeiro, o valor certificado do MRC e  $d$  define a unidade de desvio admissível (variação máxima permitida no ensaio), podendo ser a incerteza do material de referência.

O desempenho do laboratório é classificado de acordo com o valor de  $Z$ , em módulo. Assim, se  $|Z|$  for inferior ou igual a 2, o desempenho é considerado satisfatório, se  $|Z|$  fica contínuo no intervalo entre 2 e 3, o desempenho é questionável e nas situações em que  $|Z|$  é maior que 3, o desempenho é não satisfatório.<sup>103,127,128</sup>

### 3.8.1.4 Erro normalizado

Assim como o fator de desempenho, o erro normalizado permite a avaliação do desempenho do laboratório na análise de um MRC. Caso o laboratório calcule a incerteza expandida do seu resultado ( $U_{lab}$ ), o valor verdadeiro ( $x_{ref}$ ) deve estar dentro do intervalo de incerteza de  $x_{lab}$ . Quando tal não acontece, este intervalo poderá estar subestimado. Nestes casos, e tal como acontece na análise de um MRC, é

usualmente calculado o erro normalizado,  $E_n$ , (**Equação 36**), para efetuar a avaliação do desempenho.<sup>100,103,128</sup>

$$E_n = \frac{x_{lab} - x_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad \text{Equação 36}$$

Em que,  $x_{lab}$  representa o valor médio obtido experimentalmente na análise do MRC,  $x_{ref}$  designa o valor aceite como verdadeiro do MRC,  $U_{lab}$  a incerteza expandida obtida pelo laboratório e  $U_{ref}$  a incerteza expandida do MRC.

Com base no valor de  $E_n$  é possível concluir que sempre que  $|E_n| \leq 1$ , o resultado é satisfatório, ou seja, a incerteza expandida obtida pelo laboratório encontra-se bem estimada.<sup>100,103,127,128</sup>

A análise de MRC e a avaliação de desempenho permite aos laboratórios uma contínua procura de possíveis fontes de erros, para que ocorra a implementação e definição da tomada correta de medidas com o intuito de corrigir esses mesmos erros detetados, de forma a ser possível proceder a uma reavaliação que confirme a sua efetiva eliminação.<sup>11,103,112,125,127,128</sup>

### 3.8.2 Ensaio Interlaboratoriais

Segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2018, os laboratórios devem monitorizar o seu desempenho através da comparação dos seus resultados com os resultados de outros laboratórios, quando disponível e apropriado, nomeadamente em ensaios de aptidão.<sup>10</sup>

Assim, os ensaios interlaboratoriais (EIL) permitem a avaliação do desempenho de ensaios na mesma condição ou condições relacionadas por dois ou mais laboratórios de acordo com condições pré-determinadas, o que evidencia a exatidão dos resultados obtidos através de um método de ensaio.<sup>11,37,103</sup>

A monitorização do desempenho do laboratório e dos seus analistas é conseguida através da participação por parte dos laboratórios em ensaios de aptidão ou "*Proficiency Tests*", considerados os ensaios interlaboratoriais mais comuns. Cada laboratório é classificado tendo em conta o seu índice de desempenho, pela avaliação da exatidão (precisão e justeza) dos seus resultados obtidos aliado a indicadores estatísticos (**Equação 35 e 36**). No caso da ocorrência de resultados pouco satisfatórios, é de extrema necessidade a implementação de um sistema de deteção de erros, de forma a tomar as medidas corretivas necessárias que promovam a eliminação dos agentes geradores de erros.<sup>11,112,123,127,128</sup>

### 3.8.3 Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação são extremamente relevantes na avaliação da resposta instrumental analítica obtida em inúmeras matrizes, sendo necessária a elaboração de um ensaio de recuperação em cada dia de trabalho, ao longo de toda a gama de trabalho, em matrizes diferentes, e em duplicado.<sup>37</sup>

O objetivo principal dos ensaios de recuperação passa por verificar se existem efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas como o efeito de matriz. Estes ensaios têm por base a adição de uma quantidade conhecida de padrão a uma amostra ou branco de amostra, para verificar a quantidade de analito que se obtém através do cálculo da taxa de recuperação (**Equação 18**), variando com a concentração de analito presente.<sup>97,98,100</sup>

Na eventualidade da avaliação de métodos analíticos instrumentais que possam induzir perdas ou contaminações, a análise da matriz a partir da realização de ensaios de recuperação junto do LQ deve ser feita com maior frequência.<sup>37,98,99</sup>

## 3.9 Robustez

A robustez de um método define-se como uma medida da sua capacidade de não ser afetado por pequenas e deliberadas variações nos parâmetros do método (ex. fatores experimentais). Assim, um método é considerado robusto quando se revela praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando o mesmo está a ser executado, permitindo conferir a confiabilidade dos resultados obtidos com o método durante o seu uso em rotina.<sup>99,100,120</sup>

Para avaliar a robustez normalmente é utilizada uma ferramenta denominada teste de *Youden*. Através deste teste é possível não só a identificação das variáveis que possam ter um efeito significativo no desempenho analítico do método, como também a ordenação da influência de cada um dos parâmetros variáveis no resultado final.

O teste de *Youden* baseia-se na realização de um determinado número de ensaios com réplicas, sobre uma amostra de composição conhecida realizados segundo um plano de controlo de fatores experimentais (até um máximo de sete), suscetíveis de influenciarem o processo. Cada fator em estudo é testado em dois níveis, um nível é descrito pelo número 1, que representa o valor nominal do fator (valor nominal) e outro por -1, que define o valor alternativo a testar. Assim, é estudado o efeito de cada fator em avaliação, através da análise dos resultados experimentais.<sup>99,100</sup>

O efeito de cada fator (R) é determinado segundo a **equação 37**:

$$R_i = \frac{\sum RE_i(1) - \sum RE_i(-1)}{Z} \quad \text{Equação 37}$$

Em que, Z corresponde à metade do número de ensaios efetuados.

Posteriormente, são ordenados os fatores de forma decrescente tendo em conta o valor obtido de Ri. Os fatores cujos valores de Ri forem mais elevados são aqueles que têm um efeito mais significativo no método, e por isso, deverão ser controlados com mais rigor em rotina.<sup>107</sup> Ainda assim, valores elevados de Ri não significam imperiosamente que o método não é robusto, para tal, o efeito de cada fator deve ser avaliado estatisticamente através de um teste t, recorrendo à **equação 38**, abaixo representada.

$$\Delta_{crit} = \frac{ts}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 38}$$

Em que, t representa o teste *t-Student* para um nível de confiança de 95 % e n-1 graus de liberdade, s define o desvio padrão e n o número de réplicas efetuadas.

Se algum dos valores de Ri for superior ao valor calculado de  $\Delta_{crit}$ , então o efeito desse fator é estatisticamente significativo.<sup>107</sup>

### 3.10 Incerteza de medição

Diariamente, são tomadas inúmeras importantes decisões tendo por base os resultados da análise química quantitativa. Sempre que as decisões se baseiam em resultados analíticos, é importante ter alguma indicação da qualidade dos mesmos, ou seja, da medida em que podem ser utilizados para os fins em questão, isto porque os clientes têm o direito de esperar que os relatórios dos resultados sejam factualmente corretos, úteis e abrangentes.<sup>129,130</sup>

Assim, a avaliação da incerteza de medição é essencial e imprescindível, de forma a ser demonstrável a credibilidade de um determinado laboratório e a adequação do método analítico implementado ao fim que se destina, e, portanto, um resultado de uma medição não tem significado se não estiver associado a uma incerteza. A incerteza de medição define-se então como o parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda.<sup>12,104,120,123</sup>

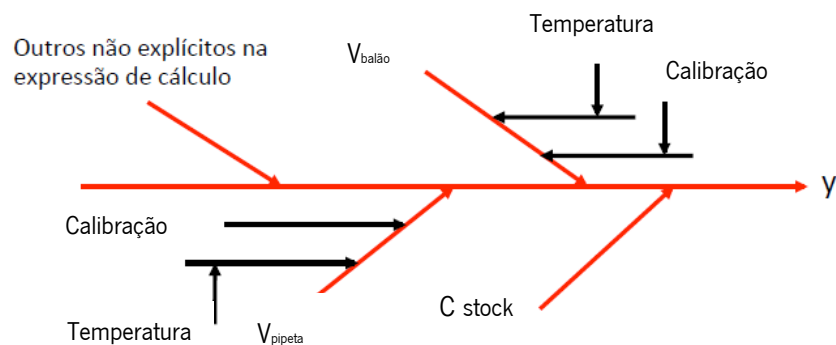
A incerteza engloba diversas componentes e deve ser estimada de modo que seja aplicável a todos os tipos de medição, independente do modo como as componentes são agrupados e transferível de forma

a que a incerteza de um resultado possa ser usada para derivar a incerteza de resultados dependentes.<sup>131,132</sup>

Existem várias abordagens para determinar a incerteza da medição, sendo que, idealmente, essas diferentes metodologias devem conduzir a resultados idênticos. Deste modo, são utilizadas várias metodologias para este efeito, tais como, a abordagem passo-a-passo e a metodologia baseada em dados de validação e/ou controlo de qualidade do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial, de acordo com a ISO 11352.<sup>104,129-131</sup>

A determinação da incerteza de medição, pela metodologia “passo a passo” compreende 3 grandes etapas essenciais de forma a obter-se o valor mais correto possível da incerteza. Inicialmente, é necessário especificar a mensuranda, o procedimento de medição e o campo de aplicação, de seguida identificar e quantificar todas as fontes de incerteza e por fim calcular as incertezas combinada e expandida.<sup>104,129-134</sup>

Após a especificação da mensuranda, procede-se à identificação das fontes de incerteza a partir da construção de diagramas causa-efeito, cujo exemplo se encontra apresentado na **Figura 11**, de forma a estabelecer as fontes de incerteza que devem ser tomadas em consideração.



**Figura 11.** Diagrama “espinha de peixe” para identificação das fontes de incerteza na preparação de uma solução por diluição de uma solução stock.<sup>120</sup>

O procedimento para a estimativa da incerteza de um método encontra-se descrito no esquema seguinte da norma ISO 11352 (**Figura 12**).

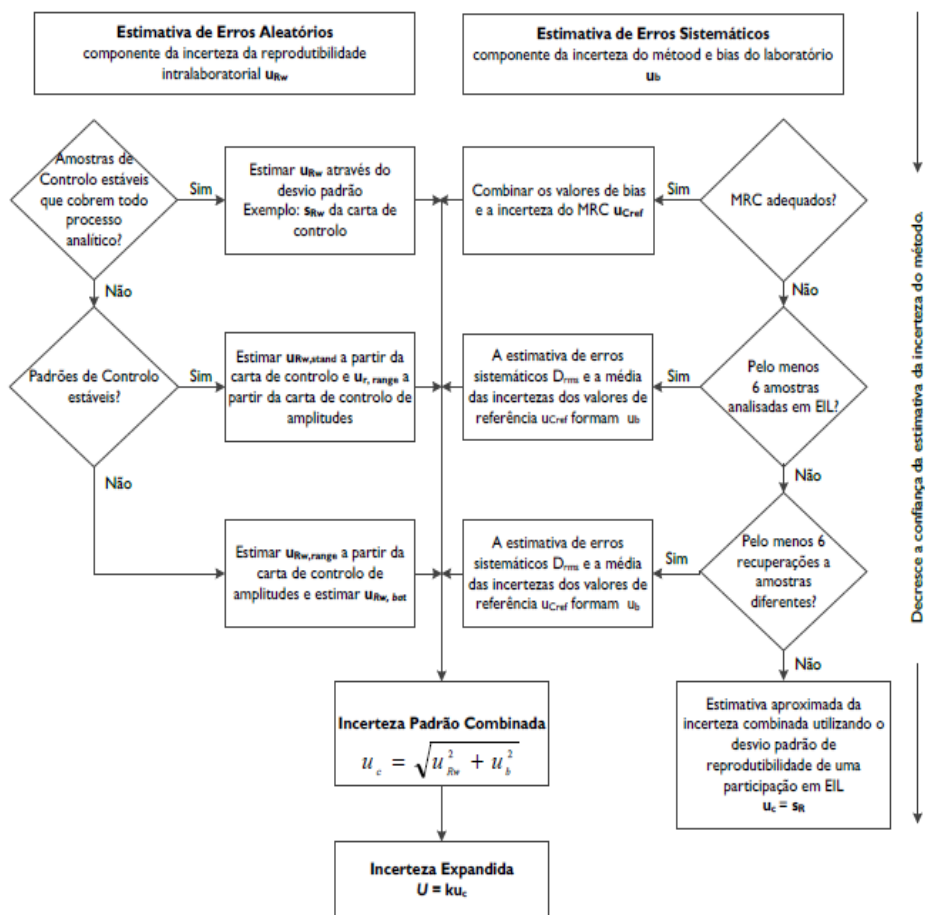


Figura 12. Esquema representativo do procedimento para a estimativa da incerteza do método baseada em dados de validação e/ou controlo de qualidade.<sup>104</sup>

Normalmente, a precisão intermédia do método analítico (reprodutibilidade intralaboratorial) e a veracidade/justeza do método e/ou laboratório (quantificada pelo *bias*) são determinadas independentemente usando os dados de validação e de controlo da qualidade.<sup>130,131,135</sup> Assim, a incerteza do método é expressa sob a forma de incerteza expandida, normalmente para um nível de confiança de 95 %, definida mediante a conjugação de duas componentes, a componente aleatória (precisão) e a componente sistemática (*bias*).<sup>132-136</sup>

### 3.10.1 Incerteza associada aos erros aleatórios

A estimativa das variações aleatórias (precisão) deve ser efetuada em condições similares às que são usadas nas análises de rotina. É recomendável que a incerteza associada aos erros aleatórios seja avaliada em condições de precisão intermédia, em vez de condições de repetibilidade ou de reprodutibilidade, pois assim consegue refletir eventuais variações do desempenho do método devido a alterações de parâmetros experimentais, dependendo da rotina habitual do laboratório, tais como, dias diferentes, equipamentos diferentes ou diferentes analistas.<sup>104,120,130</sup>



A componente de incerteza de precisão intermédia ( $u_{RW}$ ) é determinada mediante a análise de amostras de controlo de qualidade idênticas às amostras a analisar que cobrem todo o processo analítico, através do desvio padrão de amostras de controlo, obtido, por exemplo, a partir das cartas de controlo (Equação 39).

$$u_{RW} = s_{RW} \quad \text{Equação 39}$$

Em que,  $s_{RW}$  corresponde ao desvio padrão obtido experimentalmente de amostras de controlo. De modo a que possa ser realizado o cálculo de uma forma relativa, a componente de incerteza associada à precisão é determinada pela **equação 40**<sup>108,129,133</sup>:

$$u_{RW} = \frac{s}{\bar{x}} \quad \text{Equação 40}$$

Em que,  $s$  corresponde ao desvio padrão obtido experimentalmente de padrões de controlo, em condições de precisão intermédia e  $\bar{x}$  é a concentração média dos padrões de controlo obtida pelo laboratório ao longo do tempo.

A confiança da estimativa da incerteza é atingida a partir de dois níveis de concentração e no mínimo oito réplicas. Se o método analítico abranger uma ampla gama de concentração ou de matrizes, e a componente de incerteza de precisão intermédia,  $u_{RW}$ , variar com a concentração ou com a matriz, é necessário analisar amostras de controlo de qualidade que compreendam diferentes matrizes e níveis de concentração.<sup>112,129-131</sup>

### 3.10.2 Incerteza associada aos erros sistemáticos

A avaliação da incerteza associada aos desvios (*bias*) do laboratório/método deve ser estimada com base em duas componentes, o desvio (*bias*) relativamente a um valor nominal ou de referência certificado e a incerteza do valor nominal ou de referência certificado.<sup>104</sup>

Assim, de forma a estimar a incerteza associada aos erros sistemáticos são utilizadas diferentes metodologias, tais como, ensaios com materiais de referência certificados, a participação em ensaios interlaboratoriais, e a partir de ensaios de recuperação.<sup>104,129,130,135</sup>

Os ensaios com materiais de referência certificados permitem estimar a componente de incerteza associada à justeza (*bias*) do método/laboratório,  $u_b$ . Quando é usado apenas um material de referência, os resultados das análises deste, são tratados como a melhor estimativa disponível para a determinação da componente de incerteza associada aos erros sistemáticos, de acordo com a **equação 41**.

$$u_b = \sqrt{b^2 + \left(\frac{s_b}{\sqrt{n_M}}\right)^2 + u_{C_{ref}}^2} \quad \text{Equação 41}$$

Em que,  $b$  designa o *bias* (diferença entre o valor medido e o valor de referência aceite),  $s_b$  refere-se ao desvio padrão obtido experimentalmente da análise do MRC,  $n_M$  define o número de ensaios realizados com o MRC (mínimo de seis) e  $u_{C_{ref}}$  designa a incerteza do MRC.

A incerteza do valor de referência do MRC consta no certificado do fornecedor. No entanto, pode comportar a necessidade de converter a incerteza indicada numa incerteza padrão (**Equação 42**), como por exemplo, no caso da incerteza se encontrar expressa em incerteza expandida ou como intervalo de confiança.

$$u_{C_{ref}} = \frac{\left(\frac{U_{MRC}}{k}\right)}{MRC} \quad \text{Equação 42}$$

Em que,  $U_{MRC}$  designa a incerteza expandida do material de referência certificado,  $k$  refere-se ao fator de expansão referido no certificado do MRC, e  $MRC$  é o valor da concentração constante no certificado do MRC.<sup>104,123,131,136</sup>

A avaliação da incerteza associada aos erros sistemáticos a partir de ensaios de recuperação baseia-se na conjugação de duas componentes, a diferença entre a recuperação observada e a recuperação completa (100 %) ou a diferença entre a recuperação observada e a recuperação média (quando os resultados do método são corrigidos com base na recuperação média) (**Equação 43**) e a incerteza da concentração de analito adicionado (**Equação 44**).

$$b_{rms} = \sqrt{\frac{\sum b_i^2}{n_n}} \quad \text{Equação 43}$$

Em que,  $b_i$  se refere ao desvio relativamente à recuperação completa ou à média (no ensaio  $i$ ) e  $n_n$  designa o número de ensaios de recuperação efetuados.

$$u_{add} = \sqrt{u_V^2 + u_{conc}^2} \quad \text{Equação 44}$$

Em que,  $u_V$  define a incerteza associada ao volume adicionado e  $u_{conc}$  designa a incerteza da concentração da solução utilizada para a fortificação.

Assim, a componente de incerteza associada ao *bias* do método e laboratório,  $u_b$ , através de ensaios de recuperação é dada por (Equação 45):

$$u_b = \sqrt{b_{rms}^2 + u_{add}^2} \quad \text{Equação 45}$$

Em que,  $b_{rms}$  designa valor quadrático médio (ou raiz quadrada média) dos desvios dos ensaios de recuperação e  $u_{add}$  define incerteza da concentração de analito adicionada.<sup>104,123,132,135</sup>

### 3.10.2.1 Incerteza combinada e expandida

Após a estimativa de componentes individuais ou grupos de componentes de incerteza e a sua expressão como incertezas padrão, a próxima etapa consiste em calcular a incerteza padrão combinada.<sup>129</sup>

O cálculo da incerteza padrão combinada ( $u_c$ ) baseia-se na Lei da Propagação das Incertezas. Através das componentes de incerteza-padrão estimadas a partir dos dados de validação e/ou do controlo da qualidade do ensaio, nomeadamente, a combinação da componente da incerteza associada à precisão ( $u_{RW}$ ) e a componente associada ao *bias* ( $u_b$ ), permite o cálculo da incerteza padrão combinada, de acordo com a equação 46.<sup>129,132</sup>

$$u_c = \sqrt{u_{RW}^2 + u_b^2} \quad \text{Equação 46}$$

Por fim a etapa final consiste em multiplicar a incerteza padrão combinada pelo fator de expansão escolhido, a fim de obter uma incerteza expandida (Equação 47). A incerteza expandida é necessária para fornecer um intervalo que se pode esperar que abranja uma larga fração da distribuição de valores que podem ser atribuídos à mensuranda.<sup>129,130,132-136</sup>

$$U = k \times u_c \quad \text{Equação 47}$$

Em que,  $k$ , representa o fator de expansão, assumindo o valor de 2 para um nível de confiança aproximadamente 95 % e 3 para um nível de confiança aproximadamente 99 %. Caso o número de determinações seja inferior a 6, deve ser usado como valor de  $k$  o parâmetro de t-student bilateral.<sup>132-136</sup>

### 3.11 Garantia de Controlo de Qualidade

Os erros são parte integrante do trabalho em rotina e como tal é essencial por um lado minimizar (Garantia da Qualidade – GQ) e, por outro, controlar a sua ocorrência (Controlo da Qualidade - CQ) de modo a otimizar a eficácia do Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) adotado. Assim, após a fase inicial de estudo do equipamento e da técnica analítica, e aprovação do método de análise, os laboratórios devem exercer um controlo da sua execução, de modo a garantir que as condições de validade do método se mantêm.<sup>103,112</sup>

Este CQ deve ser planeado e implementado para permitir a monitorização contínua do desempenho analítico em rotina, de modo a que seja possível detetar tendências através da aplicação de técnicas estatísticas de análise de resultados. Tendo em conta estes aspetos, é necessário avaliar periodicamente a exatidão (justeza e a precisão) dos resultados, recorrendo ao CQ tanto intralaboratorial (interno) como Interlaboratorial (externo).<sup>10,101,137,138</sup>

#### 3.11.1 Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste nas ações de CQ cuja implementação depende apenas da vontade e meios do laboratório, e não de um fator externo. Estas ações visam a monitorização e controlo da precisão e exatidão dos resultados produzidos pelo laboratório.<sup>123</sup>

A monitorização dos resultados obtidos num laboratório permite verificar se estes estão fora do intervalo definido, e assim tomar medidas antes que os efeitos se tornem sérios. Os dados gerados são usualmente tratados estatisticamente através da elaboração de cartas de controlo. As cartas de controlo são muito utilizadas em condições de rotina e sempre que seja possível deve-se repetir uma determinação de padrões de controlo ou de amostras de teores conhecidos, em cada sessão de trabalho e por cada lote de amostra.<sup>103,138</sup>

As cartas de controlo, introduzidas em 1931 por Walter A. Shewhart, permitem através de uma representação gráfica obter enorme quantidade de informações, tais como, histórico de desempenho, avaliação e validação de calibrações e feedback imediato sobre se o processo está ou não sob controlo e/ou se ocorreu uma mudança no valor médio.<sup>103,138-140</sup>

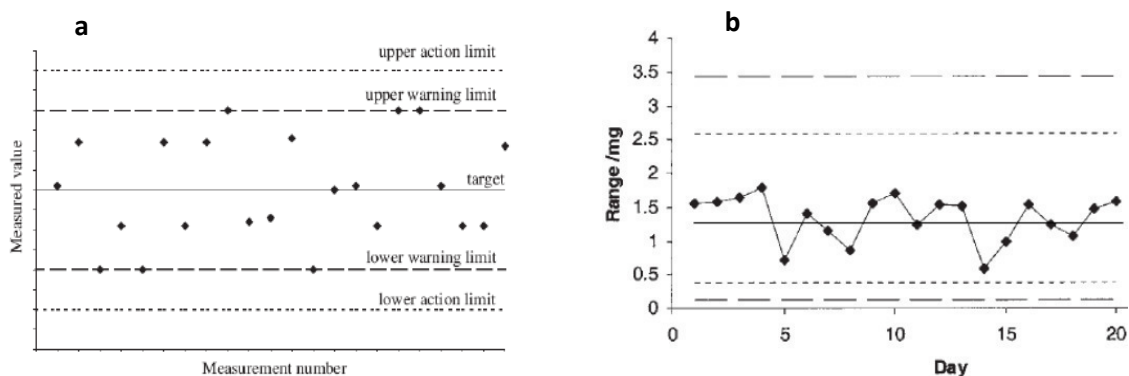
A representação gráfica consiste no registo dos valores medidos pelo laboratório em função do tempo, o que permite aferir visualmente as flutuações ou tendências nos resultados obtidos. Podem também ser registados os resultados obtidos por repetições de amostras ou desvios entre replicados, entre outros parâmetros.<sup>112,138-140</sup>

As cartas de controlo apresentam um sistema de alarme capaz de identificar resultados fora de controlo, através da definição dos limites de aviso e de controlo, pelo laboratório. O gráfico obtido é determinado pelas características estatísticas de variações aleatórias, definidas pela distribuição normal, isto porque a teoria associada a estas cartas assume que a grande maioria dos parâmetros associados aos processos industriais segue uma distribuição normal. Esta representação gráfica possui um conjunto de cinco linhas que irão permitir ao operador monitorizar o processo: a linha central, LC, os limites de aviso superior e inferior, LSA e LIA, e os limites de controlo superior e inferior, LSC e LIC.<sup>103,138,139</sup>

Atualmente existe uma extensa panóplia de tipos de cartas de controlo, destacando-se as cartas de médias ou de indivíduos (*Shewhart*), as cartas de amplitudes ou de amplitudes móveis e as cartas de somas cumulativas.<sup>103</sup>

As cartas de controlo de médias ou indivíduos representam a variação de um determinado parâmetro (valor individual ou a média de valores) em função do tempo. As cartas de amplitudes representam a diferença ou a amplitude de valores observados entre vários ensaios repetidos do mesmo material ou de materiais diferentes dentro de uma determinada gama de trabalho ao longo do tempo.<sup>103,138,141,142</sup>

A elaboração das cartas de controlo mencionadas (**Figura 13a, 13b**) requer no mínimo cerca de 20 a 25 observações do processo nas condições pré-estabelecidas, em termos de caracterização do processo, periodicidade de análise e parâmetros a controlar.



**Figura 13. a)** – Exemplo de carta de indivíduos. **b)** – Exemplo de carta de amplitudes.

Na carta de indivíduos, a linha central corresponde ao valor atribuído à média das medições repetidas obtidas,  $\bar{x}$ . Os limites de aviso e controlo são calculados de acordo com as **equações 48 e 49**, abaixo representadas.

$$LA = \bar{x} \pm 2s \quad \text{Equação 48}$$

$$LC = \bar{x} \pm 3s \quad \text{Equação 49}$$

Os valores destes limites são calculados a partir da variação intrínseca aos dados, que correspondem, respetivamente, às probabilidades de 95 % e 99,7 %.<sup>103,138,142</sup>

No caso das cartas de médias, a linha central é obtida da mesma forma que na carta de indivíduos, no entanto, os limites de aviso e controlo são calculados a partir das **equações 50 e 51**.

$$LA = \bar{x} \pm 2 \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 50}$$

$$LC = \bar{x} \pm 3 \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Equação 51}$$

Nas cartas de amplitudes, a linha central designa o valor médio das amplitudes e os limites podem ser determinados a partir de duplicados de uma amostra. O desvio padrão de um resultado analítico,  $s$ , pode ser estimado a partir de cartas de amplitudes, desde que a matriz da amostra seja igual à que foi utilizada para estabelecer a carta de controlo (**Equação 52**).<sup>103,138</sup>

$$s = \frac{\bar{R}}{d_2} \quad \text{Equação 52}$$

Em que,  $\bar{R}$  designa a média aritmética das amplitudes (diferença entre dois valores num duplicado de amostras), e  $d_2$  representa uma constante dependente do  $n^\circ$  de medições ( $n$ ) feitas numa amostra, normalmente, em duplicado.

As cartas de controlo de médias permitem o controlo da justeza e a deteção de desvios nos valores obtidos, pois mostram o modo como os valores médios estão relacionados com o valor alvo, no entanto, não fornecem informação acerca da distribuição dos resultados individuais. Já as cartas de amplitudes permitem o controlo da precisão, pois é avaliada a diferença entre o maior e o menor valor de um conjunto de análises.<sup>123,141-144</sup>

## II – Materiais e Métodos

## 4 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentados os equipamentos, reagentes e materiais utilizados, assim como os procedimentos experimentais realizados para a determinação dos cátions sódio, amônio, magnésio e cálcio por cromatografia iônica e na preparação das soluções padrão. O método implementado foi utilizado na análise de amostras de águas naturais e águas de consumo. Foi utilizada água ultra-pura para a preparação das soluções padrão obtida através de um sistema de purificação Milli-Q® IQ 7000, cujas características se encontram apresentadas na **Tabela 3**, especificamente, a temperatura, a condutividade e o carbono orgânico total (TOC).

**Tabela 3.** Características do sistema de purificação Milli-Q® IQ 7000.

Temperatura (°C)	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	TOC (ppb)
25	0,055	1,8

### 4.1 Materiais

A **Tabela 4** apresenta o material volumétrico e a respetiva incerteza associada. Todo o material volumétrico de vidro utilizado foi de classe A.

**Tabela 4.** Material utilizado na realização do procedimento experimental e respetivas incertezas.

Material	Capacidade (mL)	Incerteza (mL)
Balões volumétricos	100	$\pm 0,1$
	50	$\pm 0,06$
	2000	$\pm 0,6$
Micropipetas	0,1	$\pm 0,0080$
	10	$\pm 0,01$
	5	$\pm 0,005$



## 4.2 Reagentes

Nas Tabelas 5 e 6 encontram-se listados os reagentes utilizados, assim como as suas respectivas características. As frases de perigo e prudência dos mesmos encontram-se apresentados na Tabela A1.

O ácido metanosulfônico (MSA) foi utilizado na preparação da solução de eluente necessária para a separação dos catiões na coluna do cromatógrafo iônico.

**Tabela 5.** Reagentes utilizados para a preparação do eluente tendo em vista a realização do procedimento experimental.

Reagente	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	C (M)	Pureza (%)	Marca
Ácido metanosulfônico (MSA)	CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H	96,106	2,800	99,9	CPA chem

Foram utilizadas soluções padrão de sódio, amônio, magnésio e cálcio comerciais da Merck® e ainda soluções padrão comerciais da marca Merck® mas de lotes diferentes para realização de ensaios independentes (Tabela 6).

**Tabela 6.** Soluções padrão comerciais da marca Merck® utilizadas durante a realização do procedimento experimental.

Reagente	Fórmula Molecular	Massa molecular (g/mol)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Lote	C ± U (mg/L)
Solução Padrão Sódio	NaNO <sub>3</sub>	84,995	1,013	HC69804107 <sup>a)</sup>	1000 ± 2
				HC73793707 <sup>b)</sup>	1000 ± 2
Solução Padrão Amônio	NH <sub>4</sub> Cl	53,491	0,990	HC99836412 <sup>a)</sup>	999,0 ± 0,4
				HC98486512 <sup>b)</sup>	1001 ± 0,4
Solução Padrão Magnésio	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	148,300	1,016	HC01346988 <sup>a)</sup>	984 ± 5
				HC56657688 <sup>b)</sup>	984 ± 4
Solução Padrão Cálcio	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	164,088	1,014	HC67623278 <sup>a)</sup>	1000,0 ± 2,8
				HC55587978 <sup>b)</sup>	996,8 ± 2,4

a) Solução usada na curva de calibração; b) solução usada nos ensaios independentes.

## 4.3 Preparação de soluções

### 4.3.1 Solução eluente de MSA 28,0 mM ( $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$ )

Medir para um balão volumétrico de 2 L, 20 mL de solução stock MSA de 2,8 M e diluir até à marca com água ultrapura.

### 4.3.2 Soluções utilizadas para a curva de calibração

#### *4.3.2.1 a) Preparação da solução mãe do padrão de sódio (100 mg/L) da curva de calibração*

Medir para um balão volumétrico de 100 mL, 10 mL da solução stock padrão de sódio (1000 mg/L), e perfazer o volume com água ultrapura.

#### *4.3.2.2 b) Preparação da solução mãe do padrão de amónio (9,99 mg/L) da curva de calibração*

Medir para um balão volumétrico de 100 mL, 1 mL da solução stock padrão de amónio (999 mg/L) e perfazer o volume com água ultrapura.

#### *4.3.2.3 c) Preparação da solução mãe do padrão de magnésio (9,84 mg/L) da curva de calibração*

Medir para um balão volumétrico de 100 mL, 1 mL da solução stock padrão de magnésio (984 mg/L), e perfazer o volume com água ultrapura.

#### *4.3.2.4 d) Preparação da solução mãe do padrão de cálcio (100 mg/L) da curva de calibração*

Medir para um balão volumétrico de 100 mL, 10 mL da solução stock padrão de cálcio (1000 mg/L), e perfazer o volume com água ultrapura.

#### *4.3.2.5 e) Preparação dos padrões da curva de calibração*

Medir para balões volumétricos de 100 mL, os volumes indicados na **Tabela 7** das soluções padrão preparadas nas alíneas a), b), c) e d) e perfazer o volume com água ultrapura, de forma a obter as concentrações estipuladas, apresentadas na **Tabela 8** com as respetivas incertezas expandidas. Nas **Figuras B1 e B2** encontra-se representado um exemplo de todo o processo efetuado para a determinação da incerteza expandida dos padrões da curva de calibração.

**Tabela 7.** Volumes da solução padrão mãe ( $V_{spm}$ ) para a preparação dos padrões da curva de calibração no volume de 100 mL, para cada catião.

	$V_{spm} Na^+$ (mL)	$V_{spm} NH_4^+$ (mL)	$V_{spm} Mg^{2+}$ (mL)	$V_{spm} Ca^{2+}$ (mL)
Padrão 1	2	0,25	2	1
Padrão 2	5	1	6	3
Padrão 3	10	2,5	10	5
Padrão 4	15	4	15	7
Padrão 5	20	5	20	10

**Tabela 8.** Concentrações das soluções padrão utilizadas na preparação das soluções padrão da curva de calibração, para cada catião.

	$C \pm U$ (mg/L) $Na^+$	$C \pm U$ (mg/L) $NH_4^+$	$C \pm U$ (mg/L) $Mg^{2+}$	$C \pm U$ (mg/L) $Ca^{2+}$
Padrão 1	2,000	0,02498	0,1968	1,0000
Padrão 2	5,000	0,0999	0,5904	3,000
Padrão 3	10,000	0,2498	0,9840	5,000
Padrão 4	15,000	0,3996	1,476	7,000
Padrão 5	20,000	0,4995	1,968	10,000

### 4.3.3 Padrões independentes e padrões de controlo da curva de calibração

#### 4.3.3.1 a) Preparação da solução mãe dos padrões independentes de sódio (100 mg/L), magnésio (9,84 mg/L) e cálcio (49,8 mg/L)

Medir para um balão volumétrico de 100 mL, 10 mL da solução stock padrão de sódio (1000 mg/L), 1 mL da solução stock padrão de magnésio (984 mg/L) e 5 mL da solução stock padrão de cálcio (996,8

mg/L) (a partir de soluções comerciais diferentes das utilizadas para preparar os padrões na curva de calibração) e perfazer o volume com água ultrapura.

#### 4.3.3.2 b) Preparação da solução mãe do padrão independente de amónio (10,1 mg/L)

Medir para um balão volumétrico de 100 mL, 1 mL da solução stock padrão de amónio (1001 mg/L) (a partir de uma solução comercial diferente da utilizada para preparar os padrões na curva de calibração) e perfazer o volume com água ultrapura.

#### 4.3.3.3 c) Padrões de controlo da curva de calibração

Medir para um balão volumétrico de 50 mL, os volumes indicados na **Tabela 9** das soluções padrão preparadas nas alíneas a) e b), e perfazer o volume com água ultrapura, de forma a obter as concentrações estipuladas, apresentadas na **Tabela 10**.

**Tabela 9.** Volumes da solução padrão mãe ( $V_{spm}$ ) para a preparação dos padrões independentes de controlo da curva de calibração em volume de 50 mL, para cada catião.

	$V_{spm} Na^+$ (mL)	$V_{spm} NH_4^+$ (mL)	$V_{spm} Mg^{2+}$ (mL)	$V_{spm} Ca^{2+}$ (mL)
Padrão 1	1	0,5	1	1
Padrão 3	5	1,25	5	5
Padrão 5	10	2,5	10	10

**Tabela 10.** Concentrações das soluções padrão independentes, para cada catião.

	C $Na^+$ (mg/L)	C $NH_4^+$ (mg/L)	C $Mg^{2+}$ (mg/L)	C $Ca^{2+}$ (mg/L)
Padrão 1	2,000	0,0250	0,1968	0,9968
Padrão 3	10,000	0,2503	0,9840	4,984
Padrão 5	20,000	0,5005	1,968	9,968

Todas as soluções padrões dos cátions foram preparadas diariamente.

#### 4.4 Condições experimentais

Os cátions sódio, amônio, magnésio e cálcio foram analisados em duas matrizes diferentes, águas de consumo humano e águas naturais doces superficiais através da cromatografia iônica. A análise foi efetuada no cromatógrafo iônico ICS1000, cujas especificações definidas encontram-se apresentadas na **Tabela 11**. As instruções de funcionamento do equipamento estão exibidas no **Anexo C**.

**Tabela 11.** Especificações das condições definidas e do material do cromatógrafo iônico ICS1000.

<b>Cromatógrafo iônico</b>	Dionex™ ICS1000
<b>Amostrador automático</b>	Dionex™ AS40
<b>Colunas</b>	Pré-coluna: Dionex IonPac™ CG16 RFIC™, 5 x 50 mm, P/N 057574 Coluna analítica: Dionex IonPac™ CS16 RFIC™, 5 x 250 mm, P/N 079805
<b>Temperatura da coluna</b>	40°C
<b>Eluente</b>	28 mM de MSA (CH <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> H)
<b>Loop</b>	25 µL
<b>Fluxo</b>	1,0 mL/min
<b>Temperatura</b>	25 °C
<b>Detetor</b>	Supressor de condutividade: Dionex CDRS® 600 RFIC™ (4 mm)
<b>Intensidade de Corrente</b>	82 mA
<b>Pressão do sistema</b>	1004 psi
<b>Condutividade de fundo</b>	0,51 µS
<b>Tempo de análise</b>	36 min

## 4.5 Procedimento experimental

### 4.5.1 Curva de calibração

Construir a curva de calibração a partir da preparação das soluções padrão indicadas nas **Tabelas 7 e 8**. Medir cada uma das soluções padrão de concentração preparadas no ponto 4.3.2.5 alínea e) através da transferência das soluções para os vials próprios ( $\approx 5$  mL) colocados no amostrador automático AS40, conectado ao cromatógrafo iónico, nas condições apresentadas na **Tabela 11**.

### 4.5.2 Amostras

À semelhança das soluções padrão da curva de calibração, as amostras são transferidas para os vials próprios ( $\approx 5$  mL) colocados no amostrador automático AS40, conectado ao cromatógrafo iónico e estas são analisadas em duplicado, nas condições apresentadas na **Tabela 11**.

### 4.5.3 Ensaio de recuperação

Nos ensaios de recuperação dos catiões sódio, magnésio e cálcio, é adicionado 1 mL da solução preparada em 4.3.3.1 alínea a), num balão volumétrico de 50 mL perfazendo o volume com a amostra de modo a obter nos ensaios de recuperação dos catiões sódio, magnésio e cálcio uma fortificação de 2, 0,2 e 1 mg/L, respetivamente. No caso dos ensaios de recuperação do catião amónio, é adicionado 1,25 mL da solução preparada em 4.3.3.2 alínea b), num balão volumétrico de 50 mL, perfazendo o volume com a amostra a analisar. A concentração da fortificação é de 0,25 mg/L.

### 4.5.4 Teste de robustez

O teste de robustez foi efetuado através da preparação da solução padrão 3 representada na **Tabela 10**, posteriormente, foi transferida para os vials próprios, para o cromatógrafo iónico. As condições do equipamento (Temperatura da coluna, Concentração de eluente e Fluxo da fase móvel) foram alteradas de forma a construir-se uma matriz de teste de *Youden* com três fatores.

## 4.6 Colheita e transporte de amostras

As amostras foram colhidas em frascos de plástico de 1000 mL (para amostras particuladas) e frascos de plástico de 150 mL (para amostras não particuladas). Os frascos foram enxaguados com a amostra e completamente cheios, minimizando a agitação da amostra durante o seu transporte.

Posteriormente, as amostras foram transportadas para o Laboratório e, procedeu-se à filtração de 150 mL de amostra com um filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade, no caso, de as amostras conterem partículas.

No caso de não se analisar imediatamente as amostras contendo os cátions sódio, magnésio e cálcio, estas devem ser acidificadas a  $1 < \text{pH} < 2$  através da utilização de ácido nítrico na proporção 1:100 (5 mL  $\text{HNO}_3$ /500 mL de amostra). No caso das amostras contendo amónio estas devem ser acidificadas a  $\text{pH} < 2$  através da utilização de ácido sulfúrico na proporção 1:250 (1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$ /250 mL de amostra) ou refrigerar à temperatura de  $3 \pm 2$  °C.

#### 4.7 Análise e Apresentação de resultados

Os cromatogramas foram adquiridos com recurso ao software Chromeleon que fornece os dados em termos de área de pico ( $\mu\text{s min}$ ) e de concentração (mg/L), posteriormente foram tratados recorrendo às funções presentes no Excel.

Todas as réplicas foram submetidas ao teste de *Grubbs* tendo em vista a deteção de valores discrepantes e a respetiva análise da necessidade de rejeição de valores entre réplicas (**Equação 53**).

$$G = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s} \quad \text{Equação 53}$$

Em que,  $x_s$  representa o valor suspeito,  $s$  o desvio padrão e  $\bar{x}$  a média dos resultados obtidos. Se o  $G$  calculado for inferior ao valor de  $G$  tabelado, o valor suspeito não deve ser rejeitado, no entanto se o  $G$  calculado for maior ou igual ao valor de  $G$  tabelado o valor suspeito deve ser rejeitado.<sup>41</sup>

Este teste pressupõe que os valores seguem uma distribuição normal e que, portanto, réplicas que se encontrem fora dos limites impostos pelo desvio padrão, devam ser rejeitadas. No caso dos valores das áreas dos picos cromatográficos obtidos para a construção de curvas de calibração, são rejeitados todos os valores que cumpram o critério  $|y_i - \hat{y}_i| > 2S_{y/x}$ .

Os testes estatísticos efetuados bem como a apresentação das incertezas associadas aos parâmetros da reta de calibração foram realizados com um nível de confiança de 95 %.

Os resultados obtidos em termos de concentração relativos aos padrões da curva de calibração, bem como os padrões independentes são apresentados com a respetiva incerteza expandida e com 2 algarismos significativos, como exemplificado nas **Figuras B1** e **B2** para a solução padrão de amónio de 0,50 mg/L.

### III – Apresentação e Discussão de Resultados

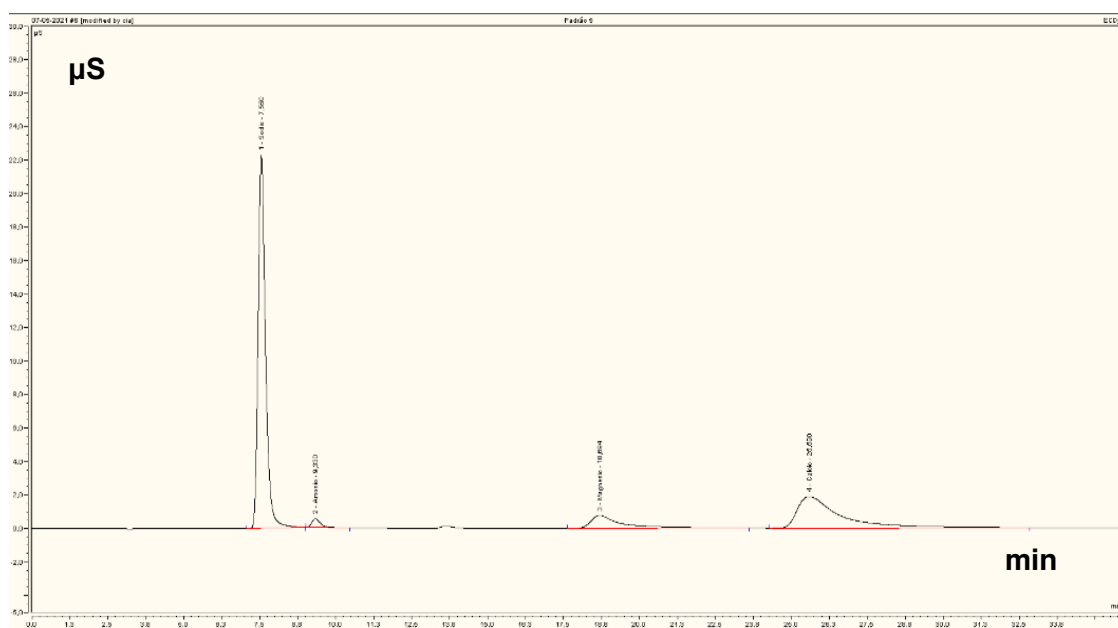


## 5 Validação do método de determinação de catiões por cromatografia iónica

A determinação de catiões (sódio, amónio, magnésio e cálcio) por cromatografia iónica teve por base o método descrito na norma ASTM D6919 – 17: *Standard Test Method for Determination of Dissolved Alkali and Alkaline Earth Cations and Ammonium in Water and Wastewater by Ion Chromatography*.<sup>93</sup> Assim, neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados obtidos, assim como as metodologias implementadas para a validação deste método analítico interno.<sup>96</sup>

De forma a implementar e subsequentemente validar o desempenho do método, procedeu-se à caracterização dos parâmetros analíticos, especificamente, a gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, seletividade, limiares analíticos, repetibilidade e precisão intermédia, justeza, robustez e incerteza de medição, recorrendo, como referência, aos guias da Relacre n.º 3, Validação de Resultados em Laboratórios Químicos<sup>103</sup>, e n.º 13, Validação de Métodos Internos de Ensaios em Análise Química<sup>100</sup> e ainda à norma ISO 11352 *Water quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*.<sup>104</sup> Consumado o processo de validação do método interno, foi implementado o procedimento do controlo da qualidade do mesmo, utilizando como ferramentas as cartas de controlo.

A implementação do método para a determinação dos catiões acima referidos foi efetuada em simultâneo, dado que os sinais obtidos referentes aos iões analisados surgem em tempos de retenção suficientemente diferentes para que não ocorra interferências na análise.



**Figura 14.** Cromatograma de uma solução padrão mista de Na<sup>+</sup> – 20,000 mg/L; NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – 0,4995 mg/L; Mg<sup>2+</sup> – 1,968 mg/L; Ca<sup>2+</sup> – 10,000 mg/L nas condições experimentais indicadas na secção Material e métodos.

A **Figura 14** representa um exemplo típico dos picos observados num cromatograma de uma solução padrão mista contendo os quatro catiões a analisar, por ordem crescente do tempo retenção: sódio, amónio, magnésio e cálcio. A partir do cromatograma representado na **Figura 14** foi possível obter os valores das áreas dos picos, bem como dos tempos de retenção obtidos para cada um dos catiões, representados na **Tabela 12**.

**Tabela 12.** Dados obtidos a partir do cromatograma de uma solução padrão mista.

	Concentração (mg/L)	Área ( $\mu$ S min)	Tempo de retenção (min)
Na <sup>+</sup>	20,000	6,33	7,55
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,4995	0,166	9,33
Mg <sup>2+</sup>	1,968	1,01	18,69
Ca <sup>2+</sup>	10,000	3,26	25,59

## 5.1 Curva de Calibração

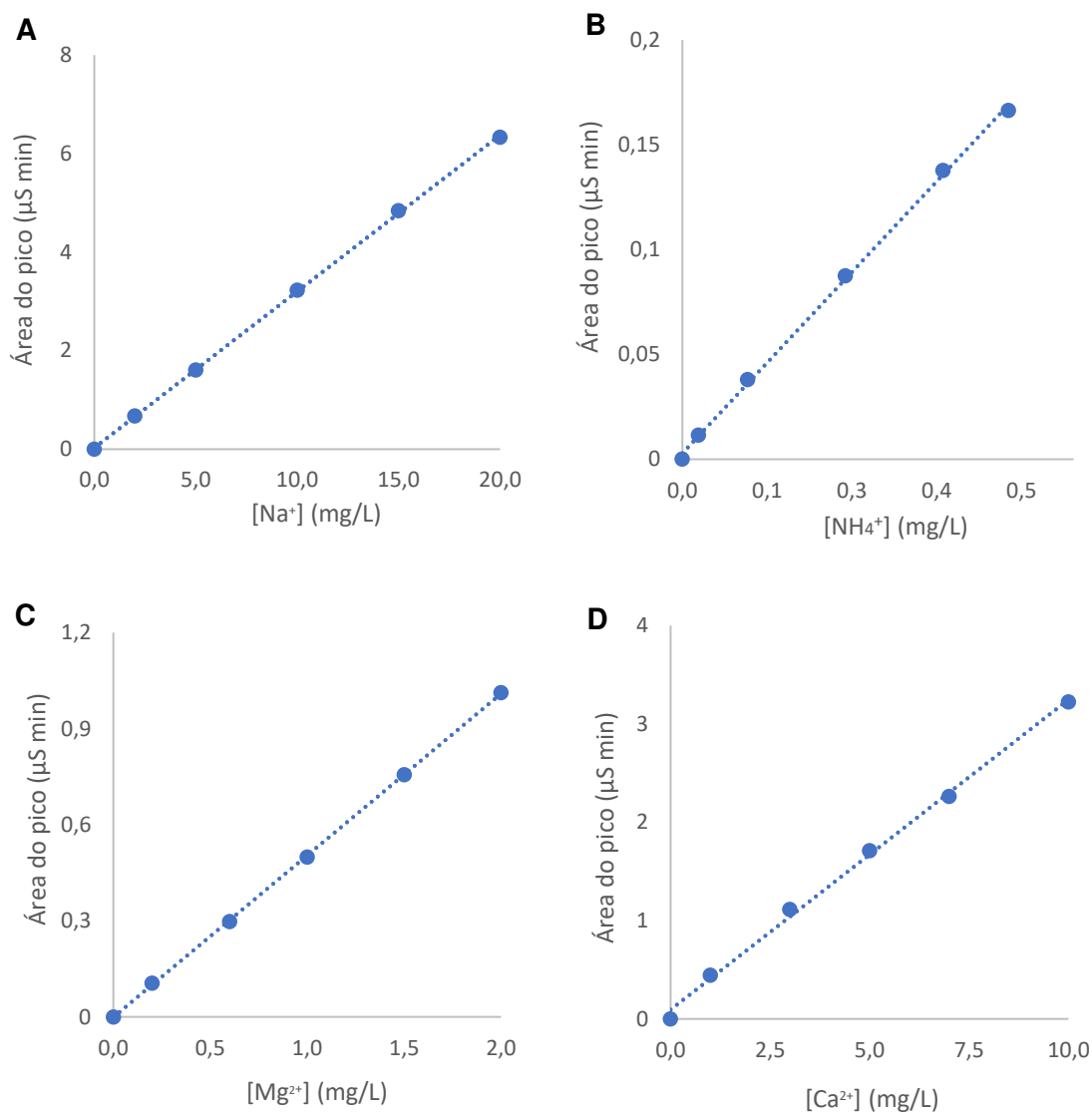
Com o traçar da curva de calibração deu-se início ao processo de validação do método, para tal, procedeu-se à representação das áreas dos picos obtidos em função da concentração de 5 soluções padrão pertencentes à gama de concentrações definida, exibidas na **Tabela 13** com a respetiva incerteza expandida.

A incerteza expandida foi determinada recorrendo à metodologia passo-a-passo, como exemplificado para o padrão de maior concentração para o ião amónio nas **Figuras B1** e **B2**.

**Tabela 13.** Valores de concentração e área de pico utilizados para a construção da curva de calibração, para cada catião.

Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>		Ca <sup>2+</sup>	
C $\pm$ U (mg/L)	Área ( $\mu$ S min)	C $\pm$ U (mg/L)	Área ( $\mu$ S min)	C $\pm$ U (mg/L)	Área ( $\mu$ S min)	C $\pm$ U (mg/L)	Área ( $\mu$ S min)
2,000 $\pm$ 0,010	0,674	0,02498 $\pm$ 0,00069	0,0114	0,1968 $\pm$ 0,0021	0,106	1,0000 $\pm$ 0,0089	0,444
5,000 $\pm$ 0,016	1,604	0,0999 $\pm$ 0,0012	0,0379	0,5904 $\pm$ 0,0058	0,298	3,000 $\pm$ 0,013	1,115
10,000 $\pm$ 0,030	3,225	0,2498 $\pm$ 0,0022	0,0875	0,9840 $\pm$ 0,0097	0,499	5,000 $\pm$ 0,019	1,713
15,000 $\pm$ 0,044	4,838	0,3996 $\pm$ 0,0034	0,138	1,476 $\pm$ 0,014	0,757	7,000 $\pm$ 0,026	2,264
20,000 $\pm$ 0,058	6,327	0,4995 $\pm$ 0,0043	0,166	1,968 $\pm$ 0,020	1,013	10,000 $\pm$ 0,036	3,225

A **Figura 15** retrata as curvas de calibração obtidas, utilizando um modelo linear, para os cátions sódio (**Figura 15A**), amônio (**Figura 15B**), magnésio (**Figura 15C**) e cálcio (**Figura 15D**), respectivamente.



**Figura 15.** Representação gráfica da reta de calibração das áreas dos picos em função da concentração das soluções padrão de: A)  $\text{Na}^+$ ; B)  $\text{NH}_4^+$ ; C)  $\text{Mg}^{2+}$  e D)  $\text{Ca}^{2+}$ .

As curvas de calibração exibidas na **Figura 11** apresentam as equações da reta representadas na **Tabela 14** e ainda o coeficiente de correlação,  $r$ .

De acordo com a **Tabela 14**, é possível aferir o elevado ajuste observado em todas as curvas de calibração, isto porque, segundo o Guia Relacre 13,<sup>100</sup> é considerado satisfatório sempre que  $r > 0,995$ , o que acontece para as retas de calibração de todos os cátions.

**Tabela 14.** Dados obtidos a partir dos cromatogramas de solução padrão mistas que originaram as representações gráficas da **Figura 11**.

	Equação da reta	r
Na <sup>+</sup>	$y = 0,3174x + 0,0274$	0,9999
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$y = 0,3324x + 0,0028$	0,9995
Mg <sup>2+</sup>	$y = 0,5133x - 0,0008$	0,99994
Ca <sup>2+</sup>	$y = 0,3152x + 0,0943$	0,999

A partir do traçado das curvas de calibração foi também possível estimar os valores das incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem, bem como os valores do desvio padrão e coeficiente de variação do método, exibidos, para cada catião, na **Tabela 15**.

**Tabela 15.** Intervalos de confiança da ordenada na origem ( $tS_a$ ) e do declive ( $tS_b$ ) da curva de calibração, para 95 % de probabilidade, assim como os valores obtidos do desvio padrão do método ( $S_m$ ) e coeficiente de variação do método ( $CV_m$ ), para cada catião.

	$a \pm tS_a$ ( $\mu\text{S min}$ )	$b \pm tS_b$ ( $\mu\text{S min L mg}^{-1}$ )	$S_m$ ( $\text{mg/L}$ )	$CV_m$ (%)
Na <sup>+</sup>	$0,0274 \pm 0,0017$	$0,3174 \pm 0,0063$	0,13	1,5
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$0,0028 \pm 0,0037$	$0,332 \pm 0,015$	0,0074	3,5
Mg <sup>2+</sup>	$-0,0008 \pm 0,0021$	$0,5051 \pm 0,0077$	0,0091	1,1
Ca <sup>2+</sup>	$0,0943 \pm 0,0061$	$0,315 \pm 0,023$	0,22	5,1

Da análise da **Tabela 15**, verifica-se que a incerteza relativa associada ao declive é baixa (inferior a 7 %) e ainda que no caso do ião amónio e magnésio, a origem está contida no intervalo de confiança da ordenada na origem.

No caso da reta de calibração relativa ao ião sódio e cálcio verifica-se que a incerteza associada à ordenada na origem não engloba o ponto (0,0). No entanto, a ordenada na origem destas duas retas de calibração apresenta um valor relativamente baixo. Este facto foi observado em todas as retas de calibração traçadas para estes dois iões.

O desvio padrão do método assim como o coeficiente de variação do método permitem verificar a qualidade do trabalho, nomeadamente o  $CV_m$  que se encontra abaixo dos 10 % definidos pelo laboratório, o que demonstra a baixa dispersão dos resultados obtidos. Assim, através dos dados obtidos, é possível a deteção de flutuações nas calibrações instrumentais e analíticas, na resposta dos equipamentos, desvios na preparação de padrões, e/ou deterioração de reagentes.

## 5.2 Gama de Trabalho

O processo de validação tem como uma das etapas iniciais a definição da gama de concentrações em que os analitos possam ser determinados de forma rigorosa e de acordo com o objetivo do ensaio, para que se obtenha o modelo de melhor ajuste exigido (linear ou quadrático), da resposta do equipamento em função da concentração, através da curva de calibração.

Assim sendo, foi efetuado o estudo da homogeneidade das variâncias através da análise de dez réplicas independentes do padrão de concentração mais baixa e dez soluções independentes do padrão de concentração mais elevada da gama de trabalho, de forma a avaliar a existência de diferenças significativas entre eles, uma vez que as variâncias associadas aos padrões nas extremidades da curva de calibração são suscetíveis de ser diferentes. Na **Tabela D1**, encontram-se apresentados os dados obtidos das áreas dos picos, para a avaliação da gama de trabalho dos catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio, não tendo sido rejeitada nenhuma réplica segundo o teste de *Grubbs*.

A partir dos dados obtidos na **Tabela D1** calculou-se o valor de PG recorrendo às **equações 12 e 13** de modo a ser possível efetuar o estudo da homogeneidade de variâncias pelo teste de *Fisher-Snedecor* (**Tabela 16**), com base na norma ISO 8466-1.<sup>105</sup>

**Tabela 16.** Valores obtidos das variâncias das áreas dos picos para cada solução padrão dos catiões analisados, para o estudo do ajuste da gama de trabalho, através da aplicação do teste de homogeneidade de variâncias.

Catião	C (mg/L)	$s^2$ ( $\mu\text{S min}$ ) <sup>2</sup>	PG
Na <sup>+</sup>	2,000	0,0010	0,192
	20,000	0,00019	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,02498	0,0000029	1,405
	0,4995	0,0000041	
Mg <sup>2+</sup>	0,1968	0,0000048	2,097
	1,968	0,000010	
Ca <sup>2+</sup>	1,0000	0,0077	0,952
	10,000	0,0074	

Da análise da **Tabela 16**, é possível verificar que todos os valores de PG são inferiores ao valor de F tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor* (3,179), para n-1 graus de liberdade, o que permite concluir que as diferenças encontradas entre as variâncias relativas às soluções padrão mais baixa e mais alta não são significativas e, portanto, a gama de trabalho encontra-se ajustada para todos os catiões.

### 5.3 Linearidade

A linearidade assume uma relevância sustentada após o traçado da curva de calibração, pois permite a verificação da capacidade do método fornecer resultados proporcionais às concentrações do analito. De facto, como já foi referido, os elevados coeficientes de correlação indicam que os valores experimentais se ajustam a um modelo linear. Para corroborar esta afirmação, pode recorrer-se ao Teste de *Mandel* que faz a comparação entre o ajuste dos valores experimentais tendo em consideração uma regressão linear e uma função quadrática.<sup>106</sup>

Na **Tabela 17** encontram-se os parâmetros utilizados para a aplicação do Teste de *Mandel*, calculados a partir da **equação 5**, **equação 14**, **equação 15** e **equação 16**.

**Tabela 17.** Valores obtidos e utilizados na aplicação do Teste de *Mandel*, para cada catião, com o intuito de confirmar a linearidade.

	$S_{y/x}^2$ ( $\mu\text{S min}$ ) <sup>2</sup>	$S_y^2$ ( $\mu\text{S min}$ ) <sup>2</sup>	$DS^2$ ( $\mu\text{S min}$ ) <sup>2</sup>	PG
<b>Na<sup>+</sup></b>	0,040	0,032	0,0032	3,13
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,0043	0,0039	0,000027	1,81
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0,0047	0,0034	0,000052	4,42
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,0697	0,0626	0,0077	1,96

Tendo em conta os parâmetros obtidos apresentados na **Tabela 17**, é possível concluir que a função de calibração de melhor ajuste é a linear e que, portanto, a função polinomial não produz um melhor ajuste dos pontos experimentais, uma vez que os valores de teste PG são inferiores ao valor de F tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor* (17,44).

## 5.4 Sensibilidade

Como o método de determinação segue um modelo linear, a sensibilidade permanece constante ao longo de toda a gama de trabalho, podendo ser determinada através da primeira derivada da curva de calibração - o declive,  $b$ . A partir da sensibilidade é possível verificar se pequenas variações na concentração dos analitos produzem grandes variações na resposta instrumental obtida.

Para isso foi avaliada a estabilidade da curva de calibração durante 12 dias, de forma a aferir a evolução desta grandeza ao longo do tempo.

Assim, a **Tabela E1**, apresenta os valores dos declives de 12 retas de calibração para cada catião, sendo que nenhum valor foi rejeitado através do teste de *Grubbs*. Através dos valores obtidos, foi possível a determinação da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação de forma a aferir a sensibilidade do método para cada um dos catiões (**Tabela 18**).

**Tabela 18.** Valores obtidos da média, desvio padrão e coeficiente de variação, tendo em vista a avaliação da sensibilidade do método.

	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
$\bar{b}$ ( $\mu\text{S min L mg}^{-1}$ )	0,3083	0,349	0,530	0,313
$s$ ( $\mu\text{S min L mg}^{-1}$ )	0,0091	0,019	0,021	0,020
CV (%)	3,0	5,5	3,9	6,4

A partir da análise dos resultados apresentados na **Tabela 18**, verifica-se a baixa dispersão dos valores de sensibilidade obtidos, destacado pelo reduzido valor do desvio padrão ( $s$ ) e, sobretudo, os coeficientes de variação (**CV**) que se encontram, para todos os catiões, abaixo do critério especificado pelo laboratório para este parâmetro de 10 %.

## 5.5 Seletividade

O estudo da seletividade permitiu avaliar o efeito da matriz nos resultados obtidos, pela possível presença de componentes que afetassem o sinal instrumental obtido. Para isso, a seletividade foi avaliada recorrendo a ensaios de recuperação, em que se adicionaram quantidades conhecidas de analito (amostra fortificada), efetuados em amostras reais que abrangeram toda a gama de trabalho, em duplicado, com matrizes diferentes, ao longo do tempo, de forma a ser o mais representativo possível da rotina em laboratório.

Na **Tabela F1**, encontram-se os resultados obtidos a partir de dez ensaios de recuperação independentes efetuados em amostras reais, para duas matrizes diferentes (águas de consumo humano e águas naturais doces superficiais).

A partir dos dados obtidos na **Tabela F1** procedeu-se ao cálculo dos valores de recuperação média, assim como do desvio padrão dos ensaios de recuperação efetuados para ambas as matrizes, para cada catião, apresentados na **Tabela 19**.

**Tabela 19.** Taxa de recuperação média obtida em dez ensaios de recuperação, em duas matrizes diferentes, assim como o desvio padrão obtido para os ensaios de recuperação, pelo laboratório.

Matriz	Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>		Ca <sup>2+</sup>	
	R (%)	s (%)	R (%)	s (%)	R (%)	s (%)	R (%)	s (%)
Água de consumo humano	102,6	3,8	100,8	5,9	101,8	4,6	99,1	7,2
Água natural doce superficial	99,9	6,9	100,4	4,7	100,8	5,6	99,0	6,1

Com base na análise dos resultados exibidos na **Tabela 19**, é possível observar que as taxas de recuperação média obtidas, para todos os catiões, estão compreendidas dentro do intervalo de aceitação definido pelo laboratório (90-110 %), além disso, todos os desvios padrão obtidos encontram-se abaixo dos 10 % estando, portanto, dentro dos critérios definidos pelo laboratório.

Assim, dado que as taxas de recuperação se encontram dentro do intervalo de aceitação e próximas de 100 % é possível concluir que o método é seletivo nas matrizes estudadas, isto é, tanto para águas de consumo humano como para águas naturais superficiais doces, permitindo a determinação seletiva dos catiões em estudo.

## 5.6 Limiares analíticos

Depois de confirmada a linearidade e seletividade do método de determinação dos catiões, sucedeu-se a determinação dos limiares analíticos, permitindo avaliar as concentrações mais baixas dos catiões exequíveis de serem detetadas (LD) e quantificadas (LQ).

Assim, de forma a determinar os limiares analíticos do método, procedeu-se à análise de dez brancos fortificados, com as concentrações do padrão de menor de concentração da curva de calibração, para cada catião (Na<sup>+</sup>: 2,000 mg/L; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: 0,02498 mg/L; Mg<sup>2+</sup>: 0,1968 mg/L; Ca<sup>2+</sup>: 1,0000 mg/L).



A **Tabela G1** apresenta os dados de concentração obtidos da análise de dez réplicas de brancos fortificados, em condições de repetibilidade, sendo que nenhum valor foi rejeitado pelo teste de *Grubbs*. Através dos resultados obtidos na **Tabela G1** foi possível a determinação da média, do desvio padrão (*s*), e do desvio padrão corrigido (*s'o*), apresentados na **Tabela 20**.

**Tabela 20.** Parâmetros determinados através da análise de dez réplicas de brancos fortificados, nomeadamente, a média, o desvio padrão e o desvio padrão corrigido obtidos.

	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
$\bar{C}$ (mg/L)	1,97	0,032	0,200	1,01
<i>s</i> (mg/L)	0,053	0,0030	0,0039	0,044
<i>s'o</i> (mg/L)	0,037	0,0021	0,0028	0,031

A partir da análise da **Tabela 20** relativa aos dez ensaios independentes dos brancos fortificados, calcularam-se os limiares analíticos acima referidos, segundo as **equações 20 e 21**, respetivamente, representados na **Tabela 21**.

**Tabela 21.** Limiares analíticos do método de determinação dos catiões em estudo.

	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
LD (mg/L)	0,11	0,0063	0,0083	0,094
LQ (mg/L)	0,37	0,021	0,028	0,31

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 21**, é possível afirmar que o método de determinação de catiões é capaz de detetar os iões sódio, amónio, magnésio e cálcio a concentrações bastante reduzidas, 0,11, 0,0063, 0,0083 e 0,094 mg/L, respetivamente, sendo capaz de quantificar estes mesmos catiões, a partir de valores superiores a 0,37, 0,021, 0,028 e 0,31 mg/L, respetivamente.

Estes valores alcançados são considerados adequados tendo em conta a legislação que o Decreto-Lei n.º 152/2017<sup>14</sup> e o Decreto-Lei n.º 236/98<sup>145</sup> determinam para águas de consumo humano e águas naturais doces, respetivamente, uma vez que o limite de deteção obtido não excede a percentagem do valor paramétrica requerida, assim como do valor máximo recomendado, para todos os catiões.

No entanto, o valor do padrão mais baixo escolhido para a curva de calibração foi ajustado, uma vez que não só cumpria os requisitos especificados na legislação acima mencionada, como também permitia minimizar a incerteza na preparação dos padrões, através da retirada de um volume da solução stock mais considerável. Para além disso, o equipamento não apresenta a devida capacidade para obter resultados devidamente fidedignos em limites tão baixos como os representados na **Tabela 21**.

Como tal, foi implementado o procedimento alternativo que permite a confirmação, por parte dos laboratórios, da solução padrão de concentração mais baixa da curva de calibração ( $\text{Na}^+$  – 2,000 mg/L;  $\text{NH}_4^+$  – 0,02498 mg/L;  $\text{Mg}^{2+}$  – 0,1968 mg/L;  $\text{Ca}^{2+}$  – 1,0000 mg/L), como limiar analítico de quantificação. Assim, procedeu-se à avaliação dos resultados obtidos da análise de vinte réplicas independentes da solução de concentração mais baixa, para cada catião (**Tabela G2**).

Mediante os resultados obtidos, procedeu-se à determinação da média, do desvio padrão, do coeficiente de variação (**CV**) e do erro relativo (**Er**), apresentados na **Tabela 22**, tendo em vista a confirmação do LQ do método.

**Tabela 22.** Parâmetros determinados através da análise de vinte réplicas independentes do padrão de menor concentração da curva de calibração, nomeadamente, a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o erro relativo.

	$\text{Na}^+$	$\text{NH}_4^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$
$\bar{C}$ (mg/L)	1,962	0,0241	0,2066	1,014
s (mg/L)	0,042	0,0019	0,0048	0,045
CV (%)	2,1	7,9	2,3	4,5
Er (%)	-0,019	0,036	0,033	0,014

A partir da análise dos resultados apresentados na **Tabela 22**, verifica-se o cumprimento do critério especificado pelo laboratório, pois tanto o erro relativo (**Er**), como o coeficiente de variação (**CV**) obtidos, encontram-se abaixo do critério estabelecido de 10 %, em condições de precisão intermédia, para cada catião. Assim, pode concluir-se que o padrão de concentração mais baixa utilizado para o traçado da curva de calibração, para cada catião, é o limite de quantificação exequível para o método de determinação de catiões.

## 5.7 Precisão

A precisão foi avaliada sob duas condições específicas: a repetibilidade e a precisão intermédia de forma a aferir o grau de concordância entre os valores obtidos. A avaliação da precisão em condições de reprodutibilidade não foi realizada pois envolve a realização de ensaios em laboratórios diferentes.

### 5.7.1 Repetibilidade

A avaliação da precisão em condições de repetibilidade foi efetuada, para cada catião, através da análise, no mesmo dia de dez soluções independentes dos padrões de menor e maior concentração da reta de calibração, que correspondem respetivamente, ao limite de quantificação e ao limite de aplicabilidade. Os resultados obtidos para cada catião, com o intuito de avaliar a repetibilidade do método encontram-se exibidos na **Tabela H1**.

A partir dos resultados obtidos apresentados na **Tabela H1** foi possível o cálculo dos parâmetros que definem a repetibilidade do método, tais como, o limite de repetibilidade (**r**), o desvio padrão (**s**), o coeficiente de variação (**CV**) e o erro relativo (**Er**), exibidos na **Tabela 23**, para cada catião.

**Tabela 23.** Resultados obtidos dos parâmetros de avaliação da precisão, em condições de repetibilidade.

	Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>		Ca <sup>2+</sup>	
Padrão (mg/L)	2,000	20,000	0,02498	0,4995	0,1968	1,968	1,0000	10,000
$\bar{C}$ (mg/L)	2,110	20,073	0,0235	0,4996	0,1998	1,9940	0,998	10,03
s (mg/L)	0,098	0,048	0,0018	0,0055	0,0045	0,0062	0,065	0,18
r (mg/L)	0,28	0,13	0,0051	0,015	0,013	0,017	0,18	0,51
CV (%)	4,7	0,24	7,8	1,1	2,3	0,31	6,5	1,8
Er (%)	0,055	0,0036	-0,059	-0,00081	-0,0010	-0,0030	-0,0017	0,0028

De acordo com a análise dos resultados obtidos na **Tabela 23**, verifica-se que o método apresenta, para todos os catiões, um erro relativo e um coeficiente de variação bastante reduzidos nos padrões analisados, cumprindo de forma satisfatória com o critério especificado pelo laboratório de 10 %. Ademais, conclui-se que o coeficiente de variação da precisão em concentrações menores é superior à observada nas concentrações superiores, estando de acordo com o previsto.

No que diz respeito ao limite de repetibilidade, este indica o valor limite, com uma probabilidade de 95 %, abaixo do qual se deve situar a diferença entre dois resultados obtidos, em condições de repetibilidade,

em ensaios independentes. Assim, em medições efetuadas no mesmo dia, a diferença entre dois duplicados deverá ser inferior a 0,28 e 0,13 mg/L para os padrões de 2,000 e 20,000 mg/L de ião sódio. No caso do ião amónio, os duplicados dos padrões 0,02498 e 0,4995 mg/L não deverão apresentar diferenças superiores a 0,0051 e 0,015 mg/L, respetivamente. Em duplicados relativos ao ião magnésio de concentração 0,1968 e 1,968 mg/L a diferença deverá ser inferior a 0,013 e 0,017 mg/L, respetivamente. Por fim, num curto espaço de tempo, a diferença entre duplicados do padrão mais diluído e mais concentrado do ião cálcio de 1,0000 e 10,000 mg/L terá que ser inferior a 0,18 e 0,51 mg/L, respetivamente.

### 5.7.2 Precisão Intermédia

A avaliação da precisão em condições de precisão intermédia foi efetuada através da análise de dez soluções independentes, em dias diferentes, para 3 níveis de concentração díspares, correspondentes ao padrão no limite de quantificação, ao da padrão que se situa no centro e ao padrão mais alto da curva de calibração, para cada um dos catiões de interesse. As **Tabela I1, I2 e I3**, apresentam os dados obtidos para a determinação da precisão intermédia de três conjuntos de dez análises independentes, para cada um dos três níveis de concentração da curva de calibração, para cada catião.

A partir dos resultados obtidos em termos de concentração, ao longo do tempo, procedeu-se ao cálculo da média, do desvio padrão (**s**), do limite de repetibilidade (**r**), do coeficiente de variação (**CV**) e do erro relativo (**Er**), exibidos na **Tabela 24**, para o catião sódio, com o intuito de avaliar o desempenho do método em termos de precisão, em condições de precisão intermédia.

**Tabela 24.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para três níveis de concentração, ao longo do tempo, tendo em vista a determinação da precisão intermédia do método para o catião sódio.

	Na <sup>+</sup>								
	2,000			10,000			20,000		
	12/04	28/04	12/04	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
$\bar{C}$ (mg/L)	1,978	1,975	2,048	9,98	9,888	10,023	19,831	19,712	19,788
<b>s</b> (mg/L)	0,039	0,049	0,038	0,11	0,076	0,084	0,20	0,12	0,044
<b>r</b> (mg/L)	0,11	0,14	0,11	0,32	0,21	0,24	0,55	0,34	0,12
<b>CV (%)</b>	1,9	2,5	1,9	1,1	0,76	0,84	1,0	0,6	0,2
<b>Er (%)</b>	-0,011	-0,012	0,024	-0,0019	-0,011	0,0023	-0,0085	-0,014	-0,011

Através da análise da **Tabela 24**, é possível aferir o cumprimento de forma satisfatória do critério especificado pelo laboratório para a precisão, pois os valores obtidos de coeficiente de variação e erro relativo encontram-se abaixo dos 10 % requeridos, para todos os níveis de concentração avaliados. Ademais verifica-se uma diminuição dos valores do coeficiente de variação em função do aumento de concentração, o que seria de esperar.

À semelhança do processo efetuado para o catião sódio, procedeu-se ao cálculo dos parâmetros representados na **Tabela 25**, que permitem a avaliação do desempenho do método em termos de precisão, em condições de precisão intermédia, para o catião amónio.

**Tabela 25.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para cada nível de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o catião amónio.

	$\text{NH}_4^+$								
	0,02498			0,2498			0,4995		
	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
$\bar{C}$ (mg/L)	0,0256	0,0243	0,0277	0,2513	0,2522	0,2602	0,4882	0,5045	0,4959
s (mg/L)	0,0021	0,0021	0,0018	0,0096	0,0059	0,0099	0,0069	0,0073	0,0058
r (mg/L)	0,0058	0,0058	0,0051	0,027	0,017	0,028	0,019	0,020	0,016
CV (%)	8,0	8,5	6,6	3,8	2,4	3,8	1,4	1,4	1,2
Er (%)	0,026	-0,030	0,11	0,0053	0,0087	0,041	-0,024	0,0090	-0,0082

A partir da análise da **Tabela 25**, verifica-se novamente que os valores obtidos de coeficiente de variação e erro relativo encontram-se abaixo dos 10 % requeridos, cumprindo com o critério estabelecido pelo laboratório, para cada um dos níveis de concentração. Além disto, verifica-se a tendência esperada de diminuição da variação em função do aumento de concentração.

A **Tabela 26** demonstra os parâmetros determinados para a determinação da precisão do método em condições de precisão intermédia, para o catião magnésio.

Mediante a análise da **Tabela 26** é possível apurar novamente o cumprimento dos valores de coeficiente de variação e erro relativo face ao especificado pelo laboratório, assim como a tendência decrescente dos valores de CV em função do aumento da concentração.

**Tabela 26.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para três níveis de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o catião magnésio.

	$Mg^{2+}$								
	0,1968			0,9840			1,968		
	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
$\bar{C}$ (mg/L)	0,2017	0,2000	0,1965	1,000	1,019	0,9929	2,019	1,988	1,996
$s$ (mg/L)	0,0051	0,0052	0,0038	0,029	0,030	0,0091	0,034	0,025	0,011
$r$ (mg/L)	0,014	0,014	0,011	0,082	0,083	0,025	0,094	0,069	0,031
CV (%)	2,6	2,6	2,0	2,9	2,9	0,92	1,7	1,2	0,6
Er (%)	0,0083	0,000069	-0,017	-0,00050	0,019	-0,0071	0,0093	-0,0061	-0,0022

Por fim, da mesma forma que os catiões anteriores, foi avaliada a precisão do método em condições de precisão intermédia para o catião cálcio, com recurso aos parâmetros apresentados na **Tabela 27**.

**Tabela 27.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, para cada nível de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o catião cálcio.

	$Ca^{2+}$								
	1,0000			5,000			10,000		
	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
$\bar{C}$ (mg/L)	1,07	0,990	0,944	4,89	4,946	5,036	9,688	9,970	10,025
$s$ (mg/L)	0,10	0,055	0,061	0,11	0,064	0,092	0,22	0,12	0,20
$r$ (mg/L)	0,28	0,15	0,17	0,30	0,18	0,26	0,62	0,34	0,56
CV (%)	9,4	5,5	6,5	2,2	1,3	1,8	2,3	1,2	2,0
Er (%)	0,066	-0,010	-0,056	-0,022	-0,011	0,0072	-0,031	-0,0030	0,0025

Através da análise da **Tabela 27**, sucede-se novamente valores extremamente reduzidos de erro relativo, bem como de coeficiente de variação, para todos os níveis de concentração, permitindo cumprir de forma satisfatória o critério estabelecido pelo laboratório, assim como a verificação da redução do valor do CV à medida que o nível de concentração sobe.

O valor de precisão intermédia foi determinado recorrendo à ferramenta estatística da análise de variâncias (ANOVA) unifatorial.<sup>42</sup> Cada um dos três grupos de dez soluções independentes foi avaliado

em condições de repetibilidade dentro do grupo, no mesmo dia e em condições de precisão intermédia entre grupos, efetuados em dias diferentes, para cada catião.

Assim, na **Tabela 28** encontram-se os resultados do padrão de concentração correspondente ao limite de quantificação, para cada catião, dos parâmetros obtidos no ensaio estatístico da ANOVA unifatorial, especificamente, o desvio padrão de repetibilidade ( $s_r$ ), calculado a partir da **equação 29**, o desvio padrão “entre-grupos” ( $s_{between}$ )(**Equação 30**), o desvio padrão de precisão intermédio ( $s_i$ ), determinado pela combinação dos dois anteriores, através da **equação 31**, assim como o limite de precisão intermédia ( $r$ ), e o coeficiente de variação de repetibilidade ( $CV_r$ ) e de precisão intermédia ( $CV_i$ ), para cada catião.

**Tabela 28.** Resultados obtidos da precisão em condições de repetibilidade ( $CV_r$ ) e de precisão intermédia ( $CV_i$ ) do padrão referente ao limite de quantificação, para cada catião recorrendo à ANOVA.

	$MQ_v$ (mg/L)	$s_r$ (mg/L)	$MQ_b$ (mg/L)	$s_{between}$ (mg/L)	$s_i$ (mg/L)	$r$ (mg/L)	$CV_r$ (%)	$CV_i$ (%)
<b>Na<sup>+</sup></b> <b>2,000</b> <b>(mg/L)</b>	0,0018	0,042	0,017	0,039	0,058	0,16	2,1	2,9
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> <b>0,02498</b> <b>(mg/L)</b>	0,0000040	0,0020	0,000031	0,0016	0,0026	0,0072	7,7	9,9
<b>Mg<sup>2+</sup></b> <b>0,1968</b> <b>(mg/L)</b>	0,000023	0,0048	0,000069	0,057	0,0052	0,015	2,4	2,6
<b>Ca<sup>2+</sup></b> <b>1,0000</b> <b>(mg/L)</b>	0,0056	0,075	0,038	0,057	0,094	0,26	7,5	9,4

Mediante a análise dos resultados obtidos na **Tabela 28**, verifica-se primeiramente, que os valores de precisão intermédia obtidos para o padrão de menor concentração da curva de calibração referentes aos iões sódio, amónio, magnésio e cálcio foram 0,058, 0,0026, 0,0052 e 0,094 mg/L, respetivamente.

Foi também possível a obtenção dos valores de precisão em condições de repetibilidade, 0,042, 0,0020, 0,0048 e 0,075 mg/L, respetivamente, correspondendo aos valores obtidos referentes aos três conjuntos de análises realizados em dias diferentes e que demonstram a concordância entre os valores do desvio padrão de repetibilidade apresentados nas **Tabelas 23 a 27** e os obtidos na análise estatística efetuada.

Simultaneamente, foi determinado o valor limite de precisão intermédia, permitindo aferir o valor máximo permitido de diferença entre duas réplicas do padrão de menor concentração obtidas, para cada catião, independentemente do tempo que decorra entre leituras. Assim, a diferença entre dois valores obtidos,

através da análise do padrão de menor concentração da curva de calibração, para os iões sódio, amónio, magnésio e cálcio deverá ser inferior a 0,16, 0,0072, 0,015 e 0,26 mg/L, respetivamente.

Os valores de coeficiente de variação de repetibilidade encontram-se também em conformidade com os resultados obtidos na avaliação individual da repetibilidade (**Tabela 23**). A caracterização da precisão em condições de repetibilidade a partir do coeficiente de variação deve ser efetuada, para cada catião, segundo o maior valor obtido para este parâmetro. Assim, o CV<sub>r</sub> considerado para o padrão de menor concentração para os catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio é , 4,7 %, 7,8 %, 2,4 % e 7,5%, respetivamente.

Por conseguinte, de acordo com os valores obtidos para os coeficientes de variação de repetibilidade e de precisão intermédia, é possível concluir que o método de determinação dos catiões é preciso em condições de precisão intermédia para o padrão de menor concentração, uma vez que estes se encontram abaixo dos 10 % definidos pelo laboratório.

A precisão intermédia do padrão de concentração intermédia da curva de calibração foi novamente determinada recorrendo à ferramenta estatística de análise de variâncias (ANOVA) de um fator.<sup>42</sup> Assim, na **Tabela 29** encontram-se os dados obtidos para a determinação da precisão em condições de precisão intermédia através da determinação dos parâmetros obtidos recorrendo à ANOVA unifatorial, à semelhança do processo apresentado na **Tabela 28**.

**Tabela 29.** Resultados dos parâmetros obtidos na ANOVA univariada efetuada para a determinação da precisão intermédia do padrão de concentração intermédia da curva de calibração, para cada catião.

	MQ <sub>r</sub> (mg/L)	S <sub>r</sub> (mg/L)	MQ <sub>b</sub> (mg/L)	S <sub>between</sub> (mg/L)	S <sub>t</sub> (mg/L)	r (mg/L)	CV <sub>r</sub> (%)	CV <sub>t</sub> (%)
Na <sup>+</sup> 10,000 (mg/L)	0,0085	0,092	0,048	0,063	0,11	0,31	0,93	1,1
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0,2498 (mg/L)	0,000075	0,0087	0,00024	0,0041	0,0096	0,027	3,4	3,8
Mg <sup>2+</sup> 0,9840 (mg/L)	0,00061	0,025	0,0038	0,018	0,030	0,085	2,5	3,0
Ca <sup>2+</sup> 5,000 (mg/L)	0,0080	0,089	0,054	0,068	0,11	0,31	1,8	2,3



De acordo com a análise da **Tabela 29** é possível aferir o valor de precisão intermédia estimado a partir da ANOVA, para o padrão de concentração intermédia da curva de calibração, referente aos iões sódio, amónio, magnésio e cálcio, tendo sido obtido 0,11, 0,0096, 0,030 e 0,11 mg/L, respetivamente.

Simultaneamente, a precisão em condições de repetibilidade foi também determinada, tendo sido obtido os valores 0,092, 0,0087, 0,025 e 0,089 mg/L, que reflete os valores obtidos nos três conjuntos de análises realizados em dias diferentes, para os iões acima mencionados, respetivamente. Tal como no padrão de menor concentração, verifica-se que o valor obtido para o desvio padrão de repetibilidade não difere significativamente do valor especificado nas **Tabelas 24 a 27**.

O valor do limite de precisão intermédia obtido para cada um dos catiões foi, 0,31, 0,027, 0,085 e 0,31 mg/L, respetivamente, indicando que a diferença entre dois valores obtidos, para o padrão de concentração intermédia, não deverá ser superior a estes valores, para cada catião, independentemente do tempo que decorra entre leituras.

Os valores de CV<sub>r</sub> obtidos do padrão de concentração intermédia para os catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio encontram-se em conformidade com os resultados obtidos nas **Tabelas 24 a 27**. Posto isto, é possível concluir que o método de determinação de catiões é preciso, em condições de precisão intermédia, para o padrão de concentração intermédia, pois tanto os valores do coeficiente de variação de repetibilidade (CV<sub>r</sub>) como os valores do coeficiente de variação de precisão intermédia (CV<sub>i</sub>) obtidos, para todos os catiões, encontram-se abaixo dos 10 % definidos pelo laboratório.

**Tabela 30.** Resultados dos parâmetros obtidos na ANOVA univariada efetuada para a determinação da precisão intermédia do padrão de maior concentração da curva de calibração, para cada catião.

	MQ <sub>w</sub> (mg/L)	S <sub>r</sub> (mg/L)	MQ <sub>b</sub> (mg/L)	S <sub>between</sub> (mg/L)	S <sub>i</sub> (mg/L)	r (mg/L)	CV <sub>r</sub> (%)	CV <sub>i</sub> (%)
Na <sup>+</sup> 20,000 (mg/L)	0,018	0,14	0,036	0,042	0,14	0,40	0,69	0,72
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> 0,4995 (mg/L)	0,000045	0,0067	0,00066	0,0079	0,010	0,029	1,3	2,1
Mg <sup>2+</sup> 1,968 (mg/L)	0,00062	0,025	0,0026	0,014	0,029	0,080	1,2	1,4
Ca <sup>2+</sup> 10,000 (mg/L)	0,035	0,19	0,33	0,17	0,25	0,71	1,9	2,6

Seguidamente procedeu-se à utilização da ANOVA de um fator para a determinação da precisão intermédia do padrão de concentração correspondente ao limite de aplicabilidade da curva de calibração. Na **Tabela 30** encontram-se os valores obtidos através da ANOVA univariada.

Os valores de precisão intermédia obtidos por intermédio da ANOVA, para os iões sódio, amónio, magnésio e cálcio foram 0,14, 0,010, 0,029 e 0,25 mg/L, respetivamente. O valor de precisão em condições de repetibilidade obtido, para os catiões referidos, foi respetivamente, 0,14, 0,0067, 0,025 e 0,19 mg/L, que reflete os valores obtidos nos três conjuntos de análises realizados em dias diferentes. Mais uma vez, não há diferenças significativas entre o valor de precisão em condições de repetibilidade apresentada nas **Tabelas 23 a 27** e o obtido pela ANOVA.

O limite de precisão intermédia obtido para cada um dos catiões é de 0,40, 0,029, 0,080 e 0,71 mg/L, respetivamente, o que indica que a diferença entre dois valores obtidos, para o padrão de maior concentração da curva de calibração, deverá ser inferior a estes valores, para cada catião, independentemente do tempo que decorra entre leituras.

Os valores de CV<sub>r</sub> obtidos do padrão de maior concentração para os catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio foram 0,69 %, 1,3 %, 1,2 % e 1,9 %, respetivamente, encontrando-se em conformidade com os resultados obtidos na avaliação individual da repetibilidade (**Tabela 23**). Assim sendo, conclui-se que o método de determinação de catiões é preciso, em condições de precisão intermédia, para o padrão de maior concentração, pois tanto os valores do coeficiente de variação de repetibilidade (**CV<sub>r</sub>**) como os valores do coeficiente de variação de precisão intermédia (**CV<sub>i</sub>**) obtidos, para todos os catiões, encontram-se bastante abaixo dos 10 % especificados pelo laboratório, cumprindo este critério de forma satisfatória.

O estudo efetuado permitiu verificar a tendência de diminuição do coeficiente de variação à medida que a concentração dos padrões aumenta, o que seria de esperar. Assim, o padrão de maior concentração apresenta o menor valor de coeficiente de variação, o padrão de menor concentração apresenta o maior valor de coeficiente de variação e o padrão de concentração intermédia apresenta um valor intermédio entre os dois anteriores. Todos os coeficientes de variação obtidos encontram-se abaixo dos 10 % especificados no laboratório.

## 5.8 Justeza

A avaliação quantitativa da justeza pode ser efetuada de diversas formas, tal como foi exposto no capítulo 3.8, tais como, a utilização de materiais de referência certificados, MCR, a realização de ensaios de recuperação, ER, ou através da participação em ensaios Interlaboratoriais, EIL.

Neste trabalho a justeza foi avaliada com recurso às três formas distintas de análise acima mencionadas. Para o estudo da exatidão do método relativamente aos iões sódio, magnésio e cálcio foram utilizados materiais de referência certificados, enquanto no caso do ião amónio foram realizados ensaios de recuperação, uma vez que, durante o período da Dissertação não foi possível a utilização de MRC para o ião amónio pois o laboratório não tem por prática utilizar MRC para este parâmetro. Além disto, foi possível a participação num ensaio Interlaboratorial envolvendo todos os catiões, com exceção do catião amónio, pois não fazia parte do grupo de catiões submetidos ao EIL.

A avaliação da justeza pela utilização de materiais de referência certificados foi efetuada através da análise de um MRC da marca *SCP Science (Lot:S160218026)* contendo os três catiões de interesse acima mencionados. Para isso, foi realizada uma diluição de 1,00 mL do MRC num volume de 100,00 mL seguida de uma diluição posterior de 10,00 mL da solução anterior num volume de 50,00 mL, de forma a que a concentração dos iões magnésio e cálcio presentes no MRC estivessem dentro da gama de concentração definida. No caso do ião sódio não foi necessário proceder-se à segunda diluição. Foram efetuadas doze réplicas independentes do material de referência. A **Tabela 31** exhibe os valores dos parâmetros determinados através da avaliação da exatidão pelo material de referência certificado, especificamente, a média ( $\bar{C}$ ), o desvio padrão ( $s$ ), o *bias* relativo ( $b$ ), o *Z-score*, o erro normalizado ( $E_n$ ) e o valor do teste  $t$ .

**Tabela 31.** Resultados obtidos através da análise de um MRC, com o intuito de avaliar a exatidão do método de determinação dos catiões.

	$C_{mrc} \pm U_{mrc}$ (mg/L)	$\bar{C}$ (mg/L)	$s$ (mg/L)	$b$ (%)	<i>Z-score</i>	$E_n$	$t$
<b>Na<sup>+</sup></b>	7,54 ± 0,09	7,59	0,12	0,0061	0,51	0,15	1,330
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	3,79 ± 0,05	3,804	0,047	0,0037	0,28	0,12	1,042
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	11,6 ± 0,2	11,79	0,57	0,017	0,96	0,13	1,166

A partir da análise da **Tabela 31** é possível verificar primeiramente, que os valores obtidos do *bias* relativo são extremamente reduzidos para todos os catiões, cumprindo de forma satisfatória o critério usualmente utilizado que requer valores de  $b < 5\%$ . Em relação aos resultados do *Z-score* é possível aferir o desempenho satisfatório do método para todos os catiões uma vez que todos os valores obtidos em módulo encontram-se abaixo do valor 2. O erro normalizado é inferior a 1 em módulo, o que corrobora mais uma vez o desempenho aceitável do método em termos de exatidão, para todos os catiões.

Por fim, foi efetuado um teste de hipóteses t de forma a avaliar a presença de diferenças significativas entre os valores obtidos no laboratório e o valor de referência. Como todos os valores do teste t obtidos apresentam-se abaixo do valor tabelado (2,201), é possível inferir que não existem diferenças significativas entre os resultados obtidos em laboratório e o valor de referência do MRC. Assim, conclui-se que o método apresenta um ótimo desempenho, para os cátions sódio, magnésio e cálcio, em termos de exatidão.

A determinação da veracidade do método para os íons sódio, magnésio e cálcio foi também executada com recurso à participação em ensaios Interlaboratoriais, especificamente, ensaios de aptidão, demonstrando o desempenho do método para este parâmetro e permitindo comparar os ensaios efetuados com outros laboratórios. A **Tabela 32** apresenta os resultados obtidos para o ensaio de aptidão da AQUACHECK, tendo sido representados os valores de justeza quantitativamente sob a forma de erro relativo e *Z-score* para cada um dos cátions analisados.

**Tabela 32.** Resultados obtidos no ensaio Interlaboratorial da AQUACHECK efetuado, para os íons sódio, magnésio e cálcio.

	$C_{\text{ex}}$ (mg/L)	$\bar{C}$ (mg/L)	b (%)	<i>Z-score</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	54,51	56,08	0,029	0,38
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	36,97	37,76	0,021	0,28
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	74,93	76,00	0,014	0,19

Como a amostra do ensaio de aptidão apresentava uma concentração acima do limite de aplicabilidade do método, foi efetuada uma diluição 1:20, neste caso, 5,00 mL da amostra num volume de 100,00 mL. Através da **Tabela 32** é possível aferir o excelente desempenho do método, não só pelos reduzidos valores de erro relativo, como também, pelos valores obtidos de *Z-score*, inferiores a 2 em módulo, para todos os cátions, de acordo com o Guia ISO/CEI 43<sup>127</sup> e o Guia Relacre n<sup>o</sup>3<sup>103</sup>. Estes resultados permitiram concluir também que a magnitude da ordenada na origem da reta para os íons sódio e cálcio não interferem na exatidão do método de análise demonstrando que apesar da ordenada na origem não incluir o ponto (0,0), os valores obtidos no ensaio interlaboratorial traduzem o excelente desempenho do método e do laboratório.

De forma a avaliar a exatidão do método para o íão amónio procedeu-se à realização de ensaios de recuperação, a partir da fortificação de seis amostras reais pela adição de 1,25 mL da solução mãe (10,1 mg/L) e perfazendo com amostra num volume de 50 mL. Na **Tabela 33** encontram-se os resultados dos parâmetros obtidos através dos ensaios de recuperação efetuados, nomeadamente, a taxa de recuperação e ainda a justeza, quantitativamente caracterizada pelo erro relativo de acordo com a **equação 33**.

**Tabela 33.** Resultados obtidos nos ensaios de recuperação efetuados de amostras reais fortificadas, para a avaliação da exatidão do método para a determinação do íão amónio.

	Taxa de recuperação (%)	Justeza (%)
$\text{NH}_4^+$	105,5	5,5

O valor da taxa de recuperação para o íão amónio, encontra-se dentro do critério de aceitação ( $100 \pm 10$  %) estabelecido pelo laboratório para este nível de concentração, ou seja, entre 90 % e 110 %. Além do critério de aceitação ser cumprido de forma satisfatória, o valor de justeza em percentagem obtido sob forma de erro relativo situa-se abaixo do valor estipulado de 10 % definido pelo laboratório, permitindo concluir que o método é justo para a determinação do íão amónio.

Assim, é possível concluir que o método apresenta uma boa exatidão, pois os valores obtidos nos ensaios com materiais de referência certificados, em ensaios de recuperação e na participação em ensaios Interlaboratoriais, demonstraram o desempenho satisfatório do método para a avaliação deste parâmetro.

## 5.9 Robustez

A avaliação da robustez do método de determinação de catiões foi executada através da ferramenta mais utilizada para a análise deste parâmetro, o teste de *Youden*, permitindo a avaliação da sensibilidade do método perante pequenas variações nos fatores experimentais de possível influência nos resultados em rotina.

A **Tabela 34** apresenta os parâmetros experimentais a serem testados, e que serviram de análise pela ferramenta de teste da robustez, nomeadamente, a temperatura da coluna, a concentração da fase móvel e o fluxo da fase móvel.

**Tabela 34.** Fatores experimentais testados no teste de *Youden*.

	Fatores experimentais	Nominal (1)	Alternativo (-1)
<b>A</b>	Temperatura da coluna (C°)	40	30
<b>B</b>	Concentração da fase móvel do MSA (mM)	28	24
<b>C</b>	Fluxo da fase móvel (mL/min)	1,0	0,9

A partir dos fatores representados na **Tabela 34** procedeu-se à construção da matriz do teste de *Youden* (**Tabela J1**). Para isso foram realizadas análises em triplicado das soluções padrão de concentração intermédia da curva de calibração, para cada catião, variando as condições de operação de acordo com os fatores expressos na **Tabela 34**. O valor “1” designa-se nominal, pois representa o valor utilizado em rotina, enquanto que “-1” corresponde à variação efetuada no parâmetro experimental designado, e refere-se, portanto, à condição alternativa do método para cada um dos fatores considerados. Deste modo, através do teste de robustez foi possível determinar o valor de concentração obtido em cada um dos ensaios, (**RE**) (**Tabelas J2 e J3**), assim como a influência de cada fator testado, (**R**), apresentado na **Tabela 35**, calculado a partir da **equação 37**, para cada um dos catiões.

**Tabela 35.** Matriz de teste de *Youden* aplicada, para 3 fatores, e respetivos resultados de RE e R, para cada catião.

	A	B	C	
<b>R Na<sup>+</sup></b>	-0,71	0,38	-1,27	C > A > B
<b>R NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	-0,0030	-0,022	-0,013	C > B > A
<b>R Mg<sup>2+</sup></b>	-0,11	-0,065	-0,11	C = A > B
<b>R Ca<sup>2+</sup></b>	-0,42	0,051	-0,38	A > C > B

De acordo com os resultados obtidos é possível aferir que os fatores experimentais de maior influência nos resultados são o fluxo da fase móvel e a temperatura da coluna, sendo, portanto, os parâmetros que deverão ser sujeitos a um controlo mais rigoroso por parte do laboratório, salvaguardando as condições estipuladas para os mesmos durante a aplicação do método.

Em contrapartida, a composição do eluente é a condição menos influente na robustez do método, indicando que pequenas variações na mesma não alteram de forma expressiva os resultados obtidos.

O efeito de cada fator foi avaliado estatisticamente através do cálculo da amplitude admissível recorrendo à **equação 38**, para verificar se as diferenças são significativas. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 36**.

**Tabela 36.** Valores obtidos do teste de t tendo em vista avaliação da significância estatística dos resultados obtidos nas condições.

Fator	Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>		Ca <sup>2+</sup>		t <sub>tabelado</sub>
	$\Delta_{\text{crítico}}$	Efeito <sub>fator</sub>	$\Delta_{\text{crítico}}$	Efeito <sub>fator</sub>	$\Delta_{\text{crítico}}$	Efeito <sub>fator</sub>	$\Delta_{\text{crítico}}$	Efeito <sub>fator</sub>	
<b>A</b>		-0,71		-0,0030		-0,112		-0,417	
<b>B</b>	0,19	0,38	0,028	-0,022	0,054	-0,065	0,093	0,051	4,303
<b>C</b>		-1,27		-0,013		-0,107		-0,376	

Mediante a análise da **Tabela 36** verifica-se que para os catiões sódio e magnésio todas as condições são significativamente influentes para a qualidade dos resultados, uma vez que os valores de cada fator são sempre superiores ao valor de amplitude admissível. Para o catião amónio verifica-se o contrário, ou seja, nenhuma das condições é significativamente influente no rigor dos resultados, pois todos os valores obtidos dos efeitos de cada fator são inferiores ao valor da amplitude admissível determinado. No caso do catião cálcio, apenas o fator B (concentração da fase móvel) não é significativamente influenciador da qualidade dos resultados.

## 5.10 Incerteza de medição

A incerteza de medição do método de determinação de catiões em análise foi efetuada com recurso à norma ISO 11352:2012<sup>46</sup>, de acordo com o procedimento técnico típico utilizado pelo laboratório em rotina.

A abordagem utilizada passou pela recolha dos dados de validação e do controlo da qualidade do método obtidos em ambiente Interlaboratorial. Assim, a incerteza de medição foi estimada combinando as incertezas associadas à precisão, em condições de precisão intermédia (componente dos erros aleatórios) e à veracidade, quantificada pelo *bias* (componente dos erros sistemáticos), determinadas de forma independente.

A quantificação da incerteza associada à precisão foi avaliada para os iões sódio, magnésio e cálcio recorrendo ao MRC (*SCP Science - Lot:S160218026*), previamente utilizado para a avaliação da justeza, através de oito ensaios independentes do mesmo. A **Tabela 37** apresenta os resultados obtidos,

especificamente, a média e o desvio padrão obtidos experimentalmente do MRC ( $U_w$ ), calculado a partir da equação 40, para cada catião.

**Tabela 37.** Resultados obtidos experimentalmente referentes a oito ensaios independentes do MRC para a determinação da componente associada à reprodutibilidade intralaboratorial, para cada catião.

	$C_{mrc} \pm U_{mrc}$ (mg/L)	$\bar{C}$ (mg/L)	$U_w$
$Na^+$	7,54 ± 0,09	7,61	0,13
$Mg^{2+}$	3,79 ± 0,05	3,823	0,038
$Ca^{2+}$	11,6 ± 0,2	11,95	0,21

A partir da análise da Tabela 37 verifica-se que os valores obtidos do desvio padrão experimental, para os iões sódio, magnésio e cálcio, foram 0,17 %, 0,99 % e 1,8 %, respetivamente.

No caso do ião amónio foram efetuadas oito análises independentes de um padrão de controlo de concentração intermédia da curva de calibração, de forma a ser possível a determinação da média e do desvio padrão experimental, apresentado na Tabela 37.

**Tabela 38.** Resultados obtidos experimentalmente referentes a oito ensaios independentes do padrão de concentração intermédia da curva de calibração, tendo em vista a determinação da componente associada à reprodutibilidade intralaboratorial, para o ião amónio.

	$C_{padrão}$ (mg/L)	$\bar{C}$ (mg/L)	$U_w$
$NH_4^+$	0,250	0,255	0,012

O resultado obtido do  $U_{w,rel}$  foi de 4,7 %, para a determinação do ião amónio.

A quantificação da incerteza associada à justeza foi avaliada a partir do material de referência certificado para os iões designados. Assim, a Tabela 39 apresenta os valores obtidos do tratamento de resultados efetuado a partir dos dados representados na Tabela 37, nomeadamente, o *bias* relativo ( $b_{rel}$ ), o desvio padrão ( $s$ ), e a incerteza padrão do MRC ( $u_{Cref}$ ), de forma a determinar, pela equação 41, a componente de incerteza associada ao *bias* do método e laboratório ( $u_b$ ), para os iões sódio, magnésio e cálcio.

De acordo com a Tabela 39 é possível verificar que o valor obtido da componente associada aos erros sistemáticos, para os iões sódio, magnésio e cálcio foi 1,2 %, 1,1 % e 3,2 %, respetivamente.



**Tabela 39.** Resultados obtidos através do MRC da *SCP Science* utilizados de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método, para os catiões designados.

	$b_{rel}$	$S_b$	$U_{Cref,rel}$	$U_{b,rel}$
$Na^+$	0,0089	0,0017	0,0049	0,012
$Mg^{2+}$	0,0086	0,0099	0,0070	0,011
$Ca^{2+}$	0,030	0,018	0,0057	0,032

No que respeita ao ião amónio, a componente do *bias* relativo foi determinada com recurso à realização de seis réplicas independentes dos ensaios de recuperação. Assim, na **Tabela 40** encontram-se representados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação efetuados, especificamente, o somatório do quadrado dos desvios relativamente à recuperação completa ( $\sum b_{i,rel}^2$ ), o valor quadrático médio dos desvios dos ensaios de recuperação ( $b_{rms,rel}$ ), a incerteza do volume adicionado ( $U_v$ ), a incerteza da concentração da solução utilizada para fazer a fortificação ( $U_{conc}$ ), a incerteza da concentração de analito adicionada ( $U_{add}$ ) e a componente de incerteza associada ao *bias* do método e laboratório ( $U_{b,rel}$ ), para o ião amónio, calculada a partir da **equação 45**.

**Tabela 40.** Resultados obtidos através dos seis ensaios de recuperação efetuados de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método, para o ião amónio.

	$\sum b_{i,rel}^2$	$b_{rms,rel}$	$U_v$ (mL)	$U_{conc}$ (mg/L)	$U_{add}$ (mg/L)	$U_{b,rel}$
$NH_4^+$	0,020	0,058	0,0041	0,0041	0,0058	0,058

Mediante a análise da **Tabela 40** verifica-se que o valor obtido para a componente da incerteza associada aos erros sistemáticos foi de 5,8 %.

Como os resultados das componentes associadas aos erros aleatórios e aos erros sistemáticos encontram-se abaixo do valor do critério estabelecido no Decreto-Lei n.º 152/2017<sup>14</sup> e no Decreto-Lei n.º 236/98<sup>145</sup> para todos os catiões, verifica-se que a metodologia efetuada demonstra ser adequada para a estimativa da incerteza.

A partir das incertezas relativas para as componentes associadas aos erros aleatórios e sistemáticos, foi obtida a incerteza combinada relativa ( $U_{c,rel}$ ), a partir da **equação 46**, para cada catião. Posteriormente, ocorreu a conversão em incertezas expandidas ( $U$ ), através do produto das incertezas combinadas

relativas pelo fator de expansão,  $k = 2$  (equação 47), para um nível de confiança de aproximadamente 95 %, de acordo com o descrito no Guia Relacre nº 31<sup>132</sup>, de modo a obter-se o valor final da incerteza do método, apresentado na **Tabela 41**.

**Tabela 41.** Valores obtidos da incerteza combinada e expandida do método, para cada catião.

	$U_{c,rel}$	<b>U</b>
<b>Na<sup>+</sup></b>	0,021	0,042
<b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>	0,074	0,15
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0,015	0,029
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	0,036	0,073

A **Tabela 41** mostra que os valores obtidos para a incerteza combinada do método, para os iões sódio, amónio, magnésio e cálcio, foram respetivamente, 2,1 %, 7,4 %, 1,5 % e 3,6 %. Por sua vez, os resultados obtidos para a incerteza final do método foram respetivamente, 4,2 %, 15 %, 2,9 % e 7,3 %, indicando que os resultados obtidos para todos os catiões que se encontram de acordo com o requisito especificado no Decreto-Lei nº. 152/2017<sup>14</sup> e no Decreto-Lei nº. 236/98<sup>145</sup> e com o critério de aceitação definido pelo laboratório, pois o valor do critério de aceitação é de 15 % para os iões sódio, magnésio e cálcio e 40 % para o ião amónio.

### 5.11 Controlo de qualidade do método

Após o término do processo de validação do método, procedeu-se à implementação do controlo de qualidade no laboratório, avaliado em rotina através da análise de amostras de águas naturais doces superficiais e águas para consumo humano, contendo todos os catiões de interesse, permitindo a monitorização contínua do desempenho analítico em rotina.

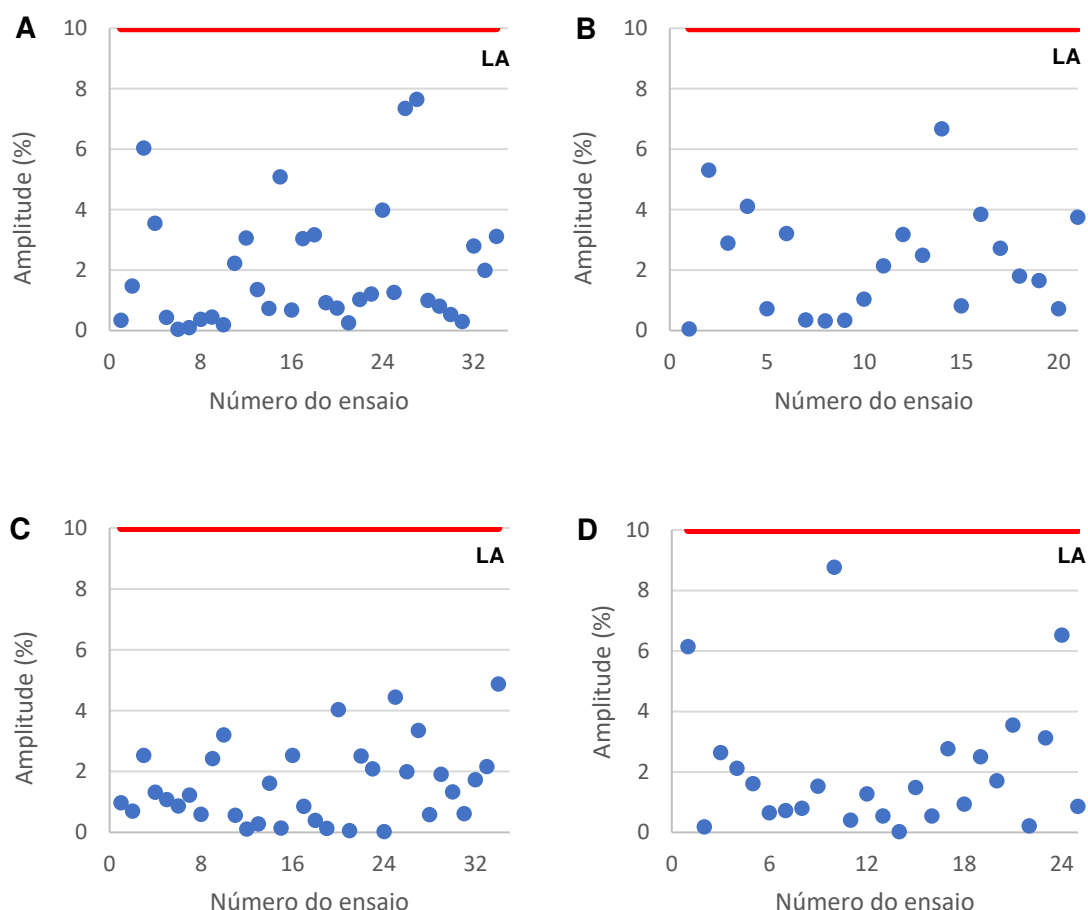
Os critérios estabelecidos para o controlo de qualidade realizado encontram-se especificados na **Tabela 42**.

**Tabela 42.** Metodologia estabelecida pelo laboratório para o controlo de qualidade.

	Duplicado de uma amostra por série de trabalho	Dois padrões extremos por série de trabalho	Curva de calibração
<b>CQ</b>	Carta de aceitação com amplitude relativa de 10 %	Critério de aceitação: $\pm 10$ a 15 % para o padrão mais baixo e $\pm 5$ % para o padrão mais alto	Carta de controlo de indivíduos para declives de $\pm 3s$ em torno do valor médio

### 5.11.1 Controlo de Qualidade Interno

De acordo com os critérios estabelecidos pelo laboratório, apresentados na **Tabela 42**, foi realizado um duplicado de uma amostra, em cada série de dez amostras, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade interno e da precisão dos resultados, mediante uma carta de aceitação cujo limite se encontra nos 10 %, apresentada na **Figura 16**, para os catiões sódio (**Figura 16A**), amónio (**Figura 16B**), magnésio (**Figura 16C**) e cálcio (**Figura 16D**), respetivamente.



**Figura 16.** Cartas de aceitação de duplicados (LA – 10%), tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método para cada catião: A) Na<sup>+</sup>; B) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; C) Mg<sup>2+</sup> e D) Ca<sup>2+</sup>.

A **Figura 16** permite a interpretação da demonstração de controlo obtido pelo método face ao nível de aceitação proposto, pois todas as amplitudes relativas encontram-se abaixo da linha do limite de aceitação considerado de 10 %, para todos os catiões, confirmando assim, que os resultados obtidos são precisos face a este nível de concentração. Adicionalmente, tendo em conta os resultados obtidos relativamente ao ião magnésio (**Figura 16C**), verifica-se que os valores na série de duplicados não ultrapassam os 5 %, o que permite possivelmente no futuro, considerar a redução do nível de aceitação para os 5 %, no caso deste catião.

Posteriormente, dado que a validação do método tinha sido concluída, procedeu-se à construção de cartas de controlo, tendo em conta a implementação de um supervisionamento rigoroso do controlo da qualidade do método (**Tabela 42**). Para isso, foi elaborada uma carta de aceitação, para cada um dos padrões extremos da curva de calibração, mediante um critério de aceitação de  $\pm 10\%$  a  $15\%$  para o padrão mais baixo e  $\pm 5\%$  para o padrão mais alto, para cada catião.

A **Tabela K1** apresenta os valores obtidos das medições do padrão de menor concentração da curva de calibração, utilizado para a construção da carta de controlo de médias com duas réplicas, para cada catião. Seguidamente, foi possível determinar a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o erro relativo, representados na **Tabela 43**.

**Tabela 43.** Resultados dos parâmetros obtidos através da análise do padrão de menor concentração da curva de calibração, utilizado para a construção da carta de controlo.

	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
$\bar{C}$ (mg/L)	2,029	0,0262	0,2105	0,988
s (mg/L)	0,10	0,0037	0,010	0,070
CV (%)	4,9	14,0	4,6	7,0
Er (%)	4,4	12,0	5,9	5,7

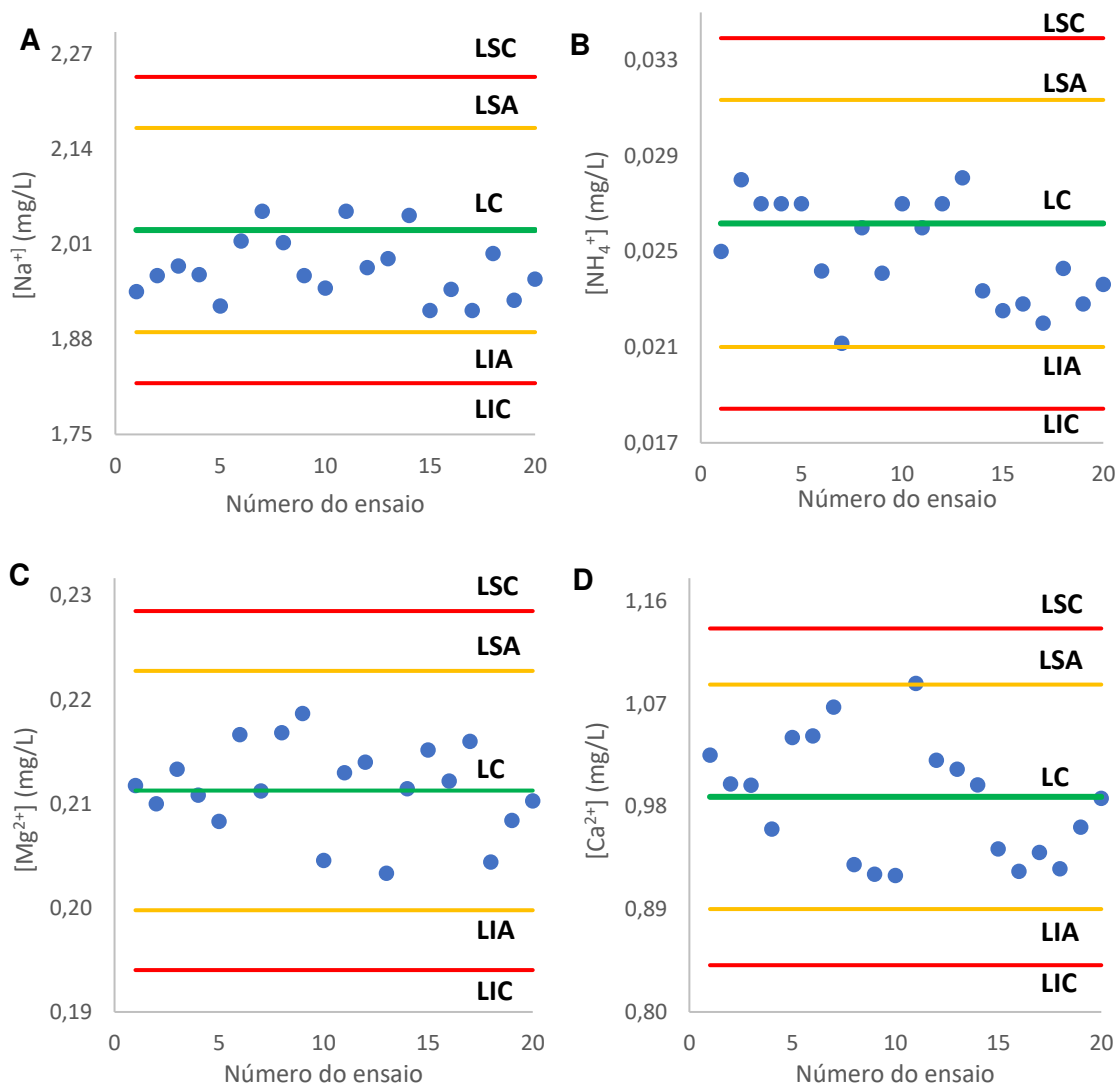
A partir dos resultados obtidos na **Tabela 43** foi possível a construção da carta de controlo de médias com duas réplicas, a partir da definição da linha central (LC) e dos limites de aviso superior (LSA) e inferior (LIA) e controlo superior (LSC) e inferior (LIC), apresentados na **Tabela 44**, determinados segundo as equações 50 e 51.

**Tabela 44.** Valores definidos em termos de concentração (mg/L) para os limites de controlo e de aviso tendo em vista a construção da carta de controlo de médias do padrão de menor concentração da curva de calibração, para cada catião.

	LC	LC	LSA	LIA	LIC
Na <sup>+</sup>	2,03	2,24	2,17	1,89	1,82
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,0262	0,0339	0,0313	0,0210	0,0184
Mg <sup>2+</sup>	0,211	0,231	0,224	0,197	0,190
Ca <sup>2+</sup>	0,99	1,14	1,09	0,89	0,84

Assim, através dos limites determinados foi possível a construção do gráfico apresentado na **Figura 17**, que representa as cartas de controlo de médias obtidas com duas réplicas para o padrão de menor

concentração da curva de calibração (Tabela K2), para os cátions sódio (Figura 17A), amônio (Figura 17B), magnésio (Figura 17C) e cálcio (Figura 17D), respetivamente.



**Figura 17.** Cartas de controlo de médias para o padrão de menor concentração, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para cada cátion: A) Na<sup>+</sup>; B) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; C) Mg<sup>2+</sup> e D) Ca<sup>2+</sup>.

Da análise da **Figura 17** verifica-se que os pontos experimentais obtidos encontram-se dentro dos limites de controlo impostos, indicando assim que o método se encontra sob controlo. No caso do ião cálcio (**Figura 17D**), entre o décimo primeiro ensaio e o décimo sexto ensaio, ocorre uma situação em que se verifica uma tendência decrescente dos resultados observada, sustentada pela existência de seis valores consecutivamente decrescentes, no entanto, é possível aferir que essa tendência veio a alterar-se nos pontos seguintes, não constituindo uma situação fora de controlo. No caso dos outros cátions não se veio a verificar nenhuma situação fora de controlo ou tendência não aleatória.

Assim, como os valores obtidos não ultrapassaram os limites de controlo definidos, é possível concluir que o critério de aceitação de 10 % definido para o padrão de menor concentração relativo aos catiões sódio, magnésio e cálcio e o critério de aceitação de 15 % especificado para o catião amónio, encontram-se bem estipulados.

À semelhança do processo efetuado para o padrão relativo ao limite de quantificação do método, foi também monitorizado o controlo de qualidade do padrão relativo ao limite de aplicabilidade do método, através da construção de cartas de controlo, mediante um critério de aceitação de  $\pm 5\%$ , para cada catião.

A **Tabela K3** apresenta os valores obtidos das medições do padrão de maior concentração da curva de calibração, utilizado para a construção da carta de controlo de médias com duas réplicas, para cada catião. Posteriormente, foi possível determinar a média, o desvio padrão, o coeficiente de variação e o erro relativo, representados na **Tabela 45**.

**Tabela 45.** Resultados dos parâmetros obtidos através da análise do padrão de maior concentração da curva de calibração, utilizado para a construção da carta de controlo.

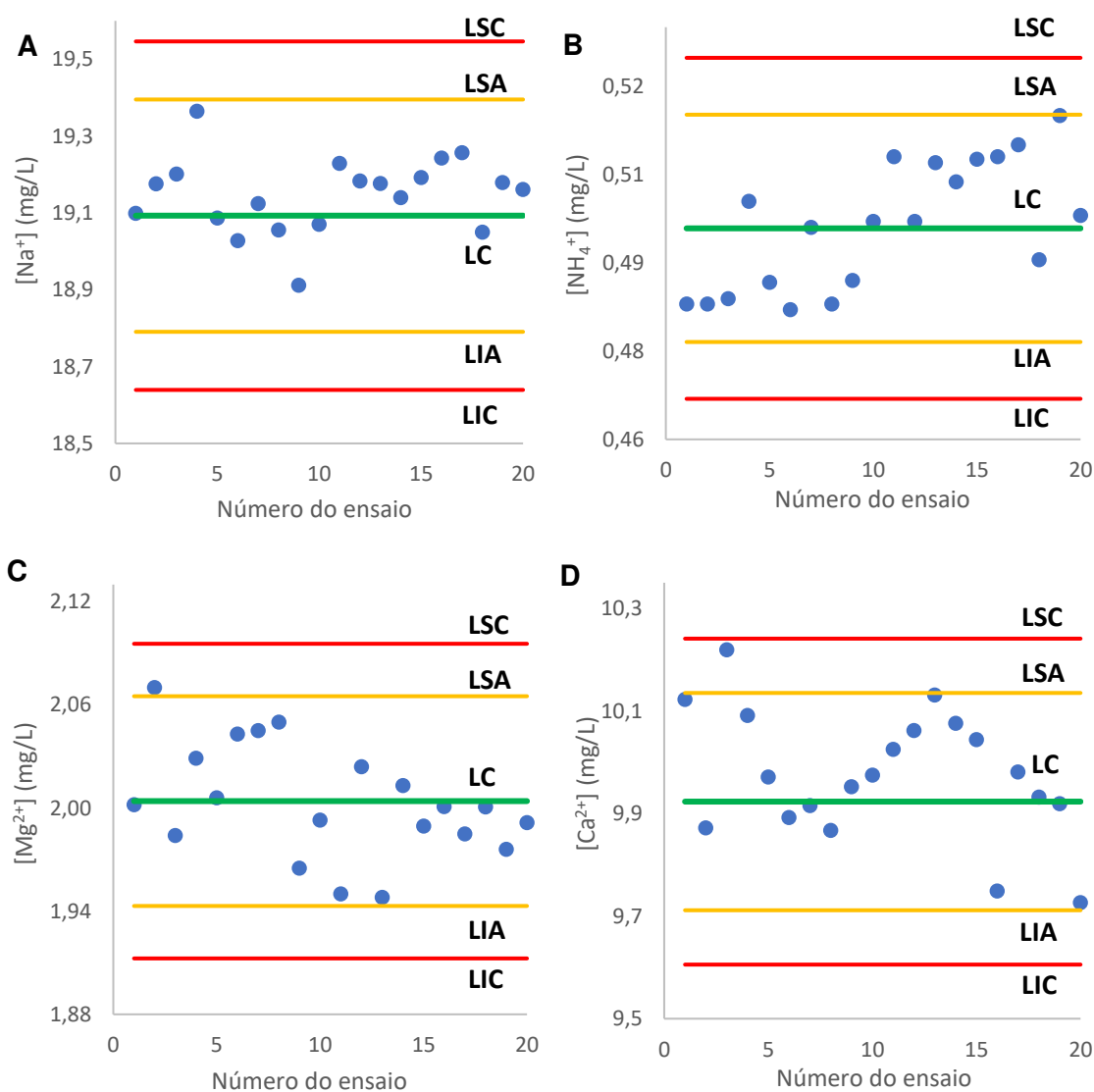
	Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
$\bar{C}$ (mg/L)	19,093	0,496	2,004	9,873
s (mg/L)	0,21	0,0014	0,043	0,15
CV (%)	1,1	2,8	2,2	1,5
Er (%)	4,5	2,4	1,9	1,5

A partir dos resultados obtidos na **Tabela 45** procedeu-se à construção da carta de controlo de médias com duas réplicas, para o padrão de concentração referente ao limite de aplicabilidade do método, a partir da definição da **LC** e dos **LSA, LIA, LSC** e **LIC**, apresentados na **Tabela 46**, determinados segundo as **equações 50** e **51**.

Assim, tal como efetuado relativamente ao padrão de menor concentração, foi possível através dos limites de aviso e controlo determinados, a construção do gráfico apresentado na **Figura 18**, que representa as cartas de controlo de médias obtidas com duas réplicas para o padrão de maior concentração da curva de calibração (**Tabela K4**), para os catiões sódio (**Figura 18A**), amónio (**Figura 18B**), magnésio (**Figura 18C**) e cálcio (**Figura 18D**), respetivamente.

**Tabela 46.** Valores definidos em termos de concentração (mg/L) para os limites de controlo e de aviso tendo em vista a construção da carta de controlo de médias do padrão de maior concentração da curva de calibração, para cada catião.

	LC	LSC	LSA	LIA	LIC
$\text{Na}^+$	19,09	19,55	19,40	18,79	18,64
$\text{NH}_4^+$	0,496	0,525	0,515	0,477	0,467
$\text{Mg}^{2+}$	2,00	2,10	2,07	1,94	1,91
$\text{Ca}^{2+}$	9,87	10,19	10,09	9,66	9,56

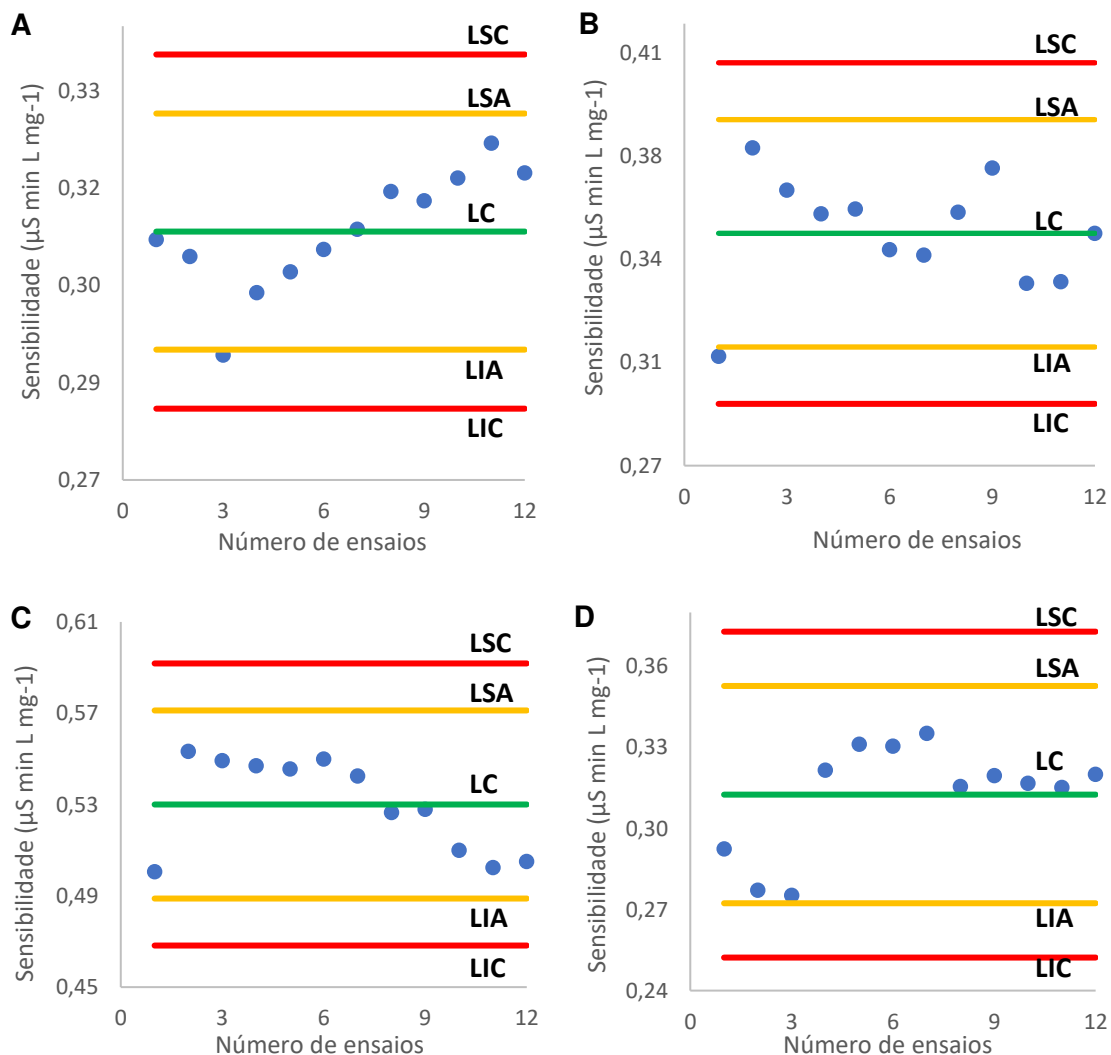


**Figura 18.** Cartas de controlo de médias para o padrão de maior concentração da curva de calibração, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para cada catião: A)  $\text{Na}^+$ ; B)  $\text{NH}_4^+$ ; C)  $\text{Mg}^{2+}$  e D)  $\text{Ca}^{2+}$ .

De acordo com a análise da **Figura 18** verifica-se que todos os pontos experimentais obtidos relativos ao supervisionamento do controlo de qualidade do padrão de maior concentração da curva de calibração

encontram-se dentro dos limites de controlo definidos, indicando assim que o método se encontra sob controlo. Analisando em particular a **Figura 18D** relativa ao catião cálcio, verifica-se que entre o oitavo e o décimo terceiro ensaio existe uma situação de tendência de crescimento em seis valores consecutivos, no entanto, não foi considerada uma situação fora de controlo, uma vez que os pontos seguintes alteraram a tendência instituída. No caso dos outros catiões não se veio a verificar nenhuma situação fora de controlo ou tendência não aleatória.

Assim, como os pontos experimentais obtidos não ultrapassaram os limites de controlo definidos, é possível concluir que o critério de aceitação de 5 % definido para o padrão de maior concentração da curva de calibração, encontra-se bem estipulado.



**Figura 19.** Cartas de controlo de indivíduos para o acompanhamento da curva de calibração, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para cada catião: A) Na<sup>+</sup>; B) NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; C) Mg<sup>2+</sup> e D) Ca<sup>2+</sup>.



A monitorização da curva de calibração foi efetuada a partir da construção de uma carta de controlo para declives de  $\pm 3s$  em torno do valor médio, de acordo com a **Tabela 42**. Esta carta de controlo de indivíduos permite o controlo de pequenas flutuações que possam ocorrer na sensibilidade do método. Assim, a **Figura 19** apresenta as cartas de controlo de indivíduos obtidas para a supervisão da sensibilidade do método, para os catiões sódio (**Figura 19A**), amónio (**Figura 19B**), magnésio (**Figura 19C**) e cálcio (**Figura 19D**), respetivamente.

A partir da análise da **Figura 19**, verifica-se que todos os pontos experimentais encontram-se dentro dos limites de aviso e controlo definidos para o controlo da sensibilidade do método, para todos os catiões. No caso do catião sódio (**Figura 19A**) verifica-se um aumento consecutivo da sensibilidade entre o terceiro e o oitavo ensaio, ainda assim, não se declara como uma situação fora de controlo, uma vez que os pontos seguintes apresentam uma tendência oposta. No caso dos outros catiões não se veio a verificar nenhuma situação fora de controlo ou tendência não aleatória.

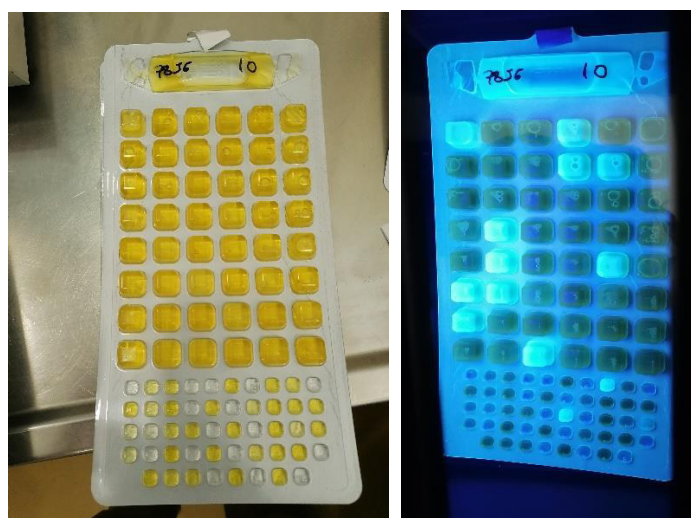
Assim, é possível concluir que o declive do método se encontra sob controlo, uma vez que os pontos experimentais se encontram distribuídos aleatoriamente ao longo do valor alvo.

## 6 Outras atividades desenvolvidas no Laboratório

Obtive formação na área da microbiologia através da metodologia do teste Colilert® que permite a detecção e quantificação de bactérias coliformes totais, bactérias coliformes fecais e bactérias *E. coli*, sendo estes microrganismos frequentemente utilizados como indicadores de contaminação fecal em águas.<sup>146</sup>

O método Colilert® baseia-se na tecnologia de substrato definido - *Defined Substrate Technology*® (DST®), que consiste na incubação das amostras num meio desidratado contendo orto-nitrofenil beta-D-galactopiranosídeo (ONPG) e 4-metilumbeliferil-β-D-glicuronídeo (MUG). As bactérias coliformes utilizam a enzima β-galactosidase para metabolizar o ONPG e alterá-lo de incolor para amarelo e a *E. coli* utiliza β-glucuronidase para metabolizar MUG e criar fluorescência observável recorrendo a uma lâmpada UV.<sup>147,148</sup>

A **Figura 20** apresenta um kit de *Quanti-Tray/2000* do teste Colilert, possuindo as cavidades onde se verifica colorimetricamente a presença ou ausência dos microrganismos referenciados.



**Figura 20.** Kit *Quanti-Tray/2000* do teste Colilert (97 poços). As cavidades a amarelo identificam as bactérias coliformes totais, ao passo que as cavidades fluorescentes demonstram a presença de *E. coli*.<sup>147,148</sup>

Foi ainda possível obter formação na norma NP EN ISO/IEC 17025:2018 tendo em vista o aprofundamento de conhecimentos relativos aos requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração. Além desta, obtive formação acerca das políticas de ambiente, segurança e sistemas de gestão da empresa Águas do Norte, S.A, permitindo a assimilação dos valores, códigos de conduta e gestão praticados pela empresa.

## IV – Conclusão

## 7 Conclusão

Na presente Dissertação, procedeu-se à implementação e validação com sucesso de um método que se encontra fora do âmbito de acreditação da empresa Águas do Norte, de determinação dos catiões sódio, amónio, magnésio e cálcio, baseado na norma ASTM D6919 – 17: *Standard Test Method for Determination of Dissolved Alkali and Alkaline Earth Cations and Ammonium in Water and Wastewater by Ion Chromatography*, aliando a cromatografia iónica com a deteção condutimétrica com supressão, no equipamento *Dionex ICS-1000*.

O processo de implementação e validação do método foi possível através da caracterização dos parâmetros de desempenho analíticos. Iniciou-se com a construção da curva de calibração, para cada catião, a partir de padrões escolhidos tendo em consideração as características do método e as amostras analisadas em rotina. As correlações obtidas foram bastante elevadas, para todos os catiões ( $\text{Na}^+$  0,9999;  $\text{NH}_4^+$  0,9995;  $\text{Mg}^{2+}$  0,99994;  $\text{Ca}^{2+}$  0,999). Isto permitiu a definição da gama de trabalho, que apresentou uma boa linearidade em toda a gama de concentrações testadas, o que é indicador do ajuste linear dos pontos experimentais, para todos os catiões.

O estudo da sensibilidade ao longo do tempo permitiu aferir a estabilidade das curvas de calibração de todos os catiões, uma vez que os valores do coeficiente de variação obtidos ( $\text{Na}^+$  3,0 %;  $\text{NH}_4^+$  5,5 %;  $\text{Mg}^{2+}$  3,9 %;  $\text{Ca}^{2+}$  6,4 %), encontram-se abaixo do critério especificado pelo Laboratório de 10 %.

A seletividade do método foi verificada, para todos os catiões, em ambas as matrizes avaliadas (águas de consumo e água natural doce superficial), pois as taxas de recuperação obtidas nos ensaios de recuperação efetuados cumpriram com o critério de aceitação estabelecido pelo Laboratório de 10 %. As taxas de recuperação encontrando-se até próximas dos 100 %, indicando que o método é capaz de quantificar com exatidão os catiões na presença de interferentes e em diferentes matrizes.

Os limiares analíticos foram determinados tendo em vista a adequação do método para as análises em rotina, para todos os catiões, tendo sido obtidos valores de limite de deteção – LD ( $\text{Na}^+$  0,11 mg/L;  $\text{NH}_4^+$  0,0063 mg/L;  $\text{Mg}^{2+}$  0,0083 mg/L;  $\text{Ca}^{2+}$  0,094 mg/L) e limite de quantificação – LQ ( $\text{Na}^+$  0,37 mg/L;  $\text{NH}_4^+$  0,021 mg/L;  $\text{Mg}^{2+}$  0,028 mg/L;  $\text{Ca}^{2+}$  0,31 mg/L). No entanto, o padrão de menor concentração da curva de calibração de cada catião, foi considerado como LQ, uma vez que, por via da metodologia alternativa de determinação do LQ, verificou-se que o CV obtido se encontra abaixo do critério estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 152/2017 e no Decreto-Lei n.º 236/98 e pelo Laboratório de 10 %, para todos os catiões ( $\text{Na}^+$  3,0 %;  $\text{NH}_4^+$  5,5 %;  $\text{Mg}^{2+}$  3,9 %;  $\text{Ca}^{2+}$  6,4 %).

A determinação da precisão foi executada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, tendo os resultados obtidos demonstrado ser satisfatórios para todos os catiões, em ambas as condições, dado que cumprem o requisito especificado pelo Laboratório de 10 %.

A justeza foi avaliada para os catiões sódio, magnésio e cálcio com recurso a MRC e a ensaios interlaboratoriais, tendo sido obtidos resultados satisfatórios em ambas as metodologias, já que os valores de *Z-score* determinados foram inferiores a dois em módulo, cumprindo com o requisito especificado no Guia ISO/CEI 43 e o Guia Relacre nº3. No caso do catião amónio foram efetuados ensaios de recuperação. Os resultados obtidos, para todos os catiões comprovam o bom desempenho do método em termos de justeza, uma vez que se encontram dentro do critério especificado pelo Laboratório de 10 %.

A avaliação da robustez pelo teste de *Youden* permitiu a identificação da influência dos efeitos dos fatores testados (Temperatura da coluna; Concentração da fase móvel e Fluxo da fase móvel) nos resultados do método. Para os catiões sódio e magnésio todos os fatores são significativamente influentes na qualidade dos resultados, ao passo que para o catião amónio, nenhum dos fatores assume uma influência significativa. No caso do catião cálcio apenas a concentração da fase móvel não é significativamente influente para o rigor dos resultados obtidos.

A incerteza da medição, sob a forma de incerteza expandida, estimada mediante a ISO 11352, através de dados de validação do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial, permitiu demonstrar o cumprimento do requisito especificado no Decreto-Lei nº. 152/2017 e no Decreto-Lei nº. 236/98, assim como o critério de aceitação do Laboratório, uma vez que os valores de incerteza de medição obtidos ( $\text{Na}^+$  4,2 %;  $\text{NH}_4^+$  15 %;  $\text{Mg}^{2+}$  2,9 %;  $\text{Ca}^{2+}$  7,3 %), encontram-se bastante abaixo do critério de aceitação definido de 15 % para os catiões sódio, magnésio e cálcio e de 40 % para o catião amónio.

Após a validação bem sucedida, procedeu-se à avaliação do sistema de controlo de qualidade tendo em vista a garantia da fiabilidade dos resultados durante a análise em rotina dos parâmetros em questão. Assim, através da monitorização do controlo de qualidade interno foi possível a confirmação de que o processo se encontra sob controlo, dado que nenhum dos resultados obtidos na análise dos padrões de controlo escolhidos, excedeu os critérios de aceitação estabelecidos pelo Laboratório.

Durante o estágio na empresa Águas do Norte, foi ainda possível obter formação na metodologia de quantificação de bactérias coliformes e *E-coli* utilizada pelo Laboratório (Teste Colilert®), assim como na norma NP EN ISO/IEC 17025:2018.

A Dissertação realizada no âmbito do segundo ano do Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química permitiu colocar em prática os conhecimentos e competências adquiridas ao longo do primeiro ano e o desenvolvimento do espírito crítico necessário para a análise dos resultados e deteção de problemas, possibilitando a ultrapassagem dos demais obstáculos que invariavelmente foram surgindo em ambiente empresarial. Além de terem sido aprofundadas competências científicas, foi desenvolvida a capacidade de trabalhar em equipa assim como a obtenção de uma maior autonomia no Laboratório.

## V – Bibliografia

1. ADP, S.A, Águas de Portugal. *História*, 2021. Disponível em: <https://www.adp.pt/pt/grupo-adp/historia/?id=7>, acessado a 27/09/2021
2. ADP, S.A, Águas de Portugal. *Onde estamos*, 2021. Disponível em: <https://www.adp.pt/pt/atividade/onde-estamos/?id=27>, acessado a 27/09/2021
3. ADN, S.A, Águas do Norte. *Quem somos*, 2021. Disponível em: <http://www.adnorte.pt/pt/aguas-donorte/quem-somos/?id=5>, acessado a 28/09/2021
4. Diário da República, 1º Série - N° 259 - Decreto-Lei n° 379/93 de 5 de Novembro de 1993
5. Diário da República, 1º Série - N° 132 - Decreto-Lei n° 92/2013 de 11 de Julho de 2013
6. Diário da República, 1º Série - N° 83 - Decreto-Lei n° 41/2010 de 29 de Abril de 2010
7. Diário da República, 1º Série - N° 104 - Decreto-Lei n° 93/2015 de 29 de Maio de 2015
8. Diário da República, 1º Série - N° 23 - Decreto-Lei n° 16/2017 de 1 de Fevereiro de 2017
9. ADP, S.A, Águas de Portugal. *O que fazemos*, 2021. Disponível em: <https://www.adp.pt/pt/atividade/o-que-fazemos/o-ciclo-urbano-da-agua/?id=28>, acessado a 27/09/2021
10. NP EN ISO/IEC 17025:2018. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaios de calibração. 2018
11. IPAC, Guia para a aplicação da NP EN ISO/IEC 17025; OGC001, 2011-03-30
12. EN ISO/IEC 17025:2017. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. 2017
13. ADN, S.A, Águas do Norte. *Laboratório*, 2021. Disponível em: <https://www.adnorte.pt/pt/atividade/laboratorio/?id=58>, acessado a 28/09/2021
14. Diário da República, 1º Série - N° 235 - Decreto-Lei n° 152/2017 de 7 de Dezembro de 2017
15. ERSAR. *O que fazemos*, 2021. Disponível em: <http://www.ersar.pt/pt/o-que-fazemos/controlo-da-qualidade-da-agua>, acessado a 29/09/2021.
16. ADN, S.A, Águas do Norte. *Qualidade da água*, 2021. Disponível em: <https://www.adnorte.pt/pt/atividade/sistema-multimunicipal-do-norte-de-portugal/qualidade-da-agua/?id=105>, acessado a 29/09/2021
17. Patel, A. I., Hecht, C. E., Cradock, A., Edwards, M. A. & Ritchie, L. D. *Drinking Water in the United States: Implications of Water Safety, Access, and Consumption*. Annual Review of Nutrition. 40, 345–373. 2020.
18. Dalmieda, J. & Kruse, P. *Metal cation detection in drinking water*. Sensors. Switzerland. 19, 1–44. 2019.
19. Allon, F. *Water Resources*. International Encyclopedia of Human Geography, 233–240. 2020.



20. Conselho Nacional da Água. *Propriedades da água*, 2021. Disponível em: <https://conselhonacionaldaagua.weebly.com/propriedades-da-aacutegua.html>, acessado a 29/09/2021
21. Martins, R. *Sustentabilidade do Uso de Água em Zonas Urbanas*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho. Braga. 2015
22. USGS, Science for a changing world. *How much water is there on, in and above the Earth? 2021*. Disponível em: <http://water.usgs.gov/edu/earthhowmuch.html>, acessado a 29/09/2021
23. Conselho Nacional da Água. *Água no Planeta Terra*, 2021. Disponível em: <https://conselhonacionaldaagua.weebly.com/aacutegua-no-planeta-terra.html>, acessado a 29/09/2021
24. Valavanidis, A. *"Blue Planet" is Expected to Experience Severe Water Shortages? How climate change and rising temperatures are threatening the global water cycle on Earth*. 2019
25. Kummu, M., de Moel, H., Ward, P. J. & Varis, O. *How close do we live to water? a global analysis of population distance to freshwater bodies*. PLoS One 6(6). 2011.
26. Peter Gleick, Michael Cohen, Heather Cooley, Kristina Donnelly, Julian Fulton, Mai-Lan Ha, Jason Morrison, Rapichan Phurisamban, Heather Rippman, and S. W. *The World's Water, Volume 9*. 2018.
27. Burian, S. J. *et al. Historical Development of Wet-Weather Flow Management*. J. Water Resour. Plan. Manag. 125, 3–13. 1999.
28. World Resources Institute. *Aqueduct Projected Water Stress Country Rankings*, 2021. Disponível em: <https://www.wri.org/data/aqueduct-projected-water-stress-country-rankings>, acessado a 29/09/2021
29. UN Water. *Policy Brief Climate Change and Water*. 1–8. 2019.
30. World Health Organization. *Guidelines for Drinking-water Quality*. 4th Edition. 2017.
31. Arezes, D. & Ramisio, P. J. *Enquadramento estratégico das águas pluviais : a necessidade de uma gestão sustentável*. 2019.
32. Diário da República, 1ª Série - Nº 164 - Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de Agosto de 2007
33. APA, I.P., Agência Portuguesa do Ambiente. *Relatório do Estado do Ambiente Portugal*, 2019. Disponível em: <https://sniambgeoviewer.apambiente.pt/GeoDocs/geoportaldocs/rea/REA2019/REA2019.pdf>, acessado a 29/09/2021
34. Silveira, P. & Vieira, J. *Qualidade da água em reservatórios prediais. Contributos para o PSA da Póvoa do Varzim*. Águas e Resíduos 5, 31–39. 2019.
35. APA. *Programa Nacional para o Uso Eficiente da água*. Lisboa Inst. Super. Agron. 201. 2001.

36. ERSAR. *Relatório de Monitorização do PENSAAR 2020*. PENSAAR 2020 - Uma Nova Estratégia para o Sector de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais. 62. **2017**.
37. Caçador, E. *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho. Braga. **2018**
38. Ribeiro, C. *Validação de métodos analíticos: determinação da turvação e da clorofila a em águas*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho. Braga. **2017**
39. Diário da República, Diretiva 2000/6/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de **2000**
40. Diário da República, 1º Série - Nº 249 - Decreto-Lei nº 58/2005 de 29 de Dezembro de **2005**
41. WHO. *Quality Management System Handbook*. Geneva: World Health Organization. **2011**
42. Silva, C. Apontamentos da Unidade Curricular Amostragem e Preparação de Amostras, Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, 2019/2020
43. RELACRE. *Guia Relacre 28 - Amostragem de águas*. Comissão Técnica Relacre CTR07, Grupo de Trabalho GT3. 01-**2017**. Portugal 978-972-8574-42-0.
44. Recomendação ERSAR n.º 01/2017, Procedimento para a colheita de amostras de água para consumo humano em sistemas de abastecimento. 5. **2017**
45. ISO 5667-1. *Water quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques*. **2020**
46. ISO 5667-3. *Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples*. **2018**
47. ISO 5667-4. *Water quality – Sampling – Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made*. **2016**
48. ISO 5667-5. *Water quality – Sampling – Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems*. **2006**
49. ISO 5667-6. *Water quality - Sampling- Part 6: Guidance on sampling of rivers and streams*. **2014**
50. ISO 5667-10. *Water quality - Sampling - Part 10: Guidance on sampling of waste water*. **2020**
51. ISO 5667-11. *Water quality - Sampling - Part 11: Guidance on sampling of groundwaters*. **2009**
52. Dey, S., Haripavan, N., Basha, S. R. & Babu, G. V. *Removal of ammonia and nitrates from contaminated water by using solid waste bio-adsorbents*. Current Research in Chemical Biology. 1. **2021**.
53. Hollas, D. *et al. Aqueous Solution Chemistry of Ammonium Cation in the Auger Time Window*. Scientific Reports. 7, 1–10. **2017**.
54. Cotruvo J, Bartram J, E. *Calcium and Magnesium in Drinking-water*. World Health Organization. 1–

- 194 . 2009.
55. Meyer, V. *CHROMATOGRAPHY / Principles*. Encyclopedia of Analytical Science: Second Edition. 98–105. 2005.
  56. R. P. W. Scott, *Techniques and Practice of Chromatography*, CRC, vol. 70, No.4. 1995.
  57. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. *Introduction to Analytical Separations*. Fundamentals of Analytical Chemistry. 2014.
  58. Nagy, K., & Vékey, K. *Separation methods*. Medical Applications of Mass Spectrometry. 61–92. 2008
  59. Forgács, E., & Cserhádi, T. *CHROMATOGRAPHY / Principles*. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 1259–1267. 2003.
  60. Hage, D. S. & Matsuda, R. *Affinity chromatography: A historical perspective*. Methods in Molecular Biology. 1–19. 2015.
  61. Nesterenko, P. N. & Palamareva, M. D. *Liquid chromatography / Overview*. Encyclopedia of Analytical Science. Elsevier. 2018
  62. M., Y. & E., R. *Ion Exchange Chromatography - An Overview*. Column Chromatography. 1–30. 2013.
  63. Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. W. H. Freeman, New York. 2010.
  64. Poole, C. F. *Chromatography / overview*. Encyclopedia of Analytical Science. 2, 78–104. 2019.
  65. Dolan, J. A. *Chapter 26 Forensic analysis of fire debris*. Forensic Science, 873–922. 2008.
  66. Michalski, R. *Ion Chromatography Applications in Wastewater Analysis Critical*. Separations, Vol.5, No.1, 16. 2018
  67. Ribeiro V.C.M. *Controlo da Qualidade e Validação de Métodos Cromatográficos– Da Teoria à Prática*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. Coimbra. 2015
  68. Small, H., Stevens, T. S. & Bauman, W. C. *Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductimetric Detection*. Analytical Chemistry. 47, 1801–1809. 1975.
  69. Shelor, C. P. *et al. What can in situ ion chromatography offer for mars exploration?*. Astrobiology 14, 577–588. 2014.
  70. Li, D. & Liu, S. *Drinking Water Detection*. Water Quality Monitoring and Management. 251–267. 2019.
  71. Khan, S. & Ali, J. *Chemical analysis of air and water*. Bioassays: Advanced Methods and Applications. Elsevier. 2018.
  72. Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L. & Guillarme, D. *Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 113,

- 43–55. **2015.**
73. Weiss, J. *Handbook of Ion Chromatography*. Fourth, Completely Revised and Enlarged Edition; Wiley-VCH, Verlag GmbH&Co. KGaA:Weinheim, Germany. Volumes 1–3. **2016.**
  74. Michalski, R. *Ion chromatography as a reference method for determination of inorganic ions in water and wastewater*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 36, 107–127. **2006.**
  75. Michalski, R. *Applications of ion chromatography for the determination of inorganic cations*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 39, 230–250. **2009.**
  76. Chen, Y., Srinivasan, K. & Dasgupta, P. K. *Electrodialytic membrane suppressors for ion chromatography make programmable buffer generators*. *Analytical Chemistry*. 84, 67–75. **2012.**
  77. Pohl, C. A., Stillian, J. R., & Jackson, P. E. *Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography*. *Journal Chromatography A*. 1–2, 29–41. **1997.**
  78. Masunaga, H., Higo, Y., Ishii, M., Maruyama, N. & Yamazaki, S. *Development of a new suppressor for the ion chromatography of inorganic cations*. *Analytical Science*. 30, 477–482. **2014.**
  79. Vevelstad, S. J. *et al. Identification and quantification of degradation products by ion chromatography*. *ACS Symposium Series*. 1097, 239–247. **2012.**
  80. Bahadir, O. *Ion-Exchange Chromatography and Its Applications*. *Column Chromatography*. **2013.**
  81. Parpot, Pier. Apontamentos da Unidade Curricular Técnicas de Separação e Análise, Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, 2019/2020
  82. Haddad, P.R., Jackson, P. *Ion Chromatography – Principles and Applications*. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands, 776 pp. **1990.**
  83. Srinivasan, K. *Ion Chromatography Instrumentation for Water Analysis*. *Chemistry and Water: The Science Behind Sustaining the World's Most Crucial Resource*. Elsevier. 329–351. **2017.**
  84. Todorović, Ž. N., Rajaković, L. V. & Onjia, A. E. *Modelling of cations retention in ion chromatography with methanesulfonic acid as eluente*. *Hemijska industrija*. 71(1), 27–33. **2017.**
  85. Michalski, R. *Principles and Applications of Ion Chromatography*. *Application of IC-MS and IC-ICP-MS in Environmental Research*. 1–46. **2016.**
  86. Michalski, R. *Recent Development and Applications of Ion Chromatography*. *Current Chromatography*. 1(2), 90–99. **2013**
  87. Guélat, B., Ströhlein, G., Lattuada, M. & Morbidelli, M. *Electrostatic model for protein adsorption in ion-exchange chromatography and application to monoclonal antibodies, lysozyme and chymotrypsinogen A*. *Journal of Chromatography A*. 1217, 5610–5621. **2010.**
  88. JAMES, A. T., MARTIN, A. J. & RANDALL, S. S. *Automatic fraction collectors and a conductivity recorder*. *Biochemistry Journal*. 49, 293–299. **1951.**
  89. Cerjan Stefanović, Š., Bolanča, T., & Ćurković, L. *Simultaneous determination of six inorganic*

- anions in drinking water by non-suppressed ion chromatography*. Journal of Chromatography A, 918(2), 325–334. **2001**.
90. Fritz, J. S. & Gjerde, D. T. *Discovery and early development of non-suppressed ion chromatography*. Journal of Chromatographic Science, 48(7), 525–532. **2010**
  91. Baird, Rodger B. *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 23rd. **2017**.
  92. Elemental, T. *ICP or ICP-MS? Which technique should I use?*. A Thermo Electron business. 1–20. **2002**.
  93. EPA. *METHOD 200.7 - Determination of elements and trace elements in water and wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*. US Environmental Protection Agency EPA/600/4-, 31–82. **1994**.
  94. Jun-jie, F. & Xue-ping, D. *Determination of Ammonium Ion in Lake Water by Voltammetry*. WUJNS - Wuhan University Journal of Natural Science. 9, 366–370. **2004**
  95. Molins-Legua, C., Meseguer-Lloret, S., Moliner-Martinez, Y. & Campíns-Falcó, P. *A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water analysis*. TrAC - Trends Analytical Chemistry. 25, 282–290. **2006**
  96. ASTM D6919-17. *Standard Test Method for Determination of Dissolved Alkali and Alkaline Earth Cations and Ammonium in Water and Wastewater by Ion Chromatography*. **2017**.
  97. Eurachem/CITAC Guide. *Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation*. 3rd Edition. **2016**.
  98. Geraldo, Dulce. *Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Validação de Métodos Analíticos*, Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, 2019/2020
  99. Magnusson B., Ornemark U. (eds.). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. 2nd Edition. **2014**.
  100. RELACRE. *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Lisboa. Comissão Técnica da Relacre 03. Grupo de Trabalho GT3. Portugal 972-8574-02-9. **2000**
  101. NP EN ISO/IEC 9000:2015. *Sistemas de Gestão de Qualidade – Fundamentos e Vocabulário*. **2015**
  102. Ribeiro, D. *Validação e Otimização de Métodos de Ensaio*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho. Braga. **2019**
  103. RELACRE. *Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. Lisboa. Comissão Técnica da Relacre 03. Grupo de Trabalho GT02. Portugal 972-96727-25. **1996**
  104. ISO 11352. *Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty Based on Validation and Quality Control Data*. 1st Edition. 1-7-**2012**.

105. ISO 8466-1. *Water Quality - Calibration and evolution of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*. 1st edition. 1-03-**1990**.
106. ISO 8466-2. *Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics, Part 2: Statistical strategy for nonlinear second-order calibration functions*. 2nd Edition. 1-11-**2001**.
107. Oliveira, F. *Implementação e Validação de um Método Analítico para a Determinação de Sucralose (E955) em Refrigerantes e Cervejas por HPLC-ELSD*. Dissertação de Mestrado. Universidade do Minho. Braga. **2015**
108. V. Barwick (ed.). *Planning and Reporting Method Validation Studies – Supplement to Eurachem Guide on the Fitness for Purpose of Analytical Methods*. 1st Edition. **2019**.
109. Rao, T. N. *Validation of Analytical Methods*. Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches. **2018**
110. Gonçalves, G. *Desenvolvimento e validação de um método de geração de partículas de referência para calibração de contadores óticos*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. Lisboa. **2019**
111. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology Gold Book*. **2014**
112. IPAC. *Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos (OGC002)*. 18-05-**2011**
113. ISO 3534-1. *Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: General statistical terms and terms used in probability*. **2006**.
114. ISO 5725-1. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions*. 1st Edition. 12-**1994**
115. ISO 5725-2. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. 1<sup>st</sup> Edition. 12-**2000**
116. ISO 5725-4. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method*. 2<sup>nd</sup> Edition. 03-**2020**
117. ISO 5725-6. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values*. 12-**1994**
118. Miller, J., Miller, J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Technometrics. **2009**.
119. Zar, J.H. *Biostatistical Analysis*. 5th Edition. **2010**
120. Bettencourt, A. *Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Validação de Métodos Analíticos*, Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, 2019/2020

121. ILAC & Cooperation International Laboratory Accreditation. *Guidelines for the selection and use of reference materials*. 15. **2005**.
122. European Accreditation. *The selection and use of reference materials: A basic guide for laboratories and accreditation bodies*. Accredited. EA-4/16. **2003**.
123. IPAQ, *Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)*. 1ª edição, **2012**.
124. European Accreditation (EA). The Selection and Use of Reference Materials. EA-4/14 INF. 1–15. **2003**
125. ISO GUIDE 30. *Reference materials – Selected terms and definitions*. **2015**
126. ISO GUIDE 35. *Reference materials – Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*. **2017**
127. ISO/IEC Guide 43-1. *Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes*. 2nd Edition. 07-**1997**
128. Eurachem/CITAC Guide. *Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes*. 3<sup>rd</sup> Edition. **2021**
129. EURACHEM / CITAC Guide CG 4. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 3<sup>rd</sup> Edition. **2012**
130. European Accreditation. *EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing*, EA 4/16. 2003
131. Nordtest TR 537. Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. 3rd Edition. 11-**2012**
132. RELACRE. Guia Relacre 31 – Quantificação de Incerteza de Medição em Ensaios Químicos. Lisboa. Comissão Setorial Relacre CSR04. 05-**2018**.
133. IPAC. *Avaliação da Incerteza de Medição em Calibração* - OGC010. 06-01-**2015**
134. European Accreditation. *Evaluation of the Uncertainty of Measurement In Calibration*. EA 4/02 M. **2013**
135. RELACRE. *Guia Eurachem/Relacre 1 - Exemplo de Cálculo de incertezas*. Edição de Setembro de **2002**
136. GUM. *Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement*. International Organization for Standardization. Geneva. 134 (2008). JCGM 100:2008. **2010**
137. ISO 11843 - 2. *Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case*. 05-**2000**
138. RELACRE. Guia Relacre 9 - Alguns Exemplos de Cartas Descontrolo Em Laboratório de Análise Química. 1ª Edição. **1998**.
139. ISO 7870-1. *Control charts – Part 1: General guidelines*. 11-**2019**

140. Scott, D. & Firth, D. *Using Control Charts Early in the Quantitative Analysis Laboratory Curriculum*. Journal of Chemical Education. 96, 1037–1041. **2019**
141. ISO 7870-2. *Control charts – Part 2: Shewhart control charts*. 04-**2013**
142. Cortez, A. I. P. *Aplicação de Cartas de Controlo na análise de Pb, Cd, Cr e Ni: Controlo da Qualidade Interno dos Brancos*. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa. Lisboa. **2017**
143. Nenes, G. & Tagaras, G. *The economically designed CUSUM chart for monitoring short production runs*. International Journal of Production Research. 44, 1569–1587. **2006**.
144. ISO 7870-4. *Control charts – Part 4: Cumulative sum charts*. 09-**2021**
145. Diário da República, 1º Série - Nº 176 - Decreto-Lei nº 236/98 de 1 de Agosto de **1998**
146. ISO 9308-2. *Water quality – Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria – Part 2: Most probable number method*. 07-**2012**
147. IDEXX. Colilert - Um teste simples de 24 horas para coliformes e E. coli. **2002**.
148. IDEXX. Disponível em: <https://www.idexx.com/en/water/water-products-services/colilert-18/>,  
acedido a 28/10/**2021**



## VI – Anexos

## Anexo A - Frases de advertência de perigo e recomendações de prudência

**Tabela A1.** Frases de advertência de perigo e recomendações de prudência para o eluente e para as soluções padrão utilizado na realização da parte experimental.

Reagente	H*	P*
Ácido metanosulfônico (MSA)	H314	P303+P361+P353+P305+ P351+P338+P310+P405
Solução Padrão Sódio	H290+H315+ H319	P234+P264+P280+P302+P352+ P305+P351+P338+P332+P313
Solução Padrão Magnésio	H290+H315+ H319	P234+P264+P280+P302+P352+ P305+P351+P338+P332+P313
Solução Padrão Cálcio	H290+H315+ H319	P234+P264+P280+P302+P352+ P305+P351+P338+P332+P313

\*Nota:

**H290** Pode ser corrosivo para os metais.

**H314** Provoca queimaduras graves na pele e dano ocular.

**H315** Provoca irritação na pele.

**H319** Provoca irritação ocular grave.

**P234** Manter a solução no recipiente original.

**P264** Lavar a pele cuidadosamente após o manuseio.

**P280** Utilizar luvas de proteção/ proteção ocular/ proteção facial.

**P302+P352** Se entrar em contacto com a pele, lavar com água em abundância.

**P303+P361+P353** Se entrar em contacto com a pele (ou cabelo) retirar imediatamente toda a roupa contaminada e enxaguar a pele com água.

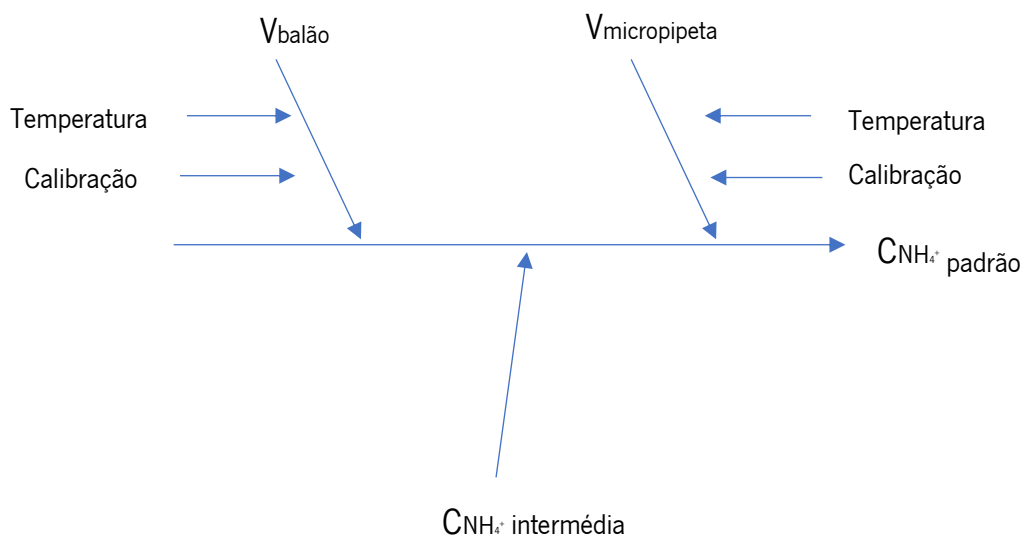
**P305+P351+P338** Se entrar em contacto com os olhos, enxaguar cautelosamente com água durante alguns minutos. Se usar lentes de contacto retire-as, se não for possível continuar a enxaguar.

**P310** Imediatamente ligar para um médico ou centro de contaminações.

**P332+P313** Em caso de irritação cutânea: Consultar um médico.

**P405** Armazenar totalmente fechado.

## Anexo B – Incerteza expandida da concentração de soluções padrão



**Figura B1.** Diagrama espinha de peixe para a identificação das fontes de incerteza da concentração da solução padrão de amónio de 0,50 mg/L.

Micropipeta 10 mL			
Descrição	Incerteza de x	Incerteza padrão (u(x))	Incerteza padrão relativa (u(x)/x)
Calibração	0,010	0,00408	
Temperatura	0,003	0,00182	
u(Vpip)		0,00447	0,00089
Balão Volumétrico 100 mL			
Descrição	Incerteza de x	Incerteza padrão (u(x))	Incerteza padrão relativa (u(x)/x)
Calibração	0,100	0,04082	
Temperatura	0,063	0,03637	
u(Vbalão)		0,05468	0,00055
Cálculo da incerteza combinada uc(y) e da incerteza expandida U(y).			
Descrição	Valor de x	uc (x)	uc (x)/x
Concentração Intermédia (mg/L)	9,99	0,04136	0,00414
Volume da pipeta (mL)	5,000	0,00447	0,00089
Volume do balão volumétrico (ml)	100,00	0,05468	0,00055
Concentração Padrão (mg/L)	0,4995	0,002133	0,00427
Valor da mensuranda	Fator de expansão (k)	Incerteza expandida (U)	
0,4995	2	0,0043	
<b>CNH4 padrão = 0,4995 ± 0,0043 mg/L</b>			

**Figura B2.** Cálculos auxiliares para a determinação das incertezas associadas ao volume da micropipeta, do balão volumétrico e da incerteza combinada e expandida da concentração de uma solução padrão de amónio de 0,50 mg/L.

## Anexo C – Instruções de funcionamento do Cromatógrafo ICS 1000

### Ligar o Cromatógrafo ICS 1000

- Ligar o cromatógrafo no interruptor colocado na parte de trás do equipamento
- Ligar o computador, abrir o software *Chromeleon* e selecionar o cromatógrafo ICS1000
- Encher o reservatório com eluente e injetar com a seringa água ultrapura.
- Na janela painéis, após verificar que o cromatógrafo está conectado clicar em “*Startup*” e automaticamente todos os comandos são acionados.
- Abrir o passador de nitrogénio.
- Para fazer a purga clicar em “*pump settings*”.
- Desligar a bomba, abrir o parafuso localizado na cabeça da bomba (uma volta) e clicar em “*prime*”. Fazer “OK” e deixar purgar durante 2 minutos. Fechar o parafuso e ligar a bomba e o supressor, garantir que este está a trabalhar a 82 mA. Deixar a pressão estabilizar, abrir e fechar rapidamente o parafuso verificando se saem bolhas. Repetir este último passo até que deixem de sair bolhas.
- Deixar o cromatógrafo estabilizar no modo aquisição manual até obter uma linha de base estável.
- Ligar o amostrador automático AS40, tendo o cuidado de verificar que este está conectado com o cromatógrafo pretendido no comutador localizado na parte de trás do amostrador\*.
- Na janela sequências introduzir a série de trabalho, incluindo a curva de calibração e controlo de qualidade.
- Para iniciar a corrida clicar em “*Batch*”, seguidamente clicar em “*Add*”, e selecionar a sequência pretendida. Clicar em “*Ready Check*” para confirmar a seleção efetuada e em “*Start*”. Antes de iniciar a sequência verificar se a condutividade cumpre os limites estabelecidos, que se encontram no impresso – Limites de condutividade CIA – afixado no painel lateral do cromatógrafo, registar o seu valor na carta de condutividade.

\* **Nota:** Para começar uma série de trabalho com o amostrador automático deve proceder do seguinte modo:

- Colocar nas cassetes uma purga (consiste na estabilização do sistema com a eliminação de possíveis bolhas com água ultra pura), um branco, padrões de calibração (quando se realizar), padrões independentes de controlo da curva e grupos de dez amostras, sendo estes separados por padrões independentes (intermédio).
- Clicar em *Hold/Run*
- Avançar a purga e quando o injetor levantar e a cassete ficar na posição do branco pode iniciar a corrida.

### Desligar Cromatógrafo ICS 1000

- Clicar em “*Shutdown*”
- Desligar o nitrogénio.
- Desligar o cromatógrafo.

## Anexo D – Estudo da Gama de Trabalho

**Tabela D1.** Valores obtidos das áreas dos picos para o estudo da gama de trabalho de dez soluções independentes do padrão mais baixo e mais alto para cada catião.

C (mg/L)	Réplica	Área do pico ( $\mu\text{S min}$ )									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
$\text{Na}^+$	2,000	0,745	0,747	0,695	0,696	0,773	0,718	0,688	0,708	0,683	0,682
	20,000	6,262	6,248	6,246	6,235	6,251	6,267	6,271	6,228	6,247	6,241
$\text{NH}_4^+$	0,02498	0,016	0,012	0,014	0,012	0,014	0,014	0,017	0,017	0,014	0,014
	0,4995	0,189	0,185	0,183	0,189	0,188	0,184	0,187	0,186	0,188	0,187
$\text{Mg}^{2+}$	0,1968	0,103	0,101	0,098	0,097	0,099	0,099	0,098	0,103	0,097	0,101
	1,968	1,010	1,002	1,010	1,002	1,005	1,004	1,009	1,007	1,005	1,002
$\text{Ca}^{2+}$	1,0000	0,446	0,529	0,433	0,592	0,584	0,594	0,627	0,674	0,468	0,664
	10,000	3,265	3,258	3,271	3,253	3,087	3,375	3,359	3,226	3,361	3,214

## Anexo E – Sensibilidade ao longo do tempo

Tabela E1. Valores obtidos da sensibilidade do método para a determinação dos cátions.

Data	Catião	Sensibilidade ( $\mu\text{S min L mg}^{-1}$ )			
		Na <sup>+</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
11/01/2021		0,3071	0,3071	0,5006	0,2924
12/01/2021		0,3045	0,3779	0,5534	0,2772
15/04/2021		0,2893	0,3635	0,5492	0,2753
16/04/2021		0,2989	0,3555	0,5470	0,3216
17/04/2021		0,3021	0,3572	0,5456	0,3312
22/04/2021		0,3056	0,3433	0,5500	0,3305
23/04/2021		0,3087	0,3414	0,5425	0,3352
26/04/2021		0,3145	0,3560	0,5265	0,3156
27/04/2021		0,3131	0,3710	0,5279	0,3196
05/05/2021		0,3166	0,3319	0,5100	0,3168
06/05/2021		0,3220	0,3324	0,5024	0,3152
07/05/2021		0,3174	0,3488	0,5051	0,3201

## Anexo F – Ensaio de recuperação em duas matrizes para o estudo da seletividade

**Tabela F1.** Valores de concentração obtidos em amostras reais, através de ensaios de recuperação para o estudo da seletividade.  $[X^+]$  e  $[X^+ + f.]$  representa a concentração do cátion X na amostra original e a concentração do cátion X na solução fortificada respectivamente.

Matriz	Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>		Ca <sup>2+</sup>	
	[Na <sup>+</sup> ]	[Na <sup>+</sup> + f.]	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> + f.]	[Mg <sup>2+</sup> ]	[Mg <sup>2+</sup> + f.]	[Ca <sup>2+</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> + f.]
Água de consumo humano	5,250	7,206	0,080	0,341	0,856	1,043	6,310	7,410
	2,100	4,174	0,026	0,282	0,228	0,441	2,021	3,006
	4,414	6,330	0,013	0,284	0,689	0,901	6,406	7,330
	4,330	6,450	0,025	0,259	0,684	0,877	3,143	4,110
	3,944	6,041	0,101	0,325	0,708	0,914	8,731	9,741
	4,933	6,920	0,026	0,290	0,712	0,915	8,915	9,823
	4,841	6,873	0,023	0,289	0,730	0,928	8,508	9,572
	4,319	6,432	0,025	0,272	0,733	0,944	3,957	4,881
	9,086	11,182	0,024	0,268	0,722	0,936	4,870	5,961
5,445	7,583	0,025	0,279	0,997	1,197	7,542	8,476	
Água Natural Doc Superficial	4,140	6,096	0,128	0,389	0,842	1,027	5,132	6,144
	3,448	5,627	0,024	0,265	0,425	0,635	6,445	7,395
	4,130	6,011	0,020	0,268	0,710	0,921	2,035	3,014
	4,329	6,221	0,213	0,447	1,005	1,203	8,276	9,250
	5,464	7,644	0,064	0,300	1,337	1,552	2,664	3,569
	5,135	7,307	0,055	0,306	1,150	1,339	2,025	2,969
	5,374	7,302	0,060	0,318	0,355	0,565	5,726	6,810
	5,511	7,344	0,048	0,299	0,311	0,517	2,807	3,748
	3,738	5,805	0,181	0,452	1,294	1,500	1,330	2,414
6,666	8,564	0,022	0,281	1,724	1,910	3,780	4,811	

## Anexo G – Limiares analíticos do método

**Tabela G1.** Concentração resultante da análise de dez réplicas de brancos fortificados, em condições de repetibilidade, para cada catião.

Réplica	C(mg/L)	[Na <sup>+</sup> ]	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	[Mg <sup>2+</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> ]
y <sub>1</sub>		1,98	0,033	0,203	0,94
y <sub>2</sub>		2,05	0,034	0,195	1,02
y <sub>3</sub>		1,93	0,036	0,196	0,97
y <sub>4</sub>		1,98	0,033	0,203	1,06
y <sub>5</sub>		2,03	0,031	0,199	1,00
y <sub>6</sub>		1,98	0,031	0,208	0,97
y <sub>7</sub>		2,03	0,026	0,197	1,06
y <sub>8</sub>		1,96	0,029	0,199	1,01
y <sub>9</sub>		1,89	0,034	0,199	1,09
y <sub>10</sub>		1,91	0,030	0,198	1,01

**Tabela G2.** Avaliação do padrão de menor concentração da curva de calibração, em condições de precisão intermédia, para cada catião, de forma a confirmar o LQ do método de determinação dos catiões em estudo.

Réplica	C(mg/L)	[Na <sup>+</sup> ]	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ]	[Mg <sup>2+</sup> ]	[Ca <sup>2+</sup> ]
		<b>2,00</b>	<b>0,02498</b>	<b>0,1968</b>	<b>1,0000</b>
y <sub>1</sub>		2,01	0,0209	0,208	1,12
y <sub>2</sub>		2,04	0,0220	0,200	1,00
y <sub>3</sub>		1,97	0,0239	0,200	1,08
y <sub>4</sub>		1,97	0,0206	0,207	1,03
y <sub>5</sub>		2,05	0,0190	0,204	1,06
y <sub>6</sub>		1,98	0,0214	0,210	1,03
y <sub>7</sub>		1,93	0,0245	0,213	1,12
y <sub>8</sub>		1,93	0,0302	0,213	1,07
y <sub>9</sub>		2,00	0,0190	0,203	1,07
y <sub>10</sub>		1,98	0,0258	0,202	0,96
y <sub>11</sub>		1,91	0,0253	0,203	0,99
y <sub>12</sub>		2,06	0,0269	0,203	0,92
y <sub>13</sub>		1,92	0,0242	0,212	0,90
y <sub>14</sub>		1,90	0,0305	0,209	0,90
y <sub>15</sub>		1,91	0,0212	0,202	1,07
y <sub>16</sub>		1,88	0,0272	0,213	1,03
y <sub>17</sub>		1,88	0,0239	0,212	1,00
y <sub>18</sub>		2,00	0,0228	0,209	0,94
y <sub>19</sub>		1,96	0,0283	0,198	0,99
y <sub>20</sub>		1,95	0,0245	0,203	1,00



## Anexo H – Precisão do método em condições de repetibilidade

**Tabela H1.** Dados obtidos da avaliação da precisão do método, em condições de repetibilidade, para cada catião.

Réplica	Na <sup>+</sup>		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		Mg <sup>2+</sup>		Ca <sup>2+</sup>	
	2,000	20,000	0,0250	0,5005	0,1968	1,968	0,9968	9,968
y <sub>1</sub>	2,214	20,132	0,0234	0,506	0,205	2,001	0,941	9,913
y <sub>2</sub>	2,054	20,086	0,0226	0,495	0,202	1,985	1,128	9,928
y <sub>3</sub>	2,123	20,079	0,0228	0,490	0,206	2,000	0,982	9,968
y <sub>4</sub>	2,031	20,041	0,0228	0,506	0,196	1,992	0,903	10,296
y <sub>5</sub>	2,092	20,095	0,0237	0,503	0,197	1,991	0,984	10,246
y <sub>6</sub>	2,014	20,146	0,0239	0,494	0,197	1,989	1,009	9,828
y <sub>7</sub>	2,209	20,019	0,0220	0,500	0,195	2,001	1,078	9,951
y <sub>8</sub>	2,055	20,081	0,0245	0,498	0,205	1,986	0,973	10,251
y <sub>9</sub>	2,012	20,063	0,0281	0,504	0,194	1,999	1,013	9,792
y <sub>10</sub>	2,296	19,988	0,0215	0,500	0,201	1,996	0,973	10,112

## Anexo I – Precisão do método em condições de precisão intermédia

**Tabela I1.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do padrão mais diluído, para cada catião.

	Na <sup>+</sup>			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			Mg <sup>2+</sup>			Ca <sup>2+</sup>		
	2,000			0,0250			0,1968			0,9968		
	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
y <sub>1</sub>	1,95	2,06	2,06	0,025	0,026	0,030	0,201	0,203	0,197	0,94	1,03	0,85
y <sub>2</sub>	1,97	1,98	2,07	0,028	0,027	0,029	0,199	0,204	0,195	1,01	1,00	1,01
y <sub>3</sub>	1,98	1,99	2,10	0,027	0,028	0,030	0,203	0,191	0,205	1,09	1,00	1,02
y <sub>4</sub>	1,97	2,05	2,07	0,027	0,023	0,029	0,200	0,201	0,194	1,20	0,96	1,00
y <sub>5</sub>	1,93	1,92	2,05	0,027	0,023	0,027	0,197	0,205	0,193	1,04	1,04	0,92
y <sub>6</sub>	2,01	1,95	1,99	0,024	0,023	0,026	0,207	0,202	0,196	1,04	1,04	0,88
y <sub>7</sub>	2,06	1,92	2,03	0,021	0,022	0,027	0,201	0,206	0,194	0,98	1,07	0,87
y <sub>8</sub>	2,01	2,00	2,09	0,026	0,024	0,027	0,207	0,192	0,201	1,14	0,93	0,93
y <sub>9</sub>	1,97	1,93	2,03	0,024	0,023	0,026	0,209	0,197	0,195	0,98	0,92	0,96
y <sub>10</sub>	1,95	1,96	1,99	0,027	0,024	0,025	0,192	0,199	0,195	1,25	0,92	0,99

**Tabela I2.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do padrão de concentração intermédia da curva de calibração, para cada catião.

	Na <sup>+</sup>			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			Mg <sup>2+</sup>			Ca <sup>2+</sup>		
	10,000			0,2503			0,9840			4,984		
	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
y <sub>1</sub>	9,90	9,87	10,07	0,234	9,90	9,87	10,07	0,234	9,90	9,87	10,07	0,234
y <sub>2</sub>	9,98	10,03	10,05	0,262	9,98	10,03	10,05	0,262	9,98	10,03	10,05	0,262
y <sub>3</sub>	10,19	9,91	10,03	0,257	10,19	9,91	10,03	0,257	10,19	9,91	10,03	0,257
y <sub>4</sub>	10,07	9,82	10,03	0,266	10,07	9,82	10,03	0,266	10,07	9,82	10,03	0,266
y <sub>5</sub>	9,97	9,98	10,02	0,257	9,97	9,98	10,02	0,257	9,97	9,98	10,02	0,257
y <sub>6</sub>	10,10	9,87	10,09	0,253	10,10	9,87	10,09	0,253	10,10	9,87	10,09	0,253
y <sub>7</sub>	9,96	9,91	10,04	0,246	9,96	9,91	10,04	0,246	9,96	9,91	10,04	0,246
y <sub>8</sub>	9,85	9,87	10,13	0,245	9,85	9,87	10,13	0,245	9,85	9,87	10,13	0,245
y <sub>9</sub>	9,83	9,79	9,91	0,243	9,83	9,79	9,91	0,243	9,83	9,79	9,91	0,243
y <sub>10</sub>	9,97	9,81	9,85	0,251	9,97	9,81	9,85	0,251	9,97	9,81	9,85	0,251

**Tabela 13.** Valores obtidos da análise de três conjuntos de dez soluções independentes, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do padrão de maior concentração da curva de calibração, para cada catião.

	Na <sup>+</sup>			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			Mg <sup>2+</sup>			Ca <sup>2+</sup>		
	20,000			0,5005			1,968			9,968		
	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05	12/04	28/04	27/05
y <sub>1</sub>	19,65	19,70	19,83	0,483	0,508	0,503	2,00	1,95	2,00	9,51	9,90	10,17
y <sub>2</sub>	19,92	19,78	19,78	0,483	0,497	0,492	2,07	2,02	1,98	9,78	9,93	10,08
y <sub>3</sub>	20,09	19,80	19,78	0,484	0,507	0,487	1,98	1,95	2,00	9,37	9,98	10,07
y <sub>4</sub>	19,82	19,96	19,74	0,500	0,504	0,503	2,01	2,01	2,00	9,51	10,08	10,27
y <sub>5</sub>	19,92	19,69	19,79	0,487	0,508	0,490	2,03	1,99	1,99	9,92	10,11	10,34
y <sub>6</sub>	19,81	19,63	19,84	0,482	0,508	0,491	2,04	2,00	1,99	9,84	10,13	9,96
y <sub>7</sub>	20,09	19,72	19,86	0,496	0,510	0,497	2,05	1,98	1,99	9,99	9,87	9,93
y <sub>8</sub>	19,91	19,66	19,72	0,483	0,491	0,495	2,05	2,00	2,00	9,89	9,82	9,88
y <sub>9</sub>	19,50	19,51	19,78	0,487	0,515	0,502	1,97	1,98	2,02	9,62	10,07	9,87
y <sub>10</sub>	19,60	19,67	19,76	0,497	0,498	0,498	1,99	1,99	2,00	9,45	9,82	9,68

## Anexo J – Estudo da robustez

**Tabela J1.** Matriz de teste de Youden aplicada considerando três fatores.

Ensaio	A	B	C
1	1	1	1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	-1	-1	1

**Tabela J2.** Dados obtidos dos ensaios efetuados em triplicado para o estudo da robustez do método.

Ensaio	Na <sup>+</sup> (mg/L)			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)			Mg <sup>2+</sup> (mg/L)			Ca <sup>2+</sup> (mg/L)		
	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3	r1	r2	r3
1	9,56	9,52	9,41	0,271	0,252	0,251	1,086	1,043	1,057	4,675	4,605	4,618
2	10,34	10,43	10,41	0,293	0,295	0,291	1,179	1,270	1,255	4,842	4,981	5,052
3	12,15	11,31	10,98	0,293	0,264	0,265	1,326	1,279	1,239	5,590	5,399	5,290
4	9,97	9,78	9,75	0,287	0,282	0,279	1,242	1,217	1,257	5,070	4,917	5,011

**Tabela J3.** Média dos resultados obtidos para cada ensaio tendo em vista a avaliação da robustez do método.

Ensaio	RE: Na <sup>+</sup> (mg/L)	RE: NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	RE: Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	RE: Ca <sup>2+</sup> (mg/L)
1	9,496	0,258	1,062	4,633
2	10,391	0,293	1,234	4,958
3	11,483	0,274	1,281	5,426
4	9,834	0,283	1,239	4,999

## Anexo K – Cartas de controle

**Tabela K1.** Concentração determinada do padrão de menor concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a construção da carta de controle, para cada catião.

Data	[Na <sup>+</sup> ] (mg/L)	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg/L)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mg/L)	[Ca <sup>2+</sup> ] (mg/L)
	2,000	0,0250	0,1968	0,9968
16/04/2021	1,94	0,0251	0,203	0,94
22/04/2021	2,12	0,0276	0,204	1,01
26/04/2021	1,97	0,0285	0,191	1,09
05/05/2021	2,12	0,0267	0,216	1,19
06/05/2021	2,11	0,0266	0,223	1,03
10/05/2021	2,19	0,0194	0,215	1,04
12/05/2021	2,11	0,0187	0,199	0,99
13/05/2021	2,17	0,0255	0,203	0,86
17/05/2021	1,97	0,0325	0,200	0,97
18/05/2021	2,07	0,0268	0,197	1,24
19/05/2021	2,09	0,0261	0,207	1,02
24/05/2021	2,10	0,0269	0,217	1,00
25/05/2021	1,99	0,0187	0,219	0,99
26/05/2021	1,87	0,0275	0,217	0,96
27/05/2021	1,90	0,0272	0,229	0,93
27/05/2021	1,92	0,0311	0,218	0,93
27/05/2021	2,05	0,0258	0,218	0,92
15/06/2021	2,00	0,0273	0,212	0,92
17/06/2021	1,97	0,0302	0,213	1,02
17/06/2021	1,89	0,0253	0,210	0,92

**Tabela K2.** Réplicas obtidas do padrão de menor concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a monitorização do controle de qualidade, para cada catião.

Data	[Na <sup>+</sup> ] (mg/L)	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg/L)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mg/L)	[Ca <sup>2+</sup> ] (mg/L)
	2,000	0,0250	0,1968	0,9968
16/04/2021	1,95	0,025	0,211	1,03
22/04/2021	1,97	0,028	0,209	1,00
26/04/2021	1,98	0,027	0,213	1,00
05/05/2021	1,97	0,027	0,210	0,96
06/05/2021	1,93	0,027	0,207	1,04
10/05/2021	2,01	0,024	0,217	1,04
12/05/2021	2,06	0,021	0,211	1,07
13/05/2021	2,01	0,026	0,217	0,93
17/05/2021	1,97	0,024	0,219	0,92
18/05/2021	1,95	0,027	0,202	0,92
19/05/2021	2,06	0,026	0,213	1,09
24/05/2021	1,98	0,027	0,214	1,02
25/05/2021	1,99	0,028	0,201	1,01
26/05/2021	2,05	0,023	0,211	1,00
27/05/2021	1,92	0,023	0,215	0,94
27/05/2021	1,95	0,023	0,212	0,92
27/05/2021	1,92	0,022	0,216	0,94
15/06/2021	2,00	0,024	0,202	0,93
17/06/2021	1,93	0,023	0,207	0,96
17/06/2021	1,96	0,024	0,209	0,99

**Tabela K3.** Concentração determinada do padrão de maior concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a construção da carta de controlo, para cada catião.

Data	[Na <sup>+</sup> ] (mg/L)	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg/L)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mg/L)	[Ca <sup>2+</sup> ] (mg/L)
	20,000	0,5005	1,968	9,968
16/04/2021	19,05	0,475	1,93	9,61
22/04/2021	19,40	0,472	1,95	9,78
26/04/2021	19,32	0,487	1,98	9,67
05/05/2021	18,82	0,482	1,94	10,08
06/05/2021	19,21	0,507	2,03	9,92
10/05/2021	19,10	0,483	2,04	9,84
12/05/2021	18,92	0,483	2,05	9,99
13/05/2021	18,71	0,490	2,05	9,89
17/05/2021	18,80	0,510	1,97	9,62
18/05/2021	18,99	0,514	1,99	9,75
19/05/2021	18,90	0,521	1,95	9,90
24/05/2021	19,07	0,515	2,02	9,93
25/05/2021	19,09	0,508	2,07	9,98
26/05/2021	18,79	0,497	2,01	10,08
27/05/2021	19,25	0,491	2,05	10,11
27/05/2021	19,30	0,497	2,04	9,96
27/05/2021	19,30	0,495	2,00	9,93
15/06/2021	19,26	0,502	2,05	9,88
17/06/2021	19,21	0,498	1,97	9,87
17/06/2021	19,37	0,490	1,99	9,68

**Tabela K4.** Réplicas obtidas do padrão de maior concentração da curva de calibração, ao longo do tempo, para a monitorização do controlo de qualidade, para cada catião.

Data	[Na <sup>+</sup> ] (mg/L)	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg/L)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mg/L)	[Ca <sup>2+</sup> ] (mg/L)
	20,000	0,5005	1,968	9,968
16/04/2021	19,10	0,483	2,00	10,07
22/04/2021	19,18	0,483	2,07	9,82
26/04/2021	19,20	0,484	1,98	10,17
05/05/2021	19,36	0,500	2,03	10,04
06/05/2021	19,09	0,487	2,01	9,92
10/05/2021	19,03	0,482	2,04	9,84
12/05/2021	19,12	0,496	2,05	9,87
13/05/2021	19,06	0,483	2,05	9,82
17/05/2021	18,91	0,487	1,97	9,90
18/05/2021	19,07	0,497	1,99	9,93
19/05/2021	19,23	0,508	1,95	9,98
24/05/2021	19,18	0,497	2,02	10,01
25/05/2021	19,18	0,507	1,95	10,08
26/05/2021	19,14	0,504	2,01	10,03
27/05/2021	19,19	0,508	1,99	9,99
27/05/2021	19,24	0,508	2,00	9,70
27/05/2021	19,26	0,510	1,98	9,93
15/06/2021	19,05	0,491	2,00	9,88
17/06/2021	19,18	0,515	1,98	9,87
17/06/2021	19,16	0,498	1,99	9,68