

Cindy Domingues Fonseca

IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DA OXIDABILIDADE EM ÁGUAS PELO MÉTODO DE FLUXO SEGMENTADO

Mestrado em Química
Departamento de Química

FCTUC

Junho 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Cindy Domingues Fonseca

**IMPLEMENTAÇÃO E VALIDAÇÃO DA
OXIDABILIDADE EM ÁGUAS PELO
MÉTODO DE FLUXO SEGMENTADO**

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química

Área de especialização de Controlo de Qualidade e Ambiente

Orientação de: Prof.^a Dr.^a Maria Emília Azenha

e

Co-orientação de: Prof. Dr. Jorge Costa Pereira

Junho 2016

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

«Ninguém disse que era fácil», certamente já pronunciada por inúmeras pessoas, esta frase assumiu todos os dias um papel fulcral na realização deste trabalho. Certamente que nada é fácil mas, se o fosse não teria o mesmo interesse, não daria luta e, acima de tudo, não seria valorizado.

A realização deste trabalho foi sem dúvida um enorme desafio a ultrapassar, mas porque me propus a entrar nele, só poderia chegar a uma conclusão: ‘tens de chegar ao fim, porque mereces, porque todos os que te ajudam e ajudaram o merecem’. É por isso que dedico estas palavras a todos os que se cruzaram no meu caminho ao longo destes meses e ainda aos que nele se mantêm e irão manter por muito mais tempo.

Em primeiro lugar, os meus agradecimentos vão para a Professora Doutora Maria Emília Azenha que, mesmo sabendo da minha relutância em entrar neste Mestrado, me aconselhou de forma sábia e experiente a seguir em frente, porque só assim faria sentido. Obrigada pela sua disponibilidade, conselhos e, acima de tudo, sapiência transmitida.

Ao Professor Doutor Jorge Costa Pereira, tenho a agradecer também os conselhos durante a escolha deste meu percurso e ainda a infinita paciência perante as minhas permanentes dúvidas.

Ao Doutor Pedro e à Engenheira Laura Silva quero agradecer acima de tudo, a oportunidade que me deram de estagiar no Laboratório Tomaz, ao aceitarem a minha ‘proposta’.

Também ao Engenheiro Pedro Timóteo pretendo dar o meu obrigada pelas orientações mesmo quando me encontrava mais desorientada. Sem a sua experiência não teria conseguido responder a muitas questões.

Às meninas do departamento de físico-química, a Ana Margarida, a Neuza, a Sónia e a Mónica, saibam que são grandes profissionais e, acima de tudo, grandes mulheres – são um exemplo de humildade e dedicação àquilo que fazem. Obrigada pela paciência, conselhos e amizade.

Às restantes colaboradoras do Laboratório Tomaz, igualmente importantes, um agradecimento especial pelo carinho com que me trataram e todos os ensinamentos transmitidos.

À minha irmã, ao Martim e ao Hugo, obrigada por mostrarem que acreditam em mim e me incentivarem a seguir em frente mesmo nas alturas em que duvidava que fosse possível. O Martim, embora muito pequeno, também o fez, à maneira de uma criança, mas fez.

Ao Joel agradeço todo o apoio, todas as palavras e gestos sem os quais não teria certamente chegado a esta etapa com a coragem e determinação que cheguei. Esteve presente em cada

momento, segurando-me sempre que foi preciso e para isso não há muito a dizer, porque se sente. Obrigada.

Por último, e não menos importantes, obrigada aos meus pais porque são os verdadeiros heróis de todo este percurso pois sem eles não teria sido possível sustentar tudo isto. Se cheguei tão longe, foi pela vossa luta diária para me manter bem alto no pedestal. Com toda a certeza, tenho a convicção de que um dia quero ser igual a vós.

A todos, muito obrigada.

Resumo

O principal objetivo deste trabalho consistiu na implementação e validação de um novo método para a determinação do índice de permanganato em águas, de forma a, futuramente, poder substituir o atual método titulométrico. Para isso, foi necessário proceder à validação do método, a análise em fluxo contínuo segmentado, para garantir que o mesmo é adequado a esta determinação analítica. Este processo de validação irá culminar com a candidatura à acreditação.

Para validar o método da análise do índice de permanganato por fluxo segmentado, foi necessário proceder a diversos estudos do mesmo: validar a gama de trabalho pretendida, avaliar a sua precisão e exatidão e testar a linearidade do mesmo. Um outro aspeto relevante para a validação deste método, consistiu em fazer a comparação com o método usado para a determinação deste parâmetro, a titulação, que é um método já implementado e acreditado. Esta comparação é extremamente importante pois, se, estatisticamente, os resultados do novo método forem equivalentes aos do método já implementado, então é possível aplicar esta nova metodologia num futuro próximo.

Todos os resultados têm associados a si uma incerteza. Neste trabalho foram ainda efetuadas as estimativas das incertezas associadas aos métodos de determinação do índice de permanganato, através da aplicação da norma recentemente criada para este efeito: Norma ISO 11352:2012.

Os resultados obtidos permitem chegar à conclusão de que é possível implementar o novo método de análise para a determinação do índice de permanganato, facilitando o trabalho de rotina no laboratório, devido à sua automatização.

Palavras-chave: Índice de permanganato, Fluxo segmentado, Controlo de Qualidade, Incerteza, Validação, Comparação de métodos.

Abstract

The main purpose of this work was try to implement and validate a new method to determinate de permanganate index in water, so that in the future it can be possible to replace the current titration method by the new one

For this, it was necessary to validate the new method, the continuous flow segmented analysis, to ensure that it is suitable for this analytical determination. This validation process will end with the application for accreditation.

To validate the method of analysis of permanganate index by segmented flow, it was necessary to carry out several studies of it: validate the range work, evaluate their precision and accuracy and test its linearity. Another relevant issue for the validation of this method was to compare it with the method already used to determine this parameter, the titration, which is an implemented and accredited method. This comparison is extremely important because if, statistically, the results given by the new method are equivalent to the method already implemented, then the new one can be applied in the near future.

All results have associated with it an uncertainty. In this work, were made estimates of the uncertainties for both methods of determination of permanganate index, by applying the new created norm: ISO 11352:2012.

The results obtained have led to the conclusion that it is possible to implement the new method for the determination of permanganate index, facilitating the daily work in the laboratory due to its automation.

Key-words: Permanganate Index, Segmented Flow, Quality Control, Uncertainty, Validation, Methods comparison.

Lista de abreviaturas

AFS – Análise em Fluxo segmentado

α -nível de significância

AU –do inglês *Arbitrary Units*

[C] – Concentração

CQ - Controlo de Qualidade

CV – Coeficiente de variação

DP – Desvio padrão

DU –do inglês *Digital Units*

EIL - Ensaio Interlaboratoriais

EN –do inglês *European Norm*

\overline{ER} – Erro médio relativo

F_{crit} - Valor crítico/tabelado para a distribuição de Fisher

G_{crit} - Valor crítico/tabelado para a distribuição de Grubbs

H₀ – Hipótese Nula

H₁ – Hipótese Alternativa

IPAC - Instituto Português da Acreditação

IRMM - do inglês *Institute for Reference Materials and Measurements*

ISO – do inglês *International Organization for Standardization*

L.A.S. - Linha de Aviso Superior

L.A.I. – Linha de Aviso Inferior

L.C. – Linha Central

L.C.S. - Linha de Controlo Superior

L.C.I. – Linha de Controlo Inferior

LD – Limite de deteção

LQ – Limite de quantificação

LT – Laboratório Tomaz

MRC - Materiais de Referência Certificados

MRI - Materiais de Referência Internos

NIST – do inglês *National Institute for Standards and Technology*

NP – Norma Portuguesa

%R – Taxa de recuperação

TV –do inglês *Test Value*

U_{AFS} – Incerteza Expandida para o método de análise em fluxo segmentado

U_{tit} - Incerteza Expandida para o método de titulometria

Z_{score} – fator de desempenho associado à participação em ensaios interlaboratoriais.

Índice

1	Introdução	3
1.1	Acreditação	4
1.2	Laboratório Tomaz	6
2	Fundamentação do método.....	7
2.1	Determinação do índice de permanganato	7
2.2	Métodos de análise	8
2.2.1	Análise Volumétrica	8
2.2.2	Análise em fluxo contínuo segmentado.....	10
2.3	Tratamento estatístico de dados	13
2.3.1	Testes de significância	13
2.3.2	Conclusão estatística	17
2.4	Validação de métodos analíticos.....	17
2.4.1	Especificidade e Seletividade	18
2.4.2	Curva de Calibração.....	19
2.4.3	Gama de trabalho.....	20
2.4.4	Linearidade.....	22
2.4.5	Limiares analíticos	23
2.4.6	Sensibilidade	24
2.4.7	Precisão	24
2.4.8	Exatidão.....	26
2.4.9	Comparação de métodos	27
2.5	Controlo de Qualidade	28
2.5.1	Controlo de Qualidade externo.....	29
2.5.2	Controlo de qualidade interno	30
2.5.3	Cartas de controlo	30
2.5.4	Estimativa de incertezas.....	33
2.5.5	ISO 11352:2012	33
3	Procedimento Experimental	41
3.1	Análise volumétrica.....	41
3.1.1	Reagentes.....	41

3.1.2	Procedimento.....	42
3.2	Análise em fluxo contínuo segmentado.....	43
3.2.1	Reagentes.....	43
3.2.2	Procedimento.....	43
4	Resultados e Discussão	49
4.1	Validação do método	49
4.1.1	Definição e validação da gama de trabalho	49
4.1.2	Especificidade e seletividade.....	51
4.1.3	Linearidade.....	52
4.1.4	Limiars analíticos.....	57
4.1.5	Precisão	58
4.1.6	Exatidão.....	61
4.1.7	Sensibilidade	62
4.1.8	Comparação dos métodos	62
4.2	Estimativa de incertezas.....	67
4.2.1	Análise volumétrica.....	67
4.2.2	Análise em fluxo segmentado	68
4.3	Cartas de Controlo	68
4.3.1	Sensibilidade	69
4.3.2	Padrão de controlo.....	69
4.3.3	Amplitudes	70
5	Conclusões.....	73
6	Referências.....	75
7	Anexos.....	77

Preâmbulo

O trabalho aqui apresentado, resultante da realização do estágio curricular realizado no laboratório Tomaz, foi dividido em 7 capítulos.

No capítulo 1 é feita uma breve introdução ao elemento analisado neste projeto, a água. São mencionados os principais aspetos relativos à candidatura para acreditação de um laboratório, pois é um dos objetivos da validação do método aqui mencionado. É também feita uma breve menção acerca do Laboratório Tomaz neste mesmo capítulo.

Toda a parte que fundamenta a realização deste trabalho encontra-se descrita no capítulo 2. Aqui estão incluídos aspetos como o princípio teórico da análise da oxidabilidade e os princípios que sustentam os métodos de análise deste parâmetro. Surge também neste capítulo um tópico referente ao controlo de qualidade e cálculo de incertezas, um assunto tão relevante para o sucesso das empresas e satisfação dos clientes perante os seus resultados e, ainda as explicações referentes ao processo de validação de um método analítico.

O capítulo 3 inclui a descrição dos procedimentos experimentais de ambos os métodos de análise abordados neste trabalho.

Todos os resultados, bem como a respetiva discussão podem ser consultados no capítulo 4 deste documento.

As principais conclusões deste projeto são mencionadas no capítulo 5. Os capítulos 6 e 7 incluem as referências que suportaram a escrita deste trabalho e os anexos, respetivamente.

1 Introdução

A água é indispensável a todas as formas de vida no planeta. Enquanto recurso natural, possui um enorme valor económico, social e ambiental e é essencial para a sobrevivência.

A sua contaminação acarreta inúmeras consequências para a saúde pública e para o equilíbrio dos ecossistemas. De acordo com documentos legislativos, a poluição da água consiste na adição direta ou indireta, pelo Homem, de substâncias que possam afetar a saúde humana ou mesmo a qualidade do ambiente, tornando-a inacessível para as finalidades a que se destina.

Assim, e porque cada vez mais o crescimento populacional e industrial têm um ritmo mais acelerado, há uma necessidade de controlo da qualidade da água para que possa ser utilizada em segurança por todos e para todos.

A avaliação da qualidade de uma água deve ser realizada por instituições devidamente especializadas e acreditadas para esse fim e por técnicos habilitados para tal. Devem ser realizados diversos parâmetros de cariz físico-químico e biológico, selecionados de acordo com a finalidade a que se destina a água e com a legislação em vigor. Este controlo permite evitar o aparecimento de problemas económicos e ambientais, tornando possível o uso sustentável da água. Para tal, a legislação existente, além de definir quais os valores que devem ser respeitados para cada parâmetro a analisar, define as águas consoante o seu destino final, de forma a proteger o meio aquático e melhorar a sua qualidade.

De acordo com o Decreto-Lei nº236/98 [1], existem águas para consumo humano, águas para suporte de vida aquícola, águas balneares, águas de rega e ainda águas residuais domésticas, industriais ou urbanas.

Para que os parâmetros analisados numa água sejam fiáveis e possam ser reportados por um laboratório ao cliente, existem várias etapas pelas quais uma amostra passa até ser obtido o resultado analítico. Uma análise química normalmente é realizada apenas a uma pequena fração do material total. Deste modo, é de extrema importância que essa fração reflita o mais aproximadamente possível a composição total da amostra, para que os resultados transmitidos sejam o mais corretos possível.

A amostragem é o processo pelo qual uma fração representativa da amostra no seu todo é colhida. É uma etapa muitas vezes dificultada pela falta de homogeneidade do material a ser colhido. A amostra colhida deve ser representativa do seu todo. Os métodos de amostragem variam consoante o tipo de amostra e o analito a ser quantificado e, por isso, o técnico responsável pela sua colheita deve ser especializado para tal.

Após a sua chegada ao laboratório onde irá ser analisada, a amostra deve ser identificada e rotulada para que não existam dúvidas acerca da sua origem. Deve conter dados tais como: um número, a data de entrada no laboratório, a quantidade de amostra [2], entre outros.

Desta forma, e porque cada vez mais é exigida rapidez e eficácia na avaliação da qualidade da água, surge uma necessidade crescente de recorrer a métodos automatizados que permitam respostas rápidas.

Atualmente, para alcançar esta finalidade, podem ser utilizadas técnicas de fluxo que permitem automatizar os procedimentos analíticos. Estas originam metodologias analíticas com elevada eficiência que permitem elevados ritmos de determinação, diminuindo a intervenção de um operador e outros custos económicos adicionais inerentes a técnicas manuais.

1.1 Acreditação

Segundo o IPAC, “a atividade de acreditação consiste na avaliação e reconhecimento da competência técnica de entidades para efectuar atividades específicas de avaliação da conformidade (e.g. ensaios, calibrações, certificações e inspeções)” [3]. Este processo é regulado por legislação comunitária a fim de promover um funcionamento harmonizado. Por isso, existe em cada Estado Membro da União Europeia um organismo responsável pela acreditação. Em Portugal, esse organismo é o IPAC. Por sua vez, a avaliação da conformidade consiste em mostrar que “um bem, produto ou serviço cumpre os requisitos que lhe são aplicáveis [3].” e pode implicar a realização de ensaios, calibrações, inspeções ou certificações.

Desta forma, a acreditação permite transmitir confiança na realização de atividades técnicas, pois é confirmado um nível mínimo de competência, reconhecido internacionalmente.

Este processo constitui uma ferramenta de globalização e internacionalização, pois as metodologias são mundialmente harmonizadas. A norma NP EN ISO/IEC 17025 define as mesmas, o que facilita essa internacionalização.

O processo de concessão da acreditação compreende três fases e uma outra adicional, que permanece ao longo do tempo: a fase de candidatura, a fase de avaliação, a fase final, de decisão e a mais prolongada, a fase de manutenção [4], de acordo com a figura 1.1.

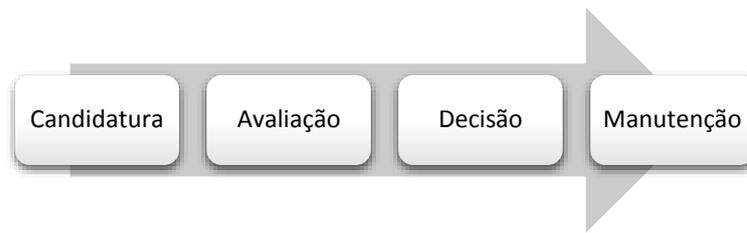


Figura 1.1 Etapas gerais num processo de acreditação.

A fase da candidatura deve iniciar-se pelo pedido de acreditação junto da entidade designada para esse fim. O pedido será avaliado, de forma a garantir que cumpre os requisitos necessários para avançar com o processo sendo que, nos casos em que o âmbito da acreditação é claramente descrito e corresponde a uma atividade acreditável, a entidade atribui o respetivo código de registo bem como um interlocutor responsável pelo acompanhamento da acreditação.

A fase de avaliação é geralmente realizada de diversas formas: por via documental e avaliação presencial. A análise documental consiste na análise de documentos enviados pela entidade que se candidata à acreditação para que possa ser avaliado o estado de conformidade da mesma. Já a avaliação presencial permite examinar detalhadamente as atividades que são incluídas no âmbito da acreditação, com o objetivo de avaliar o cumprimento dos critérios de acreditação e é feita no local de desenvolvimento dessas atividades.

Findo o processo de avaliação, segue o processo de tomada de decisão, levado a cabo por pessoas independentes das avaliações. Esta fase é baseada no estudo dos relatórios e outras informações reunidas pelas equipas avaliadoras. No caso de a decisão ser favorável, a entidade agora acreditada pode usar o símbolo de acreditação aplicável e fazer publicidade ao seu estatuto de entidade acreditada.

Concedida a acreditação, segue-se a fase da sua manutenção (figura 1.1), que inclui ações de acompanhamento e renovação [4].

De acordo com o IPAC, é importante que laboratórios que efetuam ensaios químicos e sejam, ou pretendam ser candidatos à acreditação, tenham devidamente definido um Sistema de Gestão de Qualidade.

A eficácia deste último deve ser sempre garantida, tentando minimizar e controlar a ocorrência dos erros que acompanham a realização de análises químicas. A ocorrência destes erros poderá ser controlada por aplicação de ações de controlo de qualidade a nível interno e externo, para que o nível de qualidade dos resultados emitidos e entregues ao cliente por um laboratório seja satisfatório [5].

1.2 Laboratório Tomaz

O laboratório Tomaz pertence ao grupo Beatriz Godinho e possui uma vasta experiência em análises físico-químicas e microbiológicas. É acreditado pelo Instituto Português de Acreditação para mais de 100 parâmetros, de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025, para a análise de águas, alimentos, análises veterinárias, efluentes gasosos, efluentes líquidos e resíduos sólidos.

São vários os tipos de serviços prestados pelo Laboratório Tomaz ao nível de parâmetros físico-químicos, tais como: determinação de metais por ICP ou espectrofotometria de absorção atômica, análise de solos, determinação de azoto amoniacal, fósforo total e cor por fluxo contínuo segmentado, pH, condutividade, matéria gorda e proteína de alimentos, entre muitos outros.

São também avaliados parâmetros de cariz microbiológico a águas e alimentos como quantificação de bactérias coliformes, *escherichia coli*, pesquisa de legionella, salmonella, entre outros.

2 Fundamentação do método

Todas as formas de vida existentes na Terra dependem da água. A maior parte da superfície do planeta Terra, cerca de 97,3%, é coberta por água, no entanto, esta é inadequada para o consumo humano pois é água salgada. Os lagos e os rios são as principais fontes de água potável, ainda assim, a quantidade de água existente nestes locais não é suficiente. Mesmo com a junção da água com origens subterrâneas, a água doce disponível representa apenas 1% do volume total de água presente na Terra. Perante a disponibilidade diminuta deste recurso e atendendo à sua crescente poluição, a avaliação da qualidade da água revela-se um assunto primordial a ser empregado [6]. Perante esta necessidade de avaliar a qualidade da água, surgem parâmetros de controlo que fornecem a informação necessária para efetuar esta avaliação. Atualmente, em Portugal, a legislação em vigor para este efeito define quais os parâmetros obrigatórios para o controlo da qualidade da água.

No Anexo II, constante do Decreto-lei nº 306/2007, legislação atual para águas de consumo, a que se refere o número 1 do artigo 10º relativo à verificação da qualidade da água [7], são definidos os controlos para água destinada a consumo humano proveniente de sistemas de abastecimento público, fontanários e outros. De entre os muitos parâmetros obrigatórios definidos neste anexo, destaca-se a oxidabilidade como um dos parâmetros que permite fornecer informações sobre a qualidade da água destinada ao consumo humano, dando indicação do teor em matéria orgânica.

Ao longo deste capítulo serão abordados os principais assuntos que serviram de fundamento à escrita deste trabalho, iniciando-se pela definição do conceito de oxidabilidade.

2.1 Determinação do índice de permanganato

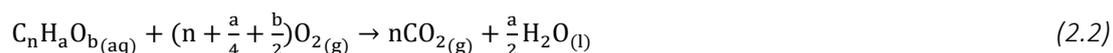
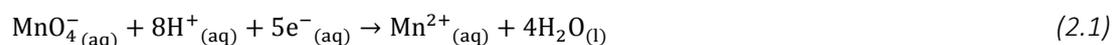
A oxidabilidade, também denominada por índice de permanganato, corresponde à quantidade de oxigénio quimicamente equivalente à quantidade de permanganato de potássio necessária para oxidar a matéria orgânica existente na água, em condições bem definidas: meio ácido e através de aquecimento [8].

É uma forma indireta de medir a existência de matéria orgânica na água, não sendo possível afirmar que permite determinar a totalidade da matéria orgânica, uma vez que há compostos que podem ser apenas parcialmente oxidados e compostos voláteis que evaporam antes da adição do permanganato.

Este método permite controlar a poluição da água por compostos orgânicos e inorgânicos que são oxidáveis, sendo aplicado maioritariamente no controlo de água potável e de superfície, nomeadamente águas de piscinas, águas de consumo humano, entre outras.

Para águas residuais, existem outros métodos mais adequados para a determinação da matéria orgânica tais como a carência química e bioquímica de oxigénio. Compostos que podem ser também oxidados nas mesmas condições desta análise, tais como o ferro, nitritos, sulfuretos, constituem uma interferência nesta determinação, podendo deturpar o resultado [8].

Até ao momento, a determinação da oxidabilidade realizada pelo Laboratório Tomaz segue a norma NP 731/1969, que recomenda a determinação da matéria orgânica nas águas de consumo humano através de digestão ácida, na presença do permanganato de potássio, segundo a semi equação 2.1 e baseada em 2.2:



A implementação do método de análise do índice de permanganato por fluxo segmentado abordado neste trabalho consistiu numa adaptação da norma ISO 8467:1993.

De acordo com o Decreto Lei nº306/2007 [7], o valor paramétrico (valor máximo fixado) para a oxidabilidade, definido para águas de consumo humano é de 5mg/l de O₂.

2.2 Métodos de análise

No presente trabalho foram realizados estudos com base em dois métodos analíticos aplicados para águas de consumo humano, para a análise do índice de permanganato. Um dos métodos, validado e implementado, serviu como referência para a implementação do novo método.

2.2.1 *Análise Volumétrica*

Em química analítica, as titulações são amplamente utilizadas para determinar as mais variadas espécies: desde ácidos, bases, iões metálicos, proteínas, entre muitas outras.

A titulometria é um grupo de métodos analíticos que permitem determinar quantitativamente a quantidade de reagente necessário para reagir completamente com o analito em estudo. Neste tipo de métodos pode ser observada a mudança de cor de um indicador, uma mudança súbita na voltagem ou corrente entre um conjunto de elétrodos, a alteração de massa, ou mesmo a alteração de absorvância devido às espécies na reação que se observa [9].

Assim, as titulações podem ser de vários tipos: gravimétricas, coulométricas, volumétricas, de neutralização, entre outras.

As titulações gravimétricas envolvem o aparecimento de um precipitado.

Nas titulações coulométricas, a quantidade de cargas em Coulomb necessária para completar a reação com o analito é o valor medido.

As titulações volumétricas, por sua vez, envolvem a medição do volume de reagente gasto na reação com o analito. Nestas últimas, é muitas vezes utilizado um indicador que é um composto cuja propriedade física, normalmente a cor, altera repentinamente quando a titulação está completa. Neste caso, o ponto de equivalência é alcançado quando a quantidade de titulante adicionada é exatamente a necessária para a reação estequiométrica com o analito [10].

Neste tipo de titulação é medido o volume de um reagente, o titulante, contido na bureta, de concentração conhecida, necessário para reagir com o analito presente na solução titulada no interior do erlenmeyer (figura 2.1.)



Figura 2.1 Montagem típica para a realização de uma titulação volumétrica. (Adaptado de [9])

- **Determinação da oxidabilidade por titulação**

A determinação da oxidabilidade pelo método do permanganato em meio ácido que segue a norma NP 731/1969 é realizada por titulação volumétrica.

O permanganato de potássio não é um padrão primário e, por isso, não é possível obter este composto completamente puro e livre de dióxido de manganês (equação 2.3). A existência de substâncias redutoras que podem reagir com o permanganato de potássio, presentes até na água destilada, mesmo que em quantidades vestigiais, podem levar à formação de dióxido de manganês. Assim, é necessário proceder à verificação do seu título utilizando um padrão primário [11].



Quando o permanganato é adicionado à amostra a ser analisada em meio ácido e por ação de um processo de aquecimento, a matéria orgânica nela presente é oxidada enquanto o ião permanganato é reduzido a Mn^{2+} .

Caso a cor rosa, característica deste ião, não se mantenha durante o aquecimento, significa que existe ainda mais matéria orgânica na amostra e, portanto, deve ser adicionado um novo volume da solução de permanganato até a cor rosa persistir. A persistência desta coloração, findo o processo de aquecimento, permite concluir que a matéria orgânica existente reagiu e que o permanganato de potássio se encontra em excesso. A esta quantidade em excesso, é adicionado ácido oxálico, em excesso, até descoloração total da mistura, que é posteriormente titulada com permanganato de potássio até ser obtida uma leve coloração rósea.

2.2.2 *Análise em fluxo contínuo segmentado*

Após a recolha das amostras ser efetuada, existe por diante um processo de manuseamento das mesmas.

Devido à crescente fiabilidade e à redução de custos envolvidos, muitos são os laboratórios que adotam métodos automatizados de manuseio de amostras. Esta automatização pode ser efetuada por métodos discretos ou em fluxo contínuo, sendo este último o relevante para este projeto.

Nos métodos em fluxo contínuo, a amostra é transportada, passando, ao longo do seu percurso pela componente química do analisador onde é submetida a inúmeras operações químicas, até à sua chegada ao detetor em fluxo e finalmente é quantificada pelo software do equipamento, como especificado pela figura 2.2.



Figura 2.2 Esquemática das etapas a que uma amostra é sujeita nos métodos de fluxo contínuo.

Desde a introdução da amostra até à deteção do analito, esta pode ser sujeita a etapas de adição de reagentes, diluições, mistura, entre muitas outras.

Existem dois tipos distintos de sistemas em fluxo contínuo: analisadores em fluxo segmentado e analisadores por injeção em fluxo. Neste projeto, a determinação do índice de permanganato é efetuada pelo método de análise em fluxo contínuo segmentado, daqui em diante denominado por AFS [10].

A análise por fluxo segmentado permite a automatização de diversas técnicas e, mistura, de um modo automatizado, amostras e reagentes.

Neste método, a amostra é aspirada pelo amostrador e bombeada para dentro do sistema, geralmente através de bombas peristálticas, onde é misturada com um ou mais reagentes (figura 2.3).

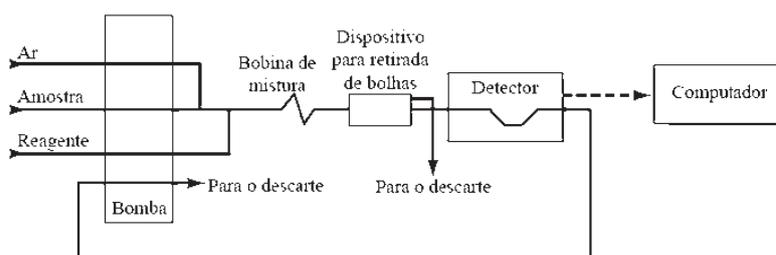


Figura 2.3 Esquema simplificado do percurso da amostra no método por fluxo segmentado (retirado de [10]).

O ar, normalmente introduzido por um diafragma, permite separar cada porção de amostra com bolhas – processo de segmentação. As bolhas de ar confinam a amostra e minimizam a contaminação entre diferentes amostras, pois evitam que a mesma se espalhe ao longo do tubo.

Além disso, permite ainda facilitar a mistura com os reagentes, ao longo das serpentinas existentes nos módulos químicos, garantindo uma mistura o mais homogênea possível [12].

No final, antes da chegada ao detetor, as bolhas de ar são removidas por um dispositivo próprio – desborbulhador – para garantir que não interferem com a resposta analítica.

A mistura da amostra com os reagentes adicionados ao longo da passagem no módulo químico resulta, geralmente, na formação de compostos corados cuja intensidade da cor pode ser medida num fotómetro UV/vis, a um determinado comprimento de onda.

O sinal analítico deste método surge sob a forma de picos e a sua altura relaciona-se diretamente com a concentração do analito em estudo [10].

O uso deste método permite diminuir a quantidade de amostra usada para as determinações analíticas assim como o volume de reagentes, minimizando deste modo os resíduos produzidos. Além disso, existe uma menor manipulação da amostra, pois, neste caso, esta é feita automaticamente, minimizando a intervenção do operador.

É também possível realizar vários parâmetros químicos em simultâneo com o método de análise em fluxo contínuo segmentado, aumentando a capacidade de resposta de um laboratório perante um elevado número de amostras.

- **Determinação da oxidabilidade por AFS**

Na determinação da oxidabilidade por fluxo segmentado, a amostra é misturada com o permanganato de potássio, em meio ácido, adquirindo a coloração rósea característica deste reagente.

Esta mistura é, em seguida, sujeita a um processo de aquecimento para que decorra a oxidação da matéria orgânica.

A ocorrência desta reação provoca uma diminuição na intensidade da coloração rosa, proporcional ao teor de matéria orgânica presente na amostra. É esta diminuição de intensidade que é medida num detetor a 520 nm [13] (comprimento de onda correspondente à absorção máxima do permanganato de potássio).

2.3 Tratamento estatístico de dados

As medidas experimentais possuem um erro aleatório associado, pelo que não é possível obter conclusões com total certeza. A estatística fornece ferramentas que permitem tomar essas decisões com uma elevada probabilidade de estarem corretas ou, pelo contrário, rejeitar outras.

Através da estatística, são analisados erros de natureza aleatória, sendo de extrema importância tentar detectar e eliminar os erros sistemáticos. Enquanto os erros aleatórios provêm de limitações experimentais das medições, traduzindo-se em desvios em relação ao valor esperado e não podem ser totalmente eliminados, os erros sistemáticos têm origem em fatores instrumentais ou de procedimento que tornam os resultados muito discrepantes e podem ser eliminados. Estes últimos traduzem-se em desvios em relação ao valor esperado e podem ser detectados através da análise de materiais certificados ou do uso de diferentes métodos de forma a testar a concordância dos resultados [14].

Assim, um dos principais aspetos a ter em conta num método analítico é que deve ser isento de erros sistemáticos e a resposta analítica deve ser indicativa do valor verdadeiro da quantidade de analito presente numa amostra. Esta propriedade pode ser testada aplicando o método a um padrão, contendo o analito em concentração conhecida.

Ainda assim, na ausência de erros sistemáticos, surgem erros aleatórios que podem impedir a medição correta da quantidade de analito no padrão [14].

2.3.1 Testes de significância

Os testes de significância, também denominados por testes de hipóteses, são usados para determinar se as diferenças obtidas entre a resposta analítica e o padrão são devidas a erros aleatórios ou sistemáticos. Permitem, por isso, avaliar se a diferença entre dois resultados é ou não significativa. Podem ser usados testes para comparar médias experimentais e permitir a deteção de erros sistemáticos. Pode ser também importante comparar os desvios dos resultados obtidos para encontrar possíveis erros aleatórios em dois conjuntos de dados.

Quando é efetuado um teste de significância, são formuladas hipóteses de trabalho: a hipótese nula (H_0) e a hipótese alternativa (H_1). A hipótese nula deve ser formulada no sentido de não haver diferença entre os resultados, apontando para a igualdade, enquanto a hipótese alternativa aponta para a desigualdade. Estas hipóteses permitem abranger o cenário a ser analisado na totalidade e são complementares. H_0 é, geralmente, a hipótese assumida como

verdadeira no início do problema; tal não acontece quando o valor teste, TV, para o teste em estudo excede o valor tabelado/crítico, pois leva à rejeição da hipótese nula [14].

Aquando da aplicação de um teste estatístico a um determinado problema, existem etapas fundamentais que se devem seguir para garantir que a escolha é a mais correta.

É extremamente importante efetuar a formulação do problema: ter em conta o que se pretende avaliar, qual a questão que se impõe. As hipóteses de trabalho, H_0 e H_1 , são importantes para ajudar a definir o problema, assim como definir qual a simetria do teste: unilateral ou bilateral.

A simetria do teste realizado depende das hipóteses de trabalho formuladas: se a hipótese alternativa abordar um teste de desigualdades (símbolos de $>$ ou $<$), em que o objetivo é apenas comparar os extremos da distribuição, o teste é unilateral; nos casos em que a hipótese nula aponta para a igualdade e a alternativa para a desigualdade, a sua simetria é bilateral.

Outra das etapas a ser seguida consiste em definir qual o nível de confiança a que irá ser realizado o teste e, portanto, tirada a conclusão final: para um nível de 95% de confiança ($\alpha=0,05$) ou 99% de confiança ($\alpha=0,01$). O nível de 99% de confiança, apenas é testado quando surgem dificuldades em verificar a aceitação da hipótese nula a 95% ou em situações críticas, como é o caso de tomadas de decisão relativas à calibração.

Finalmente, e para ser possível a comparação com o valor crítico que se encontra tabelado a um determinado nível de confiança e para um determinado número de graus de liberdade, é necessário calcular o valor teste, TV, com base na distribuição estatística correspondente [14].

Em seguida, são apresentados os testes estatísticos que foram aplicados ao longo da realização deste projeto.

- **Teste t**

- a) Comparação de valor experimental com valor de referência*

Por vezes, é necessário verificar se existem eventuais diferenças entre um valor experimental e um valor verdadeiro, de referência. Neste trabalho, esta comparação foi realizada entre o valor médio obtido para as taxas de recuperação e o valor de referência, 100%.

O valor teste para esta comparação é calculado de acordo com a equação que se segue:

$$TV = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s} \quad (2.4)$$

onde:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.5)$$

nas quais \bar{x} corresponde à média dos valores experimentais, s é o respectivo desvio padrão, n corresponde ao número de amostras e μ é o valor de referência [14].

Este valor será depois comparado com o valor tabelado, que pode ser consultado em anexo, na tabela 7.1.

b) Comparação de médias experimentais

Uma das vias de testar os resultados obtidos por um novo método analítico é compará-lo com um outro método normalmente encarado como método de referência por ser já um método implementado e validado.

Neste caso, provenientes de cada método, são obtidas duas médias, \bar{x}_1 e \bar{x}_2 , sendo que a hipótese nula terá por base a afirmação de que os dois métodos dão resultados idênticos, $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2$. Assim, pode ser aplicado o teste de t para comparar estes resultados.

Por serem métodos diferentes, os desvios e respectivos graus de liberdade serão também distintos. Por isso, é importante verificar a existência de diferenças significativas entre os desvios. No caso em que os mesmos não diferem significativamente, deve efetuar-se uma estimativa da dispersão recombinada, s_{pool} , devida aos dois métodos:

$$s_{pool} = \sqrt{\frac{(n_1-1) \times s_1^2 + (n_2-1) \times s_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad (2.6)$$

em que (n_1-1) e (n_2-1) correspondem ao número de graus de liberdade de cada método e s_1^2 e s_2^2 correspondem às respectivas variâncias, dadas pelo quadrado do desvio padrão, descrito na equação 2.5.

Para decidir sobre a diferença significativa entre as médias dos dois métodos, é necessário calcular o valor teste, TV [14]:

$$TV = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_{pool} \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (2.7)$$

Após a obtenção deste valor, pode ser feita a comparação com o valor tabelado da distribuição de t (em anexo na tabela 7.1), para os respectivos graus de liberdade, e um determinado nível de confiança.

- **Teste F**

Ao contrário do teste mencionado anteriormente onde é feita a comparação de médias, nalguns casos, é importante comparar os desvios padrão, para avaliar a presença de erros aleatórios.

O teste F usa a fração das variâncias, s_1^2 e s_2^2 , de dois conjuntos de dados:

$$TV = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (2.8)$$

em que $s_1^2 > s_2^2$ [14].

O valor teste é, neste caso comparado com o valor tabelado pela distribuição de Fisher, das tabelas 7.2, em anexo.

- **Análise de valores discrepantes – Teste de Grubbs**

É frequente observar que, num conjunto de resultados, possam existir valores que diferem de forma significativa dos restantes. A esses valores atribui-se a denominação de valores discrepantes (outliers).

A presença destes valores pode ser avaliada aplicando o teste de Grubbs, recomendado pelas normas ISO. Este teste compara o desvio do valor suspeito relativamente à estimativa central obtida para um conjunto de resultados.

A hipótese nula aqui testada afirma que o valor em causa não difere de forma significativa da estimativa central. Para testar a hipótese nula, H_0 , é calculado o valor teste, TV, de acordo com a equação 2.9:

$$TV = \frac{|x_7 - \bar{x}|}{s_x} \quad (2.9)$$

onde x_7 corresponde ao valor suspeito, \bar{x} é a média do conjunto de resultados e s_x o desvio padrão deste mesmo conjunto [14].

Este teste é geralmente aplicado para os valores situados nos extremos superiores ou inferiores de um conjunto de dados. Os valores tabelados podem ser consultados em anexo, na tabela 7.3.

2.3.2 Conclusão estatística

As decisões estatísticas devem ser tomadas com um dado nível de significância (α), que toma valores de 0,05 ou 0,01. O nível de 0,01 é aplicado quando as decisões finais são críticas, como por exemplo a escolha de um modelo de calibração. O nível de confiança é dado por $100 \times (1-\alpha)$: geralmente de 95 ou 99%.

Existe a possibilidade de se cometerem erros ao tomar uma decisão baseada na probabilidade de aceitação da hipótese nula. Nos casos em que a hipótese nula, H_0 , deveria ser aceite mas é rejeitada, comete-se um erro do Tipo I. Quando a hipótese deveria ser rejeitada mas é aceite, então o erro é do Tipo II. A tabela abaixo permite visualizar de forma esquematizada esta explicação. Os erros do Tipo I podem ser reduzidos alterando o nível de significância: por exemplo passando de 0,05 para 0,01 [14].

Tabela 2.1 Esquematização do tipo de erros cometidos em torno da aceitação/rejeição da hipótese nula.

	H_0 verdadeira	H_0 falsa
Aceitar H_0	✓	Tipo II
Rejeitar H_0	Tipo I	✓

2.4 Validação de métodos analíticos

Qualquer método de ensaio envolve manipulações suscetíveis de acumular erros de cariz sistemático ou aleatório e, por isso, o resultado final pode sofrer alterações. Por isso, é de extrema importância que os laboratórios possam demonstrar, validando os métodos internos que adotam, que os resultados obtidos são fiáveis e podem ser reportados com o nível de confiança desejado.

Para validar um método de ensaio, deve ser feita a sua descrição e caracterização. A descrição dos métodos internos de ensaio deve ser elaborada de modo que qualquer indivíduo com preparação adequada possa reproduzir o que foi feito. Esta descrição deve ser feita, detalhadamente, em documentos que contenham: o título ou designação do ensaio, o seu código identificador, a data de entrada em vigor e os responsáveis pela sua elaboração e aprovação. Para

a descrição do método, é importante que seja apresentado um resumo dos princípios teóricos do mesmo, qual o seu campo de aplicação, o equipamento, material e reagentes necessários para a sua execução, a descrição do processo de calibração, o procedimento seguido para o ensaio e ainda os cálculos usados para os resultados obtidos. Caso se aplique, podem ainda ser registados elementos como a amostragem, as precauções de segurança a ter em conta e outras informações semelhantes.

Antes de colocar um método interno em prática na rotina de um laboratório, é essencial proceder à sua validação. Os requisitos mínimos para tal dependem do tipo de método em causa e incluem o conhecimento de vários parâmetros, tais como: a gama de trabalho, os limiares analíticos (LQ e LD), sensibilidade, precisão, exatidão. Estes parâmetros são relevantes no caso de se tratar de uma análise quantitativa. Caso se trate de uma análise qualitativa, parâmetros como os limiares analíticos e a gama de trabalho não serão relevantes para a sua validação.

A validação de um método envolve o estudo de diversos parâmetros, que serão descritos em seguida e que vão desde a especificidade do mesmo até à definição dos seus limiares analíticos [15].

2.4.1 *Especificidade e Seletividade*

A capacidade de um método distinguir e identificar um analito numa mistura complexa, sem a interferência de outros componentes endógenos ou exógenos, designa-se por seletividade.

Para que um método seja específico, deve permitir distinguir o analito perante outras substâncias que possam fazer parte da matriz da amostra a analisar, garantindo que o sinal obtido é devido apenas ao analito em estudo. Desta forma, é necessário avaliar a possibilidade de existirem interferências presentes na amostra. Essa avaliação pode ser efetuada através de um teste de recuperação, em que são usadas várias amostras com a mesma matriz, variando apenas a concentração do analito de forma conhecida e ao longo de toda a gama de trabalho.

Assim, para que um método seja específico e seletivo, a taxa de recuperação deve ser próxima de 100%. O sucesso obtido nas taxas de recuperação depende do tipo de metodologia usada: enquanto para uns métodos os intervalos de recuperação poderão ser mais alargados, para outros, os intervalos terão de ser menos abrangentes, devido às próprias características do método.

É da responsabilidade do laboratório, aquando da realização dos ensaios de recuperação, ter critérios de aceitação previamente definidos relativamente às taxas de recuperação, baseados em dados credíveis.

Para calcular a taxa de recuperação, %R, de um ensaio, é aplicada a equação que se segue:

$$\%R = \frac{x_t - x_i}{x_{ad}} \times 100 \quad (2.10)$$

onde x_t corresponde ao índice de permanganato determinado após a adição da quantidade de analito conhecida, x_i corresponde ao índice de permanganato inicial da amostra e x_{ad} é a quantidade de analito adicionado à amostra [15].

2.4.2 *Curva de Calibração*

A calibração é o processo pelo qual é possível determinar a relação entre o sinal obtido e a concentração do analito em estudo.

Para proceder à calibração analítica de um equipamento, há vários passos que devem ser seguidos: preparar soluções padrão cuja concentração do analito é conhecida, medir as mesmas no equipamento nas mesmas condições de leitura da amostra e, finalmente, construir um gráfico de calibração que relacione o sinal obtido com a concentração. Este último passo permite determinar a concentração do analito nas amostras, por interpolação. A frequência deste processo de calibração analítica depende dos critérios definidos para a linearidade e estabilidade das curvas de calibração.

Os padrões de calibração devem ser distribuídos de forma equitativa pela gama de trabalho e, nos casos em que o branco é diferente de zero, deve estar incluído na curva de calibração.

Se o método dos mínimos quadrados for utilizado para a construção da curva de calibração, no eixo vertical é sempre representada a resposta instrumental obtida pelo equipamento e no eixo horizontal representam-se as concentrações.

Nos casos em que a curva de calibração é uma função polinomial de primeiro grau e em que se utiliza o método dos mínimos quadrados para as regressões lineares, considera-se à priori que o erro tem uma distribuição normal e que existe homogeneidade de variâncias ao longo da reta.

A equação para uma curva de calibração linear é dada por:

$$y_i = b_0 + b_1 x_i \quad (2.11)$$

onde b_0 corresponde à ordenada na origem e b_1 ao declive da reta (figura 2.4), também definido como fator de resposta ou sensibilidade.

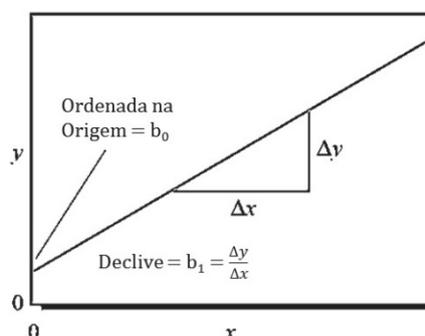


Figura 2.4 Representação da equação de uma reta de calibração linear (adaptado de [10]).

Uma das formas de avaliar a linearidade de uma calibração analítica é através do coeficiente de correlação, R , dado por:

$$R = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x}) \times (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \times \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}} \quad (2.12)$$

em que N corresponde ao número de pontos da reta, x_i e y_i correspondem aos pares de pontos e \bar{x} e \bar{y} são a média dos valores da concentração dos padrões e dos valores do sinal instrumental, respetivamente.

O resultado para este parâmetro pode variar entre -1 e $+1$ e permite avaliar a interdependência entre as variáveis x e y : quanto mais próximo da unidade se encontrar, melhor será a relação de linearidade entre ambas [16]. Geralmente, e apesar de depender dos critérios internos do laboratório, este valor deve ser superior a $0,995$ [15].

2.4.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho de um método corresponde ao intervalo de concentrações onde o analito pode ser determinado com precisão, exatidão e linearidade, através do mesmo.

Quando se adota uma metodologia em que se constrói uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pela homogeneidade de variâncias. No caso de modelos lineares, é

recomendada a aplicação da norma ISO 8466-1 e no caso de modelos polinomiais de 2º grau, a norma ISO 8466-2.

Se os métodos não envolverem a construção de curvas de calibração, a gama de trabalho terá de ser definida previamente e poderá depender de vários fatores tais como a quantidade de amostra disponível ou da visualização de pontos de viragem e volumes gastos, no caso de volumetrias.

Para os modelos de calibração lineares, a norma ISO recomenda que sejam usados 10 pontos de calibração, distribuídos de igual forma pela gama de trabalho. O primeiro e último padrão devem ser analisados em 10 réplicas independentes [15].

A avaliação da gama de trabalho é efetuada obtendo a variância associada ao primeiro e último padrão, s_i^2 , de acordo com as seguintes equações:

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (2.13)$$

Sendo:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^n y_j}{n_i} \quad (2.14)$$

onde, y corresponde ao sinal instrumental obtido, \bar{y}_i é a média dos valores obtidos para cada padrão e n é o número total de réplicas.

Após o cálculo das variâncias, é calculado o valor teste, de acordo com a equação 2.8 de forma a concluir acerca da existência, ou não, de diferenças significativas entre elas. O resultado obtido para o TV é depois comparado com o valor crítico tabelado (F) pela distribuição F de Fisher-Snedecor, para $n-1$ graus de liberdade e ao nível de 99% de confiança: se o valor tabelado pela distribuição, F_{crit} , for maior ou igual ao valor teste, TV, pode afirmar-se que não existe diferença significativa entre as variâncias e, portanto, a gama de trabalho está bem ajustada; caso o valor teste, TV, seja superior ao valor tabelado, F_{crit} , pode afirmar-se que existe diferença significativa entre as variâncias o que requer uma eventual redução da gama de trabalho, até que o valor tabelado seja superior ao valor teste [15].

2.4.4 Linearidade

A linearidade de um método pode ser avaliada através de um modelo estatístico, podendo ser usada como referência a norma ISO 8466, especialmente se forem efetuadas regressões lineares ou não-lineares pelo método dos mínimos quadrados [15].

Partindo de um conjunto de dados, deve ser calculada a função de calibração polinomial de 1ª ordem (ISO 8466-1) e a função de calibração polinomial de 2ª ordem (ISO 8466-2), assim como os respetivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}^2$ e $S_{y^2}^2$. Estes desvios padrão são obtidos através da divisão da soma dos resíduos do modelo de calibração, pelos respetivos graus de liberdade, dados por N-p, em que N é o número de padrões da curva e p o número de parâmetros do modelo em causa.

A variação na variância do ajuste, ΔS^2 , é calculada pela equação que se segue:

$$\Delta S^2 = \frac{(N-2) \times S_{y/x}^2 - (N-3) \times S_{y^2}^2}{\Delta \nu} \quad (2.15)$$

na qual N corresponde ao número de padrões de calibração e $\Delta \nu$ é a diferença do número de graus de liberdade de cada modelo de calibração¹ (este parâmetro tem um valor unitário).

Esta diferença e a variância da função de calibração não linear são sujeitas ao teste de F de forma a avaliar diferenças significativas entre as mesmas.

Assim, é calculado o valor teste, TV, segundo a equação:

$$TV = \frac{\Delta S^2}{S_{y^2}^2} \quad (2.16)$$

Comparando o valor teste com o valor tabelado pela distribuição de F_{crit} , para um nível de 99% de confiança pode concluir-se:

- se o valor teste, TV, não exceder o valor tabelado pela distribuição, F_{crit} , então a função de calibração é um polinómio de 1º grau;

- se o valor teste, TV, for superior ao valor tabelado, F_{crit} , então a função de calibração é um polinómio de 2º grau.

¹ Os graus de liberdade de cada modelo são dados por N-p, em que N corresponde ao número de padrões da curva de calibração e p é o número parâmetros do modelo de ajuste.

Para os casos em que o resultado obtido corresponde a um modelo de calibração não linear, deve ser avaliada a possibilidade de reduzir a gama de trabalho.

Outra via para avaliar a linearidade de um método consiste em recorrer à representação gráfica da função de calibração, bem como calcular e analisar o coeficiente de correlação. Este teste deve ser aplicado com prudência pois, embora este coeficiente seja um bom indicador da correlação, não corresponde necessariamente a uma boa relação de linearidade.

Assim sendo, neste trabalho são abordadas ambas as vias aqui descritas para avaliar a linearidade da determinação do índice de permanganato por análise em fluxo segmentado.

A análise da gama de trabalho bem como o estudo da linearidade devem ser aplicados durante a fase de implementação/validação de um método analítico.

Em rotina, deverá apenas ser sempre avaliada a linearidade da curva de calibração recorrendo à análise do coeficiente de correlação e à representação gráfica da mesma.

2.4.5 *Limiares analíticos*

Um método torna-se obviamente inadequado se não for possível a deteção ou quantificação do analito na amostra. Assim, é de extrema importância definir qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detetado e quantificado pelo método.

Os limites inferiores da curva de calibração são concentrações que indicam a capacidade de deteção e quantificação do método analítico [15].

O limite de deteção define o valor a partir do qual é possível afirmar que o analito está presente com um certo nível de confiança estatístico, ou seja, corresponde ao valor a partir do qual se distingue o sinal do branco do sinal da amostra.

Este valor permite apenas detetar o analito mas não quantificá-lo e, além disso, um sinal obtido inferior a este limite, não implica a ausência do analito na amostra.

O limite de deteção, LD, pode ser calculado aplicando a seguinte equação:

$$LD = \overline{X_0} + 3,3 \times \sigma_0 \quad (2.17)$$

em que $\overline{X_0}$ corresponde à média do teor medido para uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios) e σ_0 corresponde ao desvio padrão associado a X_0 .

O limite de quantificação, LQ, é a menor concentração de analito que pode ser determinada com a devida precisão e exatidão, pelo método.

Para calcular este limiar, aplica-se:

$$LQ = \bar{X}_0 + 10 \times \sigma_0 \quad (2.18)$$

em que \bar{X}_0 corresponde à média do teor medido para uma série de brancos (entre 10 a 20 ensaios) e σ_0 corresponde ao desvio padrão associado a \bar{X}_0 .

2.4.6 *Sensibilidade*

O conceito de sensibilidade é usado inúmeras vezes na descrição de um método analítico sendo aplicado na curva de calibração. A sensibilidade da curva de calibração é representada pela variação do sinal de resposta em relação à variação da concentração do analito, isto é, corresponde à inclinação da mesma.

Esta característica avalia a capacidade de um método ou equipamento distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. Se a curva de calibração for linear, a sensibilidade será constante e não dependerá da concentração, isto é, será igual ao declive da curva. Nos casos em que a curva de calibração não é linear, a sensibilidade irá depender da concentração e não terá um valor único.

É uma característica importante pois além de poder ser usada para comparar a sensibilidade de vários métodos analíticos para um mesmo analito, pode ser avaliada a sua evolução ao longo do tempo e ainda permite comparar a sensibilidade para vários analitos [15].

2.4.7 *Precisão*

Em termos analíticos, a precisão é um termo ambíguo. Um ensaio preciso significa que os resultados obtidos são coerentes, ou seja, pouco dispersos, contudo este parâmetro é avaliado através da estimativa da dispersão dos resultados.

Assim, a precisão permite avaliar a dispersão de resultados em ensaios independentes, em condições definidas, ou seja, corresponde à proximidade entre os resultados obtidos nas mesmas condições e pode ser avaliada de três formas: por repetibilidade, reprodutibilidade ou precisão intermédia.

A repetibilidade expressa a precisão de um método de ensaio realizado em condições idênticas, ou seja, ensaios realizados sobre uma mesma amostra, no mesmo laboratório, com o mesmo analista, equipamento e tipo de reagentes e em curtos intervalos de tempo.

O resultado pode ser expresso a partir do coeficiente de variação de repetibilidade, CV_r , de acordo com a equação 2.19:

$$CV_r = \frac{s_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.19)$$

onde s_{ri} corresponde ao desvio padrão e \bar{x} é a média dos valores obtidos.

Tal como sugere a Relacre [17], o critério de aceitação para este coeficiente de variação, não deve exceder os 10%.

A reprodutibilidade é determinada em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio sobre uma mesma amostra. Neste caso, as condições são variáveis: realizado em laboratórios diferentes, por diferentes analistas, diferentes equipamentos e em tempos distintos. O limite de reprodutibilidade é o valor abaixo do qual se deve situar a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos como mencionado acima.

A reprodutibilidade de um método pode ser obtida a partir da participação em ensaios interlaboratoriais. No entanto, esta via não será aqui descrita visto não ter sido a adotada ao longo deste estágio.

Estas duas características representam os extremos da variabilidade de um método de ensaio.

A precisão intermédia corresponde à situação que medeia as duas anteriores. Refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra usando o mesmo método, mas definindo de forma exata quais as condições variáveis. Por isso, esta característica corresponde à mais representativa da variabilidade dos resultados obtidos num laboratório, sendo a mais aconselhável. Esta característica pode ser determinada efetuando n medições em duplicado ou em ensaio único, sobre a amostra, em condições pré definidas.

Neste caso, a precisão intermédia foi avaliada em termos do coeficiente de variação, CV_{PI} (calculado da mesma forma que CV_r) para uma amostra e um dos padrões pertencentes à curva de calibração, em dias distintos e de acordo com o critério de aceitação previamente definido [15].

Além disso, a precisão intermédia foi ainda avaliada a partir da análise de diversas amostras em duplicado, cobrindo praticamente toda a gama de concentrações. A precisão intermédia, PI, foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$PI = \frac{\bar{x}_{amp}}{d_2} \quad (2.20)$$

em que: \bar{X}_{amp} corresponde à média das amplitudes obtidas e $d_2 = 1,128$ (fator constante para o cálculo do desvio padrão das cartas de controlo de médias). d_2 assume este valor nos casos em que são obtidos dois valores para o cálculo [18].

2.4.8 Exatidão

A exatidão de um método analítico traduz a proximidade do valor obtido relativamente ao valor de referência, tido como verdadeiro, contudo, este parâmetro é avaliado através da discrepância obtida em relação ao valor de referência.

Para avaliar a exatidão de um método, é habitual recorrer a alguns processos, tais como: o uso de materiais de referência certificados, a participação em ensaios interlaboratoriais, a avaliação de ensaios de recuperação, entre outros.

O erro relativo pode ser usado para avaliar a exatidão de um método. O seu valor é determinado através da equação 2.21:

$$\%Er = \frac{\bar{X}_{lab} - X_v}{X_v} \times 100 \quad (2.21)$$

onde: \bar{X}_{lab} é o valor médio dos resultados obtidos experimentalmente e X_v é o valor tido como verdadeiro, por exemplo o valor da concentração de um padrão.

O erro relativo está associado à componente sistemática dos erros num laboratório. É da responsabilidade do mesmo definir qual o critério exigido para este parâmetro, num método.

O desempenho de um laboratório pode ainda, ser avaliado de outra forma, em termos de exatidão: através do cálculo do fator de desempenho, Z_{score} (equação 2.22). Este fator é especialmente usado no caso de participações em ensaios interlaboratoriais, como forma de comparar os desempenhos dos laboratórios participantes.

$$Z_{score} = \frac{\bar{X}_{lab} - X_{ref}}{s_{ref}} \quad (2.22)$$

onde \bar{X}_{lab} corresponde à média dos valores obtidos em condições de repetibilidade, X_{ref} e S_{ref} correspondem ao valor de referência e desvio padrão do valor de referência fornecidos pela entidade organizadora, respetivamente.

De acordo com a norma ISO/IEC 17043/2010 [19], a avaliação pode ser feita seguindo uma escala definida da seguinte forma:

$|Z| \leq 2$: desempenho satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: desempenho questionável

$|Z| > 3$: desempenho insatisfatório

Nesta escala, o laboratório deverá obter um Z_{score} inferior a 2 mas, caso tal não se verifique, deve ser elaborado um plano de ações corretivas [15].

Neste trabalho, a exatidão foi avaliada através dos ensaios de recuperação e padrões preparados no laboratório.

2.4.9 *Comparação de métodos*

Um outro aspeto importante na validação de um método analítico consiste em comparar esse mesmo método com um método semelhante já implementado e validado, tomado como referência. O objetivo desta comparação é avaliar a proximidade dos valores obtidos pelo método em implementação com os valores obtidos pelo método de referência.

Existem várias formas de comparar os resultados obtidos por dois métodos de ensaio, no entanto, aqui apenas será apresentada a comparação através da função de resposta. Além disso, será ainda comparada a resposta analítica obtida para a análise do padrão de resorcinol, em ambos os métodos de análise.

- **Função de resposta**

A aplicação deste teste consiste na análise de uma série de amostras pelos dois métodos a comparar, no mínimo 10, para que seja possível abranger toda a gama de trabalho que se pretende validar.

A concordância entre os métodos é avaliada aplicando uma equação semelhante à equação 2.10: o método de referência deverá ser colocado no eixo das abcissas e o método em

implementação no eixo das ordenadas, pois considera-se que os erros relativos ao eixo das abcissas são desprezáveis face aos do eixo das ordenadas [15].

Assim, se o Método 1 corresponder ao método de referência e o Método 2 ao método em validação, obtém-se:

$$\text{Método 2} = \text{Método 1} \times b_1 + b_0 \quad (2.23)$$

onde b_1 é o declive e b_0 a ordenada na origem, os quais traduzem os fatores de resposta do Método 2 em relação ao Método 1.

Para que os métodos sejam considerados concordantes, é necessário que seja alcançada a igualdade entre o método 1 e o método 2. Isto é, o valor associado à ordenada na origem deverá ser: $b_0 \pm s_{b_0} \times t_{0,05}^b(N - 2)$, contendo o valor zero neste intervalo. Em que s_b corresponde ao desvio padrão da ordenada na origem e $t_{0,05}^b(N - 2)$ corresponde ao valor da distribuição de t tabelado para 95% de confiança e N-2 graus de liberdade (N é o número de amostras analisadas). Para o declive, o intervalo $b_1 \pm s_{b_1} \times t_{0,05}^b(N - 2)$ deverá conter o valor 1 [15].

Estes fatores de resposta, b_0 e b_1 , permitem a estimativa do erro sistemático do tipo constante, no caso em que b_0 não é nulo, e proporcional se b_1 for distinto de 1.

2.5 Controlo de Qualidade

Após a fase inicial que envolve o estudo de um equipamento e respetiva técnica analítica, bem como a aprovação do método, é imperativo que o laboratório controle a sua execução. Este controlo deverá permitir que as condições de execução se mantenham válidas e fiáveis.

Inerente à realização de análises químicas, existe a ocorrência de erros que podem condicionar a confiança e qualidade nos resultados obtidos. Assim, há a necessidade de conhecer e identificar as causas desses erros para tentar eliminá-las e possuir um sistema de deteção dos mesmos, através do controlo do processo analítico [17].

Surge deste modo, a necessidade de o laboratório possuir um sistema de Controlo de Qualidade (CQ) dos resultados obtidos. De acordo com a norma ISO 8402 [20], o controlo de qualidade compreende “o conjunto de técnicas e atividades de carácter operacional utilizadas com vista a responder às exigências da qualidade”. Tal é possível recorrendo ao controlo de qualidade interno e externo, a seguir mencionados.

2.5.1 *Controlo de Qualidade externo*

O controlo de qualidade ao nível externo, é dependente de uma intervenção externa ao laboratório e permitem avaliar a exatidão dos resultados produzidos.

Estas ações incluem usar Materiais de Referência Certificados (MRC), ou padrões equivalentes e ainda participar em ensaios interlaboratoriais. É deste modo que é possível alcançar um dos objetivos da acreditação: a comparabilidade de resultados.

Os MRC são materiais com uma ou mais propriedades bem estabelecidas que são usados na calibração de um equipamento e cuja propriedade é certificada por um processo tecnicamente válido e acompanhado por um certificado [21]. Definem a rastreabilidade das medições químicas, permitindo controlar a exatidão do ensaio. Por isso, devem ser usados na fase inicial da validação ou implementação dos métodos.

O IPAC sugere que estes materiais sejam adquiridos a entidades de credibilidade reconhecida, tais como: o Instituto de Medições e Materiais de Referência (IRMM) da União Europeia, o National Institute for Standards and Technology (NIST) dos Estados Unidos da América [17].

Os ensaios interlaboratoriais são ensaios de um mesmo material por dois ou mais laboratórios, segundo condições previamente definidas [13]. Para efeitos estatísticos, é aconselhável a realização de um mínimo de 6 ensaios interlaboratoriais [16]. As participações em ensaios interlaboratoriais permitem ao laboratório evoluir de forma técnica, uma vez que trabalha com amostras diferentes, cujo valor correto é desconhecido.

Os ensaios de aptidão são uma particularidade dos EIL e devem ser realizados sempre que possível, para avaliar o desempenho dos laboratórios que nele participam. Existem ainda ensaios interlaboratoriais de normalização para analisar as características de um método de análise e ensaios interlaboratoriais de certificação que permitem obter o valor certificado para um material candidato a MRC.

Em qualquer um dos casos adotados, o laboratório deve analisar vários parâmetros: os desvios, diagnosticar e identificar as causas para os desvios inaceitáveis e definir e implementar ações corretivas cuja eficácia seja depois confirmada [17].

2.5.2 *Controlo de qualidade interno*

A implementação de ações de controlo de qualidade interno dependem exclusivamente do laboratório, não sendo, por isso, dependentes de qualquer fator externo.

Para definir o sistema de controlo de qualidade interno, o laboratório pode recorrer a vários métodos, nomeadamente: análise de duplicados, análise de adição de padrão, uso de Materiais de Referência Internos (MRI), técnicas complementares de controlo de qualidade de resultados ou tratamento estatístico de dados (cartas de controlo, por exemplo).

A análise da amostra em duplicado permite detetar eventuais erros acidentais e controlar a repetibilidade do processo. No caso em que são obtidos dois valores muito divergentes, significa que poderá ter ocorrido um erro em algum ponto da análise. Os duplicados devem ser analisados para novas amostras ou amostras de difícil homogeneização.

O método de adição de padrão permite eliminar o efeito que a composição das amostras pode ter no resultado obtido (efeito de matriz).

Os materiais de referência internos, MRI, devem ser estáveis, permitindo o controlo da precisão, dando informações acerca da variabilidade dos resultados, isto é, garantem a rastreabilidade da medida. Podem ser utilizados como MRI, amostras de controlo (de um lote reservado para esse fim), padrões de matriz ajustada com a das amostras, padrões semelhantes (mas independentes dos de calibração) e/ou remanescentes de amostras de ensaios interlaboratoriais. Estes materiais permitem controlar a exatidão (quando rastreados com MRC ou EIL) e a precisão ao longo do tempo.

As cartas de controlo estatístico permitem apresentar de uma forma fácil, clara e eficiente os resultados das ações de CQ [17].

2.5.3 *Cartas de controlo*

As cartas de controlo integram o sistema de controlo de qualidade interno. No entanto, dada a sua relevância, serão aqui mencionadas separadamente.

Esta via de controlo de qualidade é uma das mais aceites internacionalmente como modo de avaliar de forma contínua os resultados obtidos e os tipos de erros que podem surgir. Entidades como a ISO, NIST, entre outras recomendam o seu uso [17].

Existem inúmeros tipos de cartas de controlo, no entanto, aqui apenas serão mencionadas as seguintes: cartas de indivíduos e cartas de amplitudes.

- **Cartas de controlo de indivíduos**

Para a elaboração deste tipo de cartas de controlo, parte-se do princípio de que a ocorrência dos erros é aleatória e, portanto, a distribuição dos pontos em torno da média segue uma distribuição normal (distribuição gaussiana). São representadas várias linhas de referência, como sugere a figura 2.5.

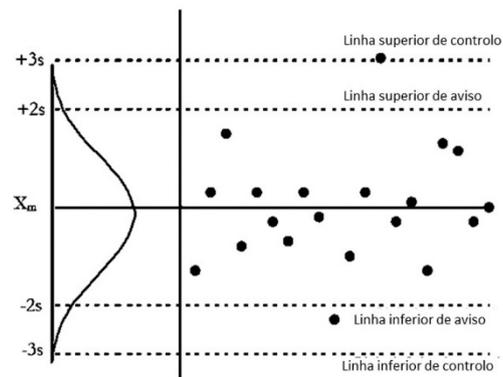


Figura 2.5 Representação das linhas de referência que constituem as cartas de controlo de médias ou indivíduos [17].

As linhas de referência representadas na figura referem-se à probabilidade de um ponto se situar a uma determinada distância do valor médio: pode situar-se a 2 desvios padrão do valor médio, denominadas por linhas de aviso ($X_m \pm 2s$), o que corresponde a uma probabilidade de aproximadamente 5%. Ou, por outro lado, pode situar-se a mais de 3 desvios padrão ($X_m \pm 3s$), designadas por linhas de controlo, o que corresponde a cerca de 0,3% de probabilidade.

Este tipo de cartas de controlo é aplicado quando não é possível repetir medições, em condições de repetibilidade, pois em análises de rotina é, por vezes, difícil agir desta forma por motivos económicos e de tempo.

As anomalias ou pontos fora de controlo podem ser detetados de acordo com as indicações constantes da norma ISO 8258, abaixo representadas na figura 2.6.

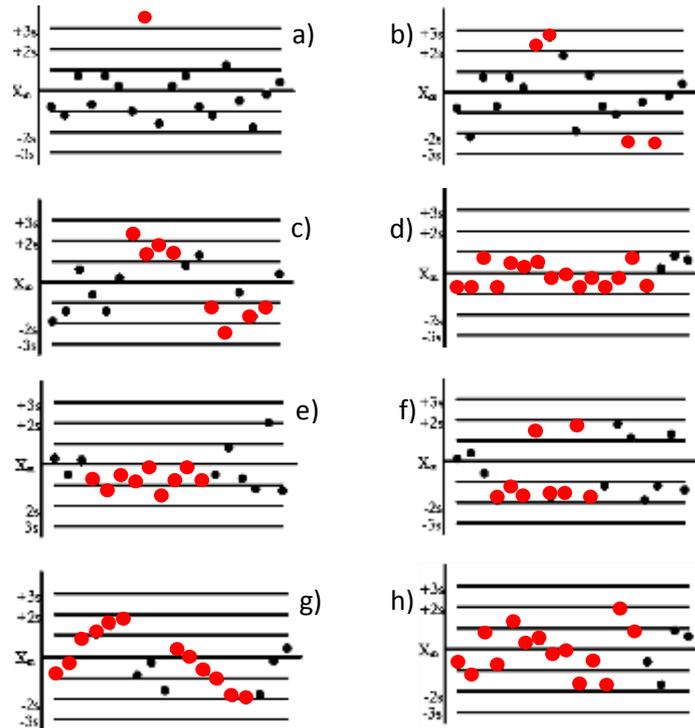


Figura 2.6 Representação de pontos fora de controle (a vermelho) nas cartas de controlo: a) 1 ponto fora de $\pm 3s$; b) 2 pontos em 3 consecutivos fora de $\pm 2s$; c) 4 pontos em 5 consecutivos fora de $\pm 1s$; d) 15 pontos consecutivos dentro de $\pm 1s$; e) 9 pontos consecutivos de um dos lados da média; f) 8 pontos consecutivos fora de $\pm 1s$; g) 6 pontos consecutivos a subir ou descer; h) 14 pontos consecutivos alternados a subir e a descer.

É importante manter os dados presentes nas cartas de controlo atualizados e ter estes tópicos em atenção para que, ao serem detetados problemas a este nível, se possam tomar as devidas medidas corretivas.

- **Cartas de controlo de amplitudes**

Para a construção deste tipo de cartas, parte-se do pressuposto que o método se encontra sob controlo estatístico e, portanto, os desvios entre as réplicas se mantêm nos limites previamente definidos.

É necessário efetuar o cálculo do valor médio das diferenças entre duplicados ou da amplitude, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{amplitude relativa} = \frac{x_1 - x_2}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.24)$$

onde x_1 e x_2 são os resultados obtidos para a amostra e o respetivo duplicado e \bar{x} corresponde à média entre x_1 e x_2 [17].

2.5.4 *Estimativa de incertezas*

O conceito de incerteza é já antigo sendo, por vezes, confundido com o conceito de erro de um resultado. De fato, nenhuma medida é absoluta, e, por isso, qualquer processo tem associado a si uma incerteza.

Recentemente, a estimativa das incertezas tem vindo a ganhar mais importância na área da Química, ao nível de controlo de qualidade, uma vez que, estes valores permitem muitas vezes a tomada de decisões importantes tanto a nível de saúde pública, ao nível judicial ou apenas por carácter informativo [22].

A incerteza de um resultado permite avaliar o intervalo de valores em que esse mesmo resultado se pode inserir, tendo em conta todas as fontes de erro que para ele contribuíram. Além da importância que tem para o laboratório, pois permite que o mesmo conheça a 'qualidade' da sua medida e auxilia a melhorar a mesma, o cálculo de incertezas é também relevante para o cliente. Este último necessita deste valor para tomar a decisão correta, por vezes uma decisão que pode ser de cariz jurídico [22].

Com vista a melhorar a qualidade dos resultados entregues aos clientes e de forma a controlar da forma mais atual possível os mesmos, o Laboratório Tomaz adotou a recente norma ISO 11325:2012 para efetuar a estimativas das incertezas dos métodos implementados e em implementação.

Para aplicar as indicações constantes da norma, foi necessária a sua análise prévia, bem como a construção de folhas cálculo em Microsoft Excel®, validadas a partir dos exemplos anexados na mesma.

2.5.5 *ISO 11352:2012*

A qualidade da medida depende inevitavelmente da incerteza que lhe está associada. A estimativa da incerteza é, geralmente, uma propriedade característica de cada resultado. No entanto, de acordo com a norma ISO 11352:2012 [18], se o resultado provém de um processo onde o controlo de qualidade é apertado, a estimativa individual de incertezas não é necessária, pois os resultados são obtidos sob condições bem controladas.

A norma ISO 11352:2012 especifica um conjunto de procedimentos, constituídos por diversas etapas, que permitem chegar à estimativa das incertezas, consoante os dados disponíveis.

Estes procedimentos incluem para esta estimativa, as componentes sistemática e aleatória dos métodos e são baseados nos dados de controlo de qualidade e de validação dos mesmos. Estas componentes formam a base para a estimativa da incerteza, ao nível de 95% de confiança, representado por um fator de expansão, $k=2$. É de salientar a importância que adquirem os dados selecionados para a estimativa, pois devem ser representativos de todo o método e ainda das matrizes e gamas de concentração utilizadas.

A conjugação da estimativa pelas vias sistemática e aleatória é apresentada de forma esquematizada nesta norma (figura 2.7), de forma a simplificar o entendimento da mesma e a auxiliar na escolha de qual o melhor rumo a seguir para a determinação das mesmas.

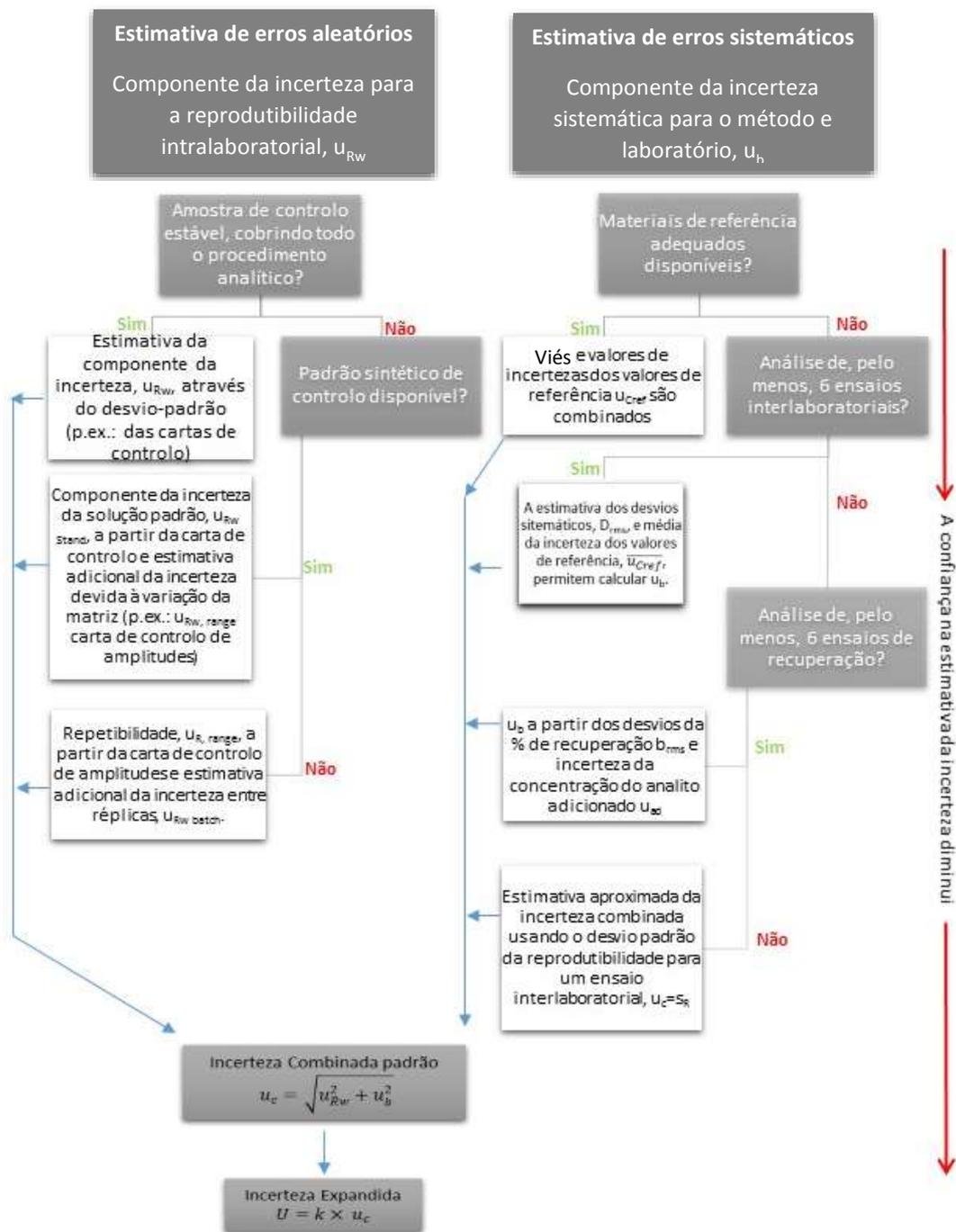


Figura 2.7 Representação esquemática do procedimento constante na norma ISO 11352:2012, referenciado como auxílio na estimativa das incertezas. (Adaptado de [18]).

Para a determinação das estimativas, é necessário escolher qual a base da mesma, isto é, quais os melhores dados a serem usados, de modo que sejam os mais representativos para a incerteza.

Assim, após selecionar qual a melhor via a tomar para o cálculo de cada componente da incerteza, pode ser feita a sua estimativa e, finalmente, incluir ambas no cálculo da incerteza combinada, que é depois reportada como incerteza expandida do método [18].

Neste trabalho serão apresentadas as estimativas da incerteza expandida para o método de determinação do índice de permanganato pela via titulométrica e por análise em fluxo segmentado.

A estimativa foi realizada de formas distintas, pois os dados disponíveis para cada método são também eles distintos uma vez que o método em implementação possui menos dados disponíveis.

- **Incerteza expandida da determinação do índice de KMnO_4 (via titulométrica) - $U_{\text{Tít}}$**

- a) Componente sistemática*

O cálculo desta componente da incerteza foi, após consulta do fluxograma, feita através dos resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais.

Para determinar esta estimativa, através da comparação dos resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais, é necessário que o laboratório tenha participado, no mínimo, em 6 destes ensaios [18].

A componente sistemática, u_b , pode ser calculada de acordo com a equação 2.25:

$$u_b = \sqrt{D_{rms}^2 + \overline{u_{C,ref}}^2} \quad (2.25)$$

onde D_{rms} corresponde à raiz quadrada do somatório da diferença entre o valor obtido e o valor de referência e $\overline{u_{C,ref}}$ é a incerteza média dos valores de referência, calculada para os valores obtidos para os laboratórios participantes.

Nesta equação:

$$D_{rms} = \sqrt{\frac{\sum D_i^2}{n^{\circ} \text{ ensaios}}} \quad (2.26)$$

e

$$D_i = \frac{v_{ob} - v_{ref}}{v_{ref}} \times 100 \quad (2.27)$$

sendo D_i a diferença entre o resultado obtido, V_{ob} , e o valor de referência, V_{ref} .

Além disso, a incerteza média, $\overline{u_{Cref}}$, é dada por:

$$\overline{u_{Cref}} = \frac{u_{Cref,i}}{n^{\circ} \text{ ensaios}} \quad (2.28)$$

onde:

$$u_{Cref,i} = 1,25 \times \frac{S_{robusto}}{\sqrt{n^{\circ} \text{ participantes}}} \quad (2.29)$$

na qual, $u_{Cref,i}$ é a incerteza do valor de referência para a amostra do ensaio interlaboratorial i , $S_{robusto}$ corresponde ao desvio padrão de reprodutibilidade para a amostra do ensaio interlaboratorial i e $n^{\circ} \text{ participantes}$ corresponde ao número de laboratórios que participaram no ensaio da amostra i .

b) Componente aleatória

A componente aleatória, u_{RW} , pode, segundo o procedimento normativo definido, ser definida através do desvio padrão, s , e da média, \bar{x} , de um conjunto de dados experimentais

$$u_{RW} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.30)$$

c) Incerteza final

A incerteza combinada, u_c , pode ser calculada pela conjugação das duas anteriores:

$$u_c = \sqrt{u_{RW}^2 + u_b^2} \quad (2.31)$$

Considerando um fator de expansão, k , com valor igual a 2, correspondendo a um nível de 95% de confiança, é possível determinar a incerteza expandida, U_{tit} , pela equação 2.32.

$$U_{tit} = k \times u_c \quad (2.32)$$

• Incerteza expandida da determinação do índice de $KMnO_4$ (via AFS) - U_{AFS}

a) Componente sistemática

Uma vez que apenas foi realizada uma participação em ensaios interlaboratoriais durante o período em que foi adotado este procedimento, para determinar as estimativas da incerteza para a análise em fluxo segmentado do índice de permanganato, foram usados os dados referentes aos ensaios de recuperação, também inseridos em cartas de controle.

A componente sistemática, u_b , pode ser calculada seguindo a equação 2.33.

$$u_b = \sqrt{b_{rms}^2 + u_{ad}^2} \quad (2.33)$$

onde, b_{rms} é a raiz quadrada dos desvios para os ensaios de recuperação e u_{ad} corresponde à incerteza da solução do analito adicionada.

Nesta equação:

$$b_{rms} = \sqrt{\frac{\sum b_i^2}{n^\circ \text{ ensaios}}} \quad (2.34)$$

em que:

$$b_i = \frac{\%R - 100\%}{100\%} \quad (2.35)$$

ou seja, b_i corresponde ao desvio da taxa de recuperação, %R, do ensaio i , relativamente à recuperação completa (100%).

A incerteza da solução do analito adicionada, u_{ad} , subdivide-se em duas componentes: a incerteza do volume adicionado, u_V e a incerteza da concentração da solução adicionada, u_{conc} .

A incerteza do volume adicionado, u_V , é formada duas componentes, a sistemática, $u_{V,sys}$, e a aleatória, $u_{V,al}$:

$$u_{V,sys} = \frac{E_{Vmax}}{\sqrt{3}} \quad (2.36)$$

em que: E_{Vmax} é o desvio máximo para o volume, dado pela incerteza definida pelo fabricante sobre o volume total.

A componente aleatória, $u_{V,al}$, é obtida através de repetidas pesagens da quantidade de água pipetada pelo material usado para o ensaio de recuperação, segundo a equação 2.37:

$$u_{V,al} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (2.37)$$

sendo que, s corresponde ao desvio padrão e \bar{x} à média dos valores obtidos.

A incerteza do volume, u_V , pode assim ser determinada com base na equação 2.38:

$$u_V = \sqrt{\sum u_{V,sys}^2 + \sum u_{V,al}^2} \quad (2.38)$$

A incerteza associada à concentração do analito, u_{conc} , pode ser calculada considerando a contribuição de cada uma das componentes sistemática, $u_{conc,sys}$, e aleatória, $u_{conc,al}$, obtidas pelas incertezas fornecidas pelos fabricantes, de acordo com as equações 2.36 e 2.37.

Assim, a incerteza associada ao analito adicionado, u_{ad} é dada por:

$$u_{ad} = \sqrt{u_v^2 + u_{conc}^2} \quad (2.39)$$

b) Componente aleatória

Esta componente da incerteza foi obtida pela mesma via que para o método titulométrico, usando os dados de um padrão de controle.

c) Incerteza final

A incerteza combinada, u_c é novamente estimada partindo da conjugação de cada uma das componentes anteriores:

$$u_c = \sqrt{u_{RW}^2 + u_b^2} \quad (2.40)$$

Para estimar a incerteza final, U_{AFS} , ($k = 2$) aplica-se a equação 2.41:

$$U_{AFS} = k \times u_c \quad (2.41)$$

3 Procedimento Experimental

Neste capítulo serão abordados em detalhe os procedimentos experimentais usados para a determinação do índice de permanganato: o método titulométrico e a análise por fluxo segmentado. Será feita a discriminação dos reagentes usados, bem como as várias etapas imprescindíveis em cada um.

O trabalho experimental foi realizado na totalidade nas instalações do Laboratório Tomaz, usando equipamentos e materiais certificados para o devido efeito.

3.1 Análise volumétrica

O procedimento atualmente em vigor e acreditado para a determinação da oxidabilidade no Laboratório Tomaz é o previsto na norma NP-731 1969 e é a seguir descrito.

3.1.1 Reagentes

a) Solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4): esta solução é preparada adicionando 500 mL de H_2SO_4 concentrado ($d=1,84$ g/ml) a 1500 mL de água destilada.

b) Solução de ácido oxálico 0,005 M (0,01 N): dissolver 0,6303 g de ácido oxálico em 50 mL de H_2SO_4 concentrado, perfazendo um volume total de solução de 1L.

c) Solução de permanganato de potássio 0,002 M (0,01 N): diluição da solução comercial de 0,02 M (*Fischer Chemical, Potassium permanganate solution 0,02 M, J/6900/15*) medindo 100 mL desta para um balão volumétrico de 1000 mL e perfazer o volume com água destilada. O título desta solução deve ser verificado diariamente.

d) Solução de Resorcinol ($C_6H_6O_2$) 0,5 g/l: dissolver 0,25g de Resorcinol para um volume final de 500 mL de água destilada, em balão volumétrico.

e) Solução padrão de Resorcinol 10 mg/l: diluição da solução de 0,5 g/l – pipetar 2 mL da solução e) para um balão volumétrico de 100 mL.

f) Solução padrão de Resorcinol 1 mg/l: diluição da solução 10 mg/l – pipetar 10 mL da solução anterior para um balão volumétrico de 100 mL [23].

3.1.2 Procedimento

- Preparação dos Erlenmeyers: medir 100 mL de água destilada, juntando 10 mL da solução H_2SO_4 e 5 mL de KMnO_4 0,002 M. Agitar e colocar o regulador de ebulição e levar à ebulição durante 10 minutos. Retirar da fonte de aquecimento, aguardar o arrefecimento e adicionar ácido oxálico até desaparecimento da coloração rosa. De seguida, adicionar solução de KMnO_4 0,01N até aparecimento de leve coloração rosa, persistente (pelo menos 30 segundos). Este conteúdo deve ser mantido nos erlenmeyers até serem utilizados, mesmo após a sua utilização para a determinação das amostras.

- Verificação do título da solução de KMnO_4 0,002M (diariamente): após a preparação descrita na alínea a) e mantendo o conteúdo do erlenmeyer, adicionar 10 mL de ácido oxálico 0,005 M e titular com a solução de permanganato de potássio 0,002M até observação de leve cor rosa, persistente durante pelo menos 30 segundos. Volume gasto de permanganato – V_0 .

- Preparação das amostras: de forma a homogeneizar a amostra, esta deve ser agitada imediatamente antes da sua utilização. Caso apresentem turvação, as amostras devem ser filtradas ou decantadas.

- Determinação da oxidabilidade: medir 100 mL da amostra para os erlenmeyers previamente preparados, adicionando 10 mL de H_2SO_4 e o volume de KMnO_4 gasto na verificação do título (V_0). Levar à ebulição durante 10 minutos. Durante este tempo, a coloração rosa deve permanecer. Caso contrário, deve ser adicionado outro ou outros volumes V_0 até que a cor rosa seja permanente. Anotar o número de volumes V_0 adicionados.

- Retirar os erlenmeyers da fonte de aquecimento e deixar arrefecer. Adicionar 10 mL de ácido oxálico 0,01N e titular com a solução de KMnO_4 0,002 M até leve coloração rósea. Anotar o volume gasto – V_1 [23].

O resultado é obtido a partir da equação 3.1:

$$\frac{(n-1) \times V_0 + V_1}{V_0} \times 8 \text{ mg } (O_2)/l \quad (3.1)$$

onde n corresponde ao número de volumes V_0 adicionados à amostra, V_0 corresponde ao volume, em ml, de permanganato gasto na verificação do título e V_1 corresponde ao volume de permanganato, em ml, gasto na amostra.

3.2 Análise em fluxo contínuo segmentado

O presente procedimento teve como referência normativa a norma ISO 8467:1993, constituindo uma adaptação da mesma. Serão aqui descritos os reagentes utilizados, bem como o procedimento e ainda os principais cuidados a ter de forma a otimizar o funcionamento do analisador de fluxo segmentado.

3.2.1 Reagentes

a) Solução de Permanganato de Potássio 0,02M: dissolver 3,16g de KMnO_4 para um volume final de 1 litro de solução.

b) Solução de H_2SO_4 4M: juntar 224 mL de ácido sulfúrico (95-97%) a 700 mL de água destilada e, após arrefecimento, aferir o volume para 1 litro.

c) Reagente ácido: num balão volumétrico de 1000 mL juntar 20 mL da solução a) e 74,4 mL da solução b), perfazendo o volume final com água destilada. Ferver esta solução durante 1 minuto e deixar arrefecer.

d) Solução padrão de ácido oxálico 0,01582 M (equivalente a 1g/l de KMnO_4)²: dissolver 1,9941g de ácido oxálico di-hidratado num balão volumétrico e perfazer o volume final de 1 litro [13].

3.2.2 Procedimento

- **Curva de calibração**

Os padrões para a curva de calibração são preparados a partir da solução padrão de ácido oxálico referida em 3.2.1 d).

Para efetuar a calibração analítica deste método, prepararam-se 6 padrões de ácido oxálico, por diluição da solução de 1000 mg/l, de acordo com a tabela abaixo.

² A explicação para esta equivalência será feita no tópico 'Unidades de medida em análise por fluxo segmentado'.

Tabela 3.1 Concentração e designação dos padrões de ácido oxálico usados na curva de calibração da determinação do índice de permanganato.

Concentração (mg/l KMnO ₄)	Designação	Volume a pipetar da solução de ácido oxálico 0,01582 M (ml)
2	P ₂	-- ¹
5	P ₅	0,5
10	P ₁₀	1
20	P ₂₀	2
30	P ₃₀	3
50	P ₅₀	5

¹ preparado a partir de P₂₀ (pipetar 10 ml do P₂₀).

- **Operações de otimização**

Antes de iniciar a análise, devem ser seguidos passos importantes para otimizar o desempenho do analisador por fluxo segmentado [13], tais como:

1. Lavagem do sistema durante 15 minutos com uma solução de ácido oxálico (5g/100 mL)
2. Lavagem do sistema durante 15 minutos com água destilada
3. Iniciar a passagem do reagente ácido no sistema e deixar estabilizar durante 30 minutos
4. Proceder a 10 leituras do padrão de maior concentração

Na determinação da oxidabilidade por fluxo segmentado, a amostra dá entrada no sistema e é misturada com o permanganato (reagente ácido). De seguida, esta mistura passa por 2 etapas de aquecimento a 95°C, para assegurar que a reação de oxidação é completa. Após este aquecimento, há descoloração da mistura cuja intensidade é medida no detetor a 520 nm, como se pode observar na figura 3.1.

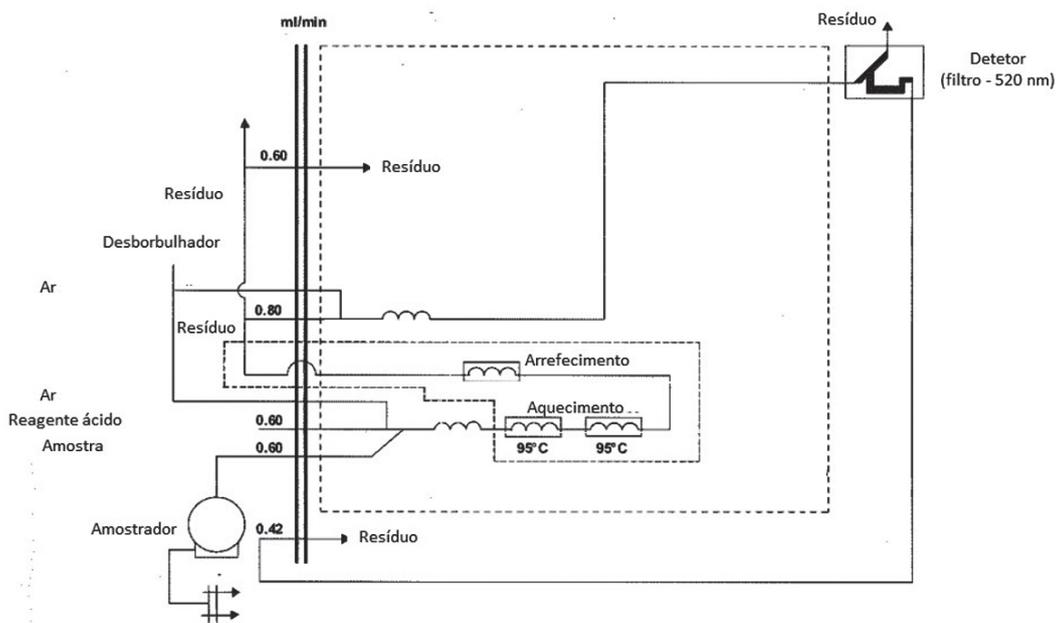


Figura 3.1 Diagrama esquemático do método da determinação do índice de permanganato por fluxo segmentado (adaptado de [13])

- **Resposta analítica**

Neste tipo de análise, a resposta analítica é representada sob a forma de picos cuja altura diminui proporcionalmente à intensidade da descoloração causada pela reação do permanganato com a matéria orgânica.

Uma vez que podem ocorrer variações dos fatores que influenciam a resposta final do aparelho, ao longo de uma sessão de trabalho vão sendo feitos alguns ajustes importantes. A linha de base construída pela passagem do reagente ácido pode sofrer variações ao longo da sessão de trabalho. Podem ocorrer descidas ou subidas devido a várias circunstâncias tais como mudanças de temperatura, mudanças no reagente, entre outras. Estas variações são compensadas aplicando um fator de correção da linha de base, C'_n (equação 3.2), para o cálculo da altura do pico obtido [24].

$$C'_n = C_n - (n - a) \times \frac{(W_b - W_a)}{b - a} - W_a \quad (3.2)$$

onde C_n corresponde à altura de pico não corrigida para a amostra no copo número n , b e a correspondem à posição numérica em que se encontra a lavagem posterior e anterior, respetivamente, em relação ao pico de interesse, W_b corresponde à altura do pico de lavagem após o pico de interesse e W_a corresponde à altura do pico de lavagem que precede o pico de interesse. W_b é a altura a que surge o pico da lavagem posterior ao pico da amostra no copo n .

A figura 3.2 demonstra quais os principais pontos considerados na aplicação deste fator de correção.

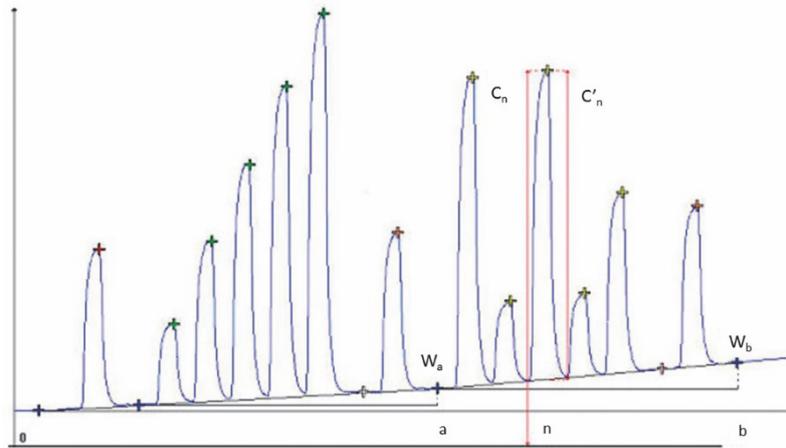


Figura 3.2 Representação dos pontos importantes a ser usados para o fator de correção da linha de base.

Assim, a altura de pico corrigida, C''_n , é obtida através da equação 3.3.

$$C''_n = C'_n \times \frac{D_1}{\frac{D_b - D_a}{b-a} \times (n-a) + D_a} \quad (3.3)$$

em que b e a correspondem ao número do copo posterior e precedente do *drift*³, respectivamente, D_1 corresponde à altura do pico do primeiro *drift* (após a calibração); D_b e D_a correspondem às alturas dos picos dos *drifts* posterior e anterior ao pico da amostra [24]. A figura 3.3 ilustra a aplicação desta equação ao cálculo da altura corrigida dos picos.

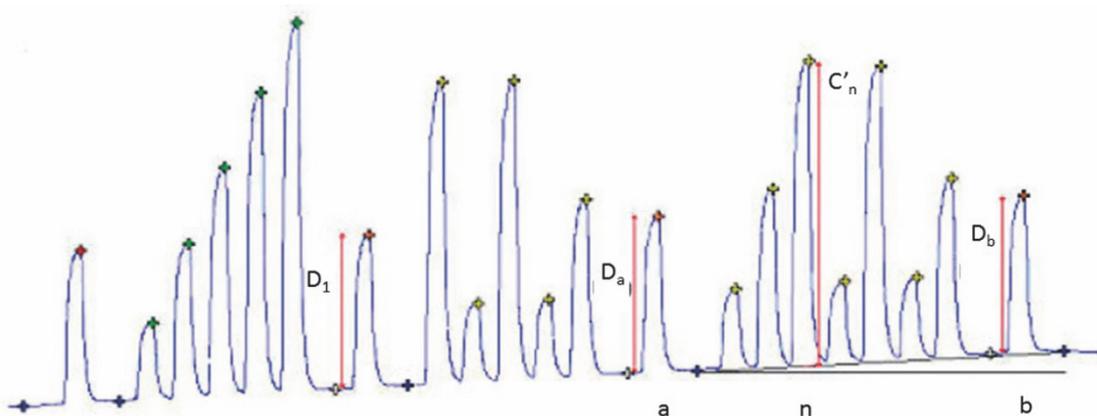


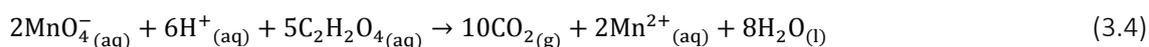
Figura 3.3. Representação dos valores usados para o cálculo da altura de pico corrigida.

³ O *drift* é um padrão usado ao longo da sessão de trabalho, sendo usado para considerar quaisquer alterações que possam ocorrer na linha de base. Este padrão é, normalmente, o segundo mais alto na curva de calibração e pode, ou não, estar incluído nesta.

- **Unidades de medida em AFS**

A determinação do índice de permanganato por fluxo segmentado permite obter picos cuja altura é diretamente proporcional à quantidade em mg/l de KMnO_4 contida nas amostras, consoante a intensidade da descoloração detetada.

A solução de ácido oxálico usada para preparar os padrões da curva de calibração possui uma concentração de 0,01582 M, o que corresponde a 1 g/l KMnO_4 . Esta conversão é efetuada através da informação obtida pela análise da seguinte reação:



Ou seja, 2 mol de permanganato reagem com 5 mol de ácido oxálico. Portanto, 0,01582 mol/l de ácido oxálico correspondem a $6,328 \times 10^{-3}$ mol/l de permanganato. Assim, multiplicando este valor pela massa molecular do permanganato de potássio (158 gmol^{-1}), obtém-se a concentração de 1g/l de KMnO_4 .

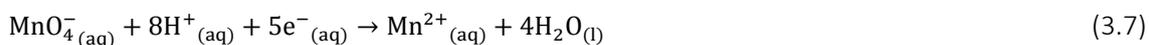
De acordo com o Decreto Lei nº 306/2007, o valor da oxidabilidade é dado em mg/l de O_2 [7], portanto, é necessário converter a quantidade de permanganato de cada padrão e amostras em mg/ O_2 . Esta conversão é realizada segundo a equação 3.5.

$$Z = \frac{P}{3,95} \quad (3.5)$$

onde Z corresponde a mg/l O_2 , P a mg/l KMnO_4 e 3,95 é o fator resultante da equação 3.6:

$$\frac{MM_{\text{KMnO}_4} \times \frac{4}{5}}{MM_{\text{O}_2}} \quad (3.6)$$

na qual o fator 4/5 provém da análise das equações a seguir apresentadas:



Além disso, as unidades do sinal obtido neste método são apresentadas em D.U. (Unidades Digitais). Para simplificação dos resultados, estes serão expressos em A.U., segundo o fator de conversão: $1DU = 1 \times 10^{-6}AU$ [24].

4 Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados experimentais obtidos para o estudo realizado neste projeto, assim como a respetiva discussão dos mesmos. Embora existam critérios de validação definidos para aceitação de resultados por parte do Laboratório Tomaz, serão aqui realizados testes estatísticos para garantir a correta aceitação dos mesmos.

4.1 Validação do método

Este ponto contém os resultados referentes ao estudo realizado para a implementação do método de análise do índice de permanganato por fluxo segmentado, consoante a norma ISO 8467:1993.

4.1.1 *Definição e validação da gama de trabalho*

Selecionar qual a gama de trabalho em que a análise irá decorrer é muito importante para permitir a quantificação do analito de forma precisa e exata. A concentração dos padrões usados deve abranger toda a gama de trabalho e estar distribuída equitativamente na curva de calibração. É comum recorrer ao teste de homogeneidade de variâncias para proceder a esta validação.

A gama de trabalho pretendida para a determinação do índice de permanganato em análise por fluxo segmentado foi de 2 a 50 mg/l KMnO_4 (0,51-12,67 mg/l O_2).

Para testar a homogeneidade de variâncias, os padrões de maior e menor concentração P_{50} e P_2 , respetivamente, foram analisados em 10 réplicas independentes e o sinal obtido, em AU, encontra-se na tabela 4.1. Este teste foi repetido em três dias diferentes (D1, D2 e D3), para uma maior confiança nos resultados obtidos.

Tabela 4.1 Resultados obtidos em 10 ensaios para o primeiro e ultimo padrão da gama de trabalho, em unidades arbitrárias, nos dias 1, 2 e 3.

Padrão (mg/l KMnO ₄)		Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀
D1	P ₂	0,0584	0,0544	0,0574	0,0543	0,0542	0,0618	0,0587	0,0531	0,0541	0,0582
	P ₅₀	1,330	1,338	1,325	1,332	1,335	1,338	1,342	1,344	1,343	1,333
D2	P ₂	0,0507	0,0507	0,0469	0,0507	0,0518	0,0505	0,0517	0,0560	0,0502	0,0506
	P ₅₀	1,379	1,380	1,382	1,378	1,370	1,379	1,379	1,386	1,388	1,379
D3	P ₂	0,0662	0,0618	0,0647	0,0606	0,0691	0,0658	0,0663	0,0676	0,0652	0,0648
	P ₅₀	1,400	1,411	1,403	1,391	1,398	1,1398	1,395	1,397	1,397	1,398

Em primeiro lugar, foi testada a existência de outliers em cada um dos conjuntos de dados obtidos para cada padrão, aplicando o teste de Grubbs.

Foram avaliados os valores máximos e mínimos de AU para cada conjunto e calculados os respectivos valores de teste, representados na tabela 4.2, com base na equação 2.9.

Tabela 4.2 Resultados obtidos para o teste de Grubbs realizado ao nível de 95% de confiança, para n=10, nos 3 dias do estudo (D1, D2 e D3).

	Valor teste - P ₂	Valor teste - P ₅₀
D1	1,89	1,85
D2	2,26	2,03
D3	1,84	2,29

Analisando os dados obtidos pelo teste de Grubbs apresentados na tabela 4.2, para a detecção de valores anómalos, verifica-se que o valor crítico, $G_{crit} = 2,29$ para $n=10$ e ao nível de 95% de confiança, é superior aos valores teste para cada um dos padrões. Assim, pode concluir-se que não existem outliers nos conjuntos de dados obtidos para os dias 1, 2 e 3.

Para avaliar a existência, ou não, de diferença significativa entre as variâncias de cada padrão, os valores teste foram calculados, segundo a equação 2.8.

Os valores obtidos para os valores teste de cada dia encontram-se na tabela abaixo, assim como o valor tabela pela distribuição de Fisher bilateral, F_{crit} , para um nível de 99% de confiança.

Tabela 4.3 Resultados obtidos para os ensaios realizados nos três dias do estudo, relativamente à homogeneidade de variâncias, para um nível de 99% de confiança.

Dia	Valor teste
1	4,58
2	4,79
3	4,39

A partir dos resultados obtidos para cada dia em que foi efetuado o estudo é possível verificar que os valores teste são inferiores ao valor crítico de Fisher, $F_{crit}=6,54$, ao nível de 99% de confiança e para 9 graus de liberdade. Deste modo, pode considerar-se que a hipótese nula é válida, ou seja, não existe diferença significativa entre as variâncias de P_2 e P_{50} , em cada um dos dias.

Assim, conclui-se que a gama de trabalho é adequada à determinação do índice de permanganato por análise em fluxo segmentado.

4.1.2 *Especificidade e seletividade*

A seletividade deste método de análise foi definida através da determinação da percentagem de recuperação, %R, de 10 ensaios independentes de diferentes amostras analisadas entre os meses de Janeiro e Março. O critério de aceitação definido pelo LT, segundo as indicações da Relacre, para a percentagem de recuperação varia de 80 a 120%.

Na tabela abaixo é possível observar os resultados obtidos relativamente a este estudo.

Tabela 4.4 Resultados obtidos para os ensaios de recuperação para diferentes amostras.

Amostra (mg/l KMnO ₄)	Reforço adicionado (mg/l KMnO ₄)	Valor obtido (mg/l KMnO ₄)	%R
1,00	10,00	11,25	102,50
3,45	10,00	13,84	103,90
8,19	10,00	18,19	100,00
5,99	10,00	15,75	97,60
3,72	10,00	14,31	105,90
5,51	10,00	15,15	96,40
2,95	10,00	13,82	108,70
0,89	10,00	11,43	105,40
5,32	10,00	16,23	109,10

O valor médio de recuperação obtido neste período foi de 103,28% e o desvio padrão de 4,55. A aplicação do teste de Grubbs permitiu confirmar a inexistência de valores anômalos no conjunto de dados pois o valor teste, $TV = 1,51$ é inferior ao valor crítico para $n=9$, $G_{crit}=2,215$, ao nível de 95% de confiança.

Para concluir acerca da igualdade estatística deste resultado com o valor de referência, 100%, foi aplicado o teste de t. Assim, o valor teste obtido, calculado segundo a equação 2.4, foi 2,16 e o valor tabelado pela distribuição de t para o nível de 95% de confiança e 8 graus de liberdade foi 2,31. Uma vez que o valor teste é inferior ao valor tabelado, pode concluir-se que o valor experimental é estatisticamente equivalente ao de referência, para um nível de 95% de confiança.

Deste modo, a taxa de recuperação média obtida para este método é indicativa da especificidade e seletividade do mesmo.

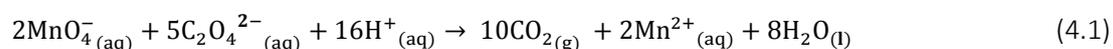
4.1.3 Linearidade

Na maioria dos métodos analíticos, a determinação do analito é feita através da relação entre a resposta analítica do aparelho e a concentração. Deste modo, é extremamente importante saber como se relaciona a resposta analítica com a concentração do analito para que,

a partir da equação da curva de calibração, seja possível obter a quantidade do mesmo existente na amostra.

Habitualmente, a calibração de um método analítico é realizada por obtenção do sinal analítico (absorvância, altura do pico, entre outros) como função da concentração conhecida do mesmo. Utilizam-se, para isso, padrões externos cuja concentração do analito é conhecida e variável.

Na determinação do índice de permanganato por AFS, os padrões utilizados na curva de calibração (referidos em 3.2.2.) são de ácido oxálico sendo, por isso, estudada a diminuição da intensidade da cor, resultante da reação de uma mesma quantidade de permanganato com o ácido oxálico, na presença de ácido sulfúrico, segundo a reação:



O uso destes padrões na curva de calibração permite não só a validação dos resultados analíticos obtidos, como também o controlo da análise.

A linearidade deste método foi primeiramente avaliada pelo coeficiente de correlação correspondente à representação gráfica da reta de calibração obtida numa das sessões de trabalho. A resposta instrumental obtida para cada valor teórico dos padrões da reta de calibração encontra-se na tabela que se segue:

Tabela 4.5 Valor teórico (mg/l KMnO₄) e sinal obtido (A.U.) na sessão de trabalho designada para o estudo da linearidade.

Padrão	Valor teórico (mg/l KMnO ₄)	Sinal obtido (A.U.)
P ₂	2,00	0,0603
P ₅	5,00	0,151
P ₁₀	10,00	0,285
P ₂₀	20,00	0,565
P ₃₀	30,00	0,852
P ₅₀	50,00	1,412

A representação gráfica dos valores registados na tabela 4.5, é apresentada na figura 4.1.

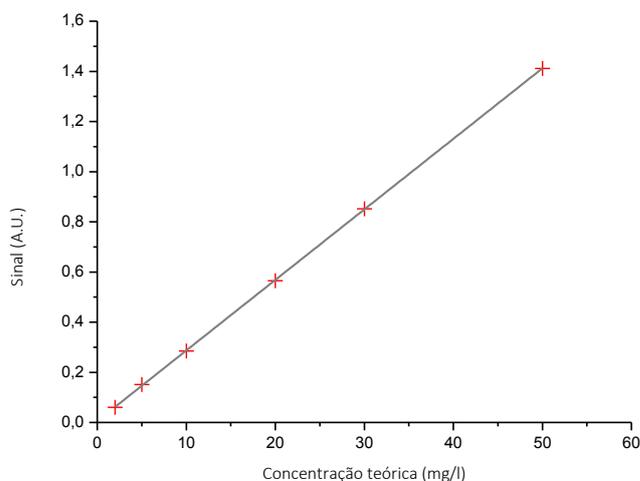


Figura 4.1 Representação gráfica do sinal obtido para os padrões da curva de calibração, em função da concentração.

Para esta representação, foi obtido um coeficiente de correlação, $R = 1,00$ e a reta, cuja equação é $y = 0,028x + 0,0057$, definida pelo método dos mínimos quadrados assume um comportamento linear, apontando para um bom ajuste de uma equação de 1º grau.

No entanto, e de encontro ao mencionado no subcapítulo 2.4, a análise do coeficiente de correlação e da representação gráfica da curva de calibração podem não ser suficientes para determinar qual o modelo de ajuste mais adequado. Como tal, para avaliar qual a relação existente entre o sinal obtido pelo fluxo segmentado e a concentração do analito, foram usadas curvas de calibração obtidas em dias e semanas diferentes, permitindo uma maior confiança no resultado para a determinação do melhor modelo de ajuste deste método.

Os resultados obtidos em dias diferentes, em unidades arbitrárias (A.U.) para cada padrão, encontram-se na tabela 4.6.

Tabela 4.6 Intensidade do sinal obtido nas curvas de calibração, em dias diferentes.

Padrões (mg/l KMnO ₄)	A.U. (d1)	A.U. (d2)	A.U. (d3)	A.U. (d4)	A.U. (d5)
P ₂	0,059	0,076	0,061	0,060	0,057
P ₅	0,144	0,150	0,147	0,151	0,144
P ₁₀	0,280	0,320	0,285	0,285	0,287
P ₂₀	0,570	0,577	0,578	0,565	0,573
P ₃₀	0,817	0,855	0,842	0,852	0,819
P ₅₀	1,385	1,400	1,403	1,412	1,395

Seguindo como referência a norma ISO 8466, como já mencionado anteriormente, é possível decidir qual o melhor modelo de ajuste para a equação da curva de calibração: se um polinómio de 1º grau, aqui denominado por Modelo 1, ou se um polinómio de 2º grau, denominado por Modelo 2. As equações destes polinómios são representadas abaixo.

$$\text{Modelo 1: } y = b_1x + b_0 \quad (4.2)$$

$$\text{Modelo 2: } y = b_2x^2 + b_1x + b_0 \quad (4.3)$$

Onde: y corresponde ao sinal analítico obtido, x é a concentração do analito, b_0 é a ordenada na origem, b_1 corresponde ao declive e b_2 é o coeficiente quadrático.

A partir dos desvios-padrão residuais e da variação nas variâncias calculadas para os modelos de ajuste, é possível avaliar qual o mais adequado para o ajuste. Estes valores encontram-se compilados na tabela 4.7.

Tabela 4.7 Resultados obtidos para as diferenças das variâncias e desvios padrão residuais dos modelos de ajuste.

	ΔS^2	$S_{y/x}^2$	$S_{y^2}^2$
D1	$2,64 \times 10^{-6}$	$9,94 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-4}$
D2	$9,91 \times 10^{-5}$	$1,41 \times 10^{-4}$	$1,55 \times 10^{-4}$
D3	$3,52 \times 10^{-5}$	$4,26 \times 10^{-5}$	$4,51 \times 10^{-5}$
D4	$1,50 \times 10^{-6}$	$1,26 \times 10^{-5}$	$1,62 \times 10^{-5}$
D5	$6,04 \times 10^{-6}$	$1,35 \times 10^{-4}$	$1,78 \times 10^{-4}$

Os resultados da tabela 4.7 foram posteriormente usados para o cálculo do valor teste para a aplicação do teste de Fisher, no qual o TV é comparado com o valor tabelado pela distribuição de F unilateral, ao nível de 99% de confiança.

Primeiramente, é importante definir qual a hipótese nula, H_0 , e alternativa, H_1 : a hipótese nula afirma que o desvio residual do ajuste, $S_{y^2}^2$, do polinómio de 2º grau será maior ou igual ao desvio do ajuste, $S_{y/x}^2$, do polinómio de 1º grau (hipótese 1); por outro lado, a hipótese alternativa sugere que o desvio do ajuste do polinómio de 1º grau será maior do que o desvio do ajuste do polinómio de 2º grau (hipótese 2).

$$H_0: S_{y/x}^2(\text{Modelo 1}) \leq S_{y^2}^2(\text{Modelo 2}) \quad \text{Hipótese 1}$$

$$H_1: S_{y/x}^2(\text{Modelo 1}) > S_{y^2}^2(\text{Modelo 2}) \quad \text{Hipótese 2}$$

Os valores resultantes da aplicação deste teste permitiram concluir que o modelo que melhor se ajusta à curva de calibração da determinação do índice de permanganato por fluxo segmentado é o Modelo 1, ou seja, um modelo de ajuste linear. Tal pode ser confirmado através da análise dos valores teste obtidos nos 5 dias, TV (dia 1) = 0,020, TV (dia 2) = 0,64, TV (dia 3) = 0,78, TV (dia 4) = 0,093 e TV (dia 5) = 0,034, que são inferiores ao valor tabelado, $F_{\text{crit}} = 34,12$, obtido ao nível de 99% de confiança e 1 e 3 graus de liberdade⁴, comprovando assim a aceitação da hipótese nula.

⁴ Neste teste, 1 grau de liberdade resulta da diferença dos graus de liberdade dos modelos de ajuste (3-2) e 3 é o número de graus de liberdade do modelo polinomial de 2º grau (6-3).

A aceitação da hipótese nula indica que o desvio do ajuste do polinómio de 2º grau é maior do que o do modelo de ajuste linear e, por isso, o modelo do polinómio de 1º grau é o que melhor se ajusta.

Na figura abaixo encontram-se duas das representações gráficas das retas obtidas para os dias 1 e 2. As restantes podem ser consultadas em anexo.

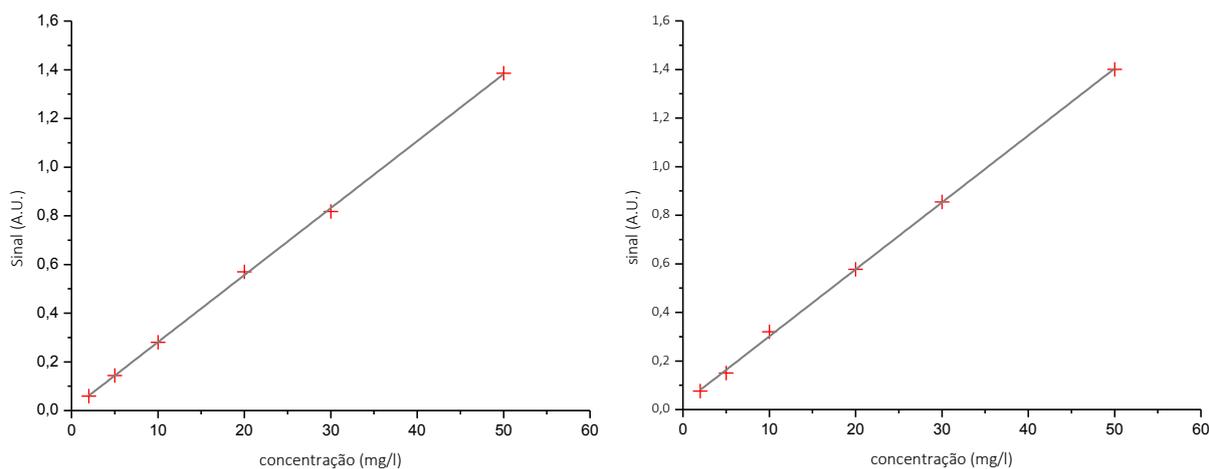


Figura 4.2 Representação gráfica das retas obtidas para o estudo da linearidade, nos dias 1 e 2: a) dia 1 – $y=0,0275x + 0,006$, $R=0,9997$; b) dia 2 – $y=0,0275x + 0,0254$, $R= 0,9994$.

Pode observar-se mais uma vez que os valores dos coeficientes de correlação são próximos de 1 e se encontram dentro dos critérios definidos pelo LT ($R \geq 0,999$), corroborando a teoria de que o método de AFS é ajustado por um polinómio de 1º grau.

4.1.4 *Limiares analíticos*

A estimativa dos limiares analíticos para este método foi realizada através da análise de brancos. Foram analisados brancos (água destilada) em 20 ensaios independentes e os resultados encontram-se na tabela 4.8.

Tabela 4.8 Resultados obtidos para a leitura de 20 brancos por AFS.

Concentração (mg/l KMnO ₄)									
0,625	0,560	0,431	0,523	0,430	0,427	0,567	0,434	0,438	0,549
0,698	0,480	0,435	0,645	0,506	0,534	0,463	0,454	0,604	0,532

A média dos valores obtidos foi, $\bar{X}_0 = 0,517$ mg/l, sendo o respetivo desvio padrão, $\sigma_0 = 0,081$ mg/l. A aplicação do teste de Grubbs permitiu verificar a ausência de valores discrepantes no conjunto de dados, pois o valor teste, $TV = 2,23$, é inferior ao valor crítico para $n=20$, $G_{crit}=2,708$, ao nível de 95% de confiança.

Após conversão dos resultados de mg/l KMnO₄, para mg/l O₂, foi possível obter os limiares analíticos.

O limite de deteção, LD, é definido pela equação 2.17 e o valor obtido foi de 0,20 mg/l O₂.

Para o cálculo do limite de quantificação, LQ, foi aplicada a equação 2.18 e obteve-se um valor de 0,34 mg/l O₂.

4.1.5 Precisão

O estudo da precisão de um método pode, como já mencionado anteriormente, ser realizado de diferentes formas. Neste processo de validação, a precisão foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermédia.

- **Repetibilidade**

A avaliação da precisão em termos de repetibilidade na determinação do índice de permanganato por análise em fluxo segmentado foi efetuada em duas amostras e dois dos padrões da curva de calibração.

As amostras usadas para o estudo são o tipo de amostra mais analisadas neste parâmetro: água de piscina (denominadas por Piscina I e II), sendo, por isso, mais representativas para o estudo em causa. Foram analisadas 10 réplicas independentes de cada amostra e padrão, no

mesmo dia, pelo mesmo analista, usando a mesma curva de calibração e os mesmos reagentes. Os resultados obtidos para cada uma, em mg/l KMnO_4 encontram-se na tabela 4.9.

Tabela 4.9 Resultados obtidos para as 10 réplicas independentes (R_1 a R_{10}) realizadas nas duas amostras de piscina e nos padrões de 20 e 30 mg/l de KMnO_4 , em condições de repetibilidade.

Amostra	mg/l KMnO_4									
	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}
Piscina I	4,40	3,98	4,00	4,83	3,96	3,77	3,68	4,25	3,94	3,97
Piscina II	4,06	4,08	4,13	4,09	3,99	4,04	4,01	4,13	4,11	4,00
Padrão 20	20,95	21,11	21,39	20,78	21,64	21,46	21,46	21,86	21,87	21,95
Padrão 30	29,93	30,05	29,79	30,04	29,70	29,89	29,85	30,05	30,10	30,37

Os resultados apresentados foram previamente validados, por aplicação do teste de Grubbs, para deteção da presença de eventuais valores anómalos. Os valores teste obtidos foram: Piscina I = 2,24, Piscina II = 1,46, Padrão 20 = 1,67 e Padrão 30 = 2,08. De acordo com os valores indicados, não foram detetados valores anómalos nos conjuntos de dados, ao nível de 95% de confiança, pois o valor tabelado para $n=10$, $G_{crit} = 2,29$, é superior.

Para avaliar a repetibilidade do método, foi calculado o coeficiente de variação de cada conjunto de dados, de acordo com a equação 2.19.

A partir dos valores obtidos para a amostra Piscina I, obteve-se um desvio padrão de repetibilidade, $S_{ri}=0,34$ mg/l e a média dos valores da concentração de permanganato em mg/l, $\bar{x}=4,08$ mg/l, resultando num coeficiente de variação, $CV_r = 8,25\%$.

Para a amostra Piscina II, o desvio obtido foi de $S_{ri}=0,054$ mg/l e a concentração média dos valores, $\bar{x}=4,06$ mg/l, sendo o coeficiente de variação, $CV_r = 1,32\%$.

O resultado para o padrão de 20 mg/l de KMnO_4 , relativamente ao desvio-padrão foi, $S_{ri}=0,40$ mg/l e a média dos valores da concentração de permanganato em mg/l, $\bar{x}=21,45$ mg/l. O cálculo do respetivo coeficiente de variação foi de, $CV_r=1,87\%$.

Finalmente, relativamente aos resultados obtidos para o padrão de 30 mg/l de KMnO_4 , obteve-se $S_{ri}=0,19$ mg/l e $\bar{x}=29,98$ mg/l, originando um coeficiente de variação, $CV_r = 0,63\%$.

Assim, analisando os coeficientes de variação obtidos para o estudo da repetibilidade, pode verificar-se que todos os valores se encontram abaixo de 10% e, por isso, estão dentro dos critérios de aceitação definidos pelo laboratório, tal como recomendado pela Relacre [17].

- **Precisão intermédia**

Uma vez que o estudo da precisão através da precisão intermédia é o mais representativo da variabilidade dos resultados, foram avaliados uma amostra e um padrão, nestas condições.

O padrão de 10 mg/l (P_{10}) de $KMnO_4$ e as análises resultantes de uma amostra (Amostra A)⁵, analisados em dias diferentes pelo método de fluxo segmentado, encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 4.10 Resultados obtidos para o padrão de 10 mg/l de $KMnO_4$ e para a amostra A, em condições de precisão intermédia.

	mg/l $KMnO_4$									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
P_{10}	10,28	10,91	10,83	10,02	10,31	9,99	10,35	10,48	10,88	10,45
Amostra A	9,90	8,31	8,11	8,70	8,03	7,84	8,67	9,67	8,82	7,79

Para concluir acerca deste estudo, foi feito o cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada conjunto de resultados.

Relativamente ao padrão, P_{10} , obteve-se uma média, $\bar{x}=10,45$ mg/l $KMnO_4$, um desvio, $S_{P1}=0,35$ mg/l, resultando num coeficiente de variação, $CV_{P1}= 3,38\%$.

Para a amostra, o valor médio da concentração foi, $\bar{x}=8,58$ mg/l de $KMnO_4$, o desvio, $S_{P1}=0,73$ mg/l e o respetivo coeficiente de variação foi de, $CV_{P1}= 8,47\%$.

Ambos os coeficientes de variação são inferiores ao limite estabelecido de 10%, sendo também notória a maior variabilidade nos resultados obtidos para a amostra, relativamente ao padrão, pois na sua análise influem eventuais efeitos de matriz.

A precisão intermédia foi também avaliada através da análise de amostras em duplicado. Os valores resultantes desta análise encontram-se na tabela 4.11, assim como o cálculo do valor da amplitude relativa.

⁵ A amostra foi homogeneizada e dividida em 10 porções idênticas, para ser analisada ao longo dos dias.

Tabela 4.11 Resultados para a análise de amostras em duplicado e respetivo cálculo da média e amplitude dos valores.

Amostra (mg/l KMnO ₄)	Duplicado (mg/l KMnO ₄)	Média (mg/l KMnO ₄)	Amplitude relativa (%)	Amostra (mg/l KMnO ₄)	Duplicado (mg/l KMnO ₄)	Média (mg/l KMnO ₄)	Amplitude relativa (%)
20,70	20,41	20,55	1,42	16,57	15,97	16,27	3,65
30,22	30,12	30,17	0,32	30,61	34,35	32,48	11,53
2,99	2,92	2,95	2,22	1,96	1,90	1,93	3,00
2,12	1,98	2,05	6,66	33,22	32,47	32,84	2,28
3,32	3,32	3,32	0,21	3,05	3,08	3,06	0,91
5,25	5,08	5,16	3,36	11,12	11,59	11,35	4,16
1,30	1,36	1,33	4,77	4,94	5,12	5,03	3,69
5,53	4,57	5,05	18,91	2,44	2,46	2,45	0,54
8,53	8,25	8,39	3,26	27,16	27,41	27,29	0,89
40,31	40,57	40,44	0,64	4,49	4,49	4,49	0,15

A análise de amostras em duplicado permitiu obter um valor médio para as amplitudes relativas de, $\overline{X_{amp}} = 3,6 \%$, o que conduz a um valor de precisão intermédia, $PI = 3,22\%$. Este valor é inferior ao limite definido pela IUPAC de 10%.

4.1.6 Exatidão

A participação em ensaios interlaboratoriais é de extrema importância para definir a exatidão de um método. Uma vez que, apenas se realizou um ensaio interlaboratorial neste período de estágio, não foi possível concluir acerca da exatidão deste método por esta via.

Ainda assim, foi calculado o desempenho do LT nesta participação, a partir da equação 2.20. Foi obtido um $Z_{score} = 0,18$ ($X_{ref} = 8,1$ mg/l, $s_{ref} = 0,6$ e $X_{lab} = 7,99$ mg/l) que, de acordo com a escala definida pelo Guia ISO 17043 [19], corresponde a um desempenho satisfatório.

Outra forma de concluir acerca da exatidão de um método consiste na análise de ensaios de recuperação de amostras. Os valores aceites encontram-se conformes ao critério de aceitação

definido pelo laboratório, de 20%, de acordo com a legislação prevista. A taxa de recuperação média obtida foi de 103,28%.

Além disso, foram também analisados padrões preparados no laboratório, usados na curva de calibração do método. Foram analisados os padrões intermédios da curva: 20,0 e 30,0 mg/l KMnO_4 e o padrão de menor concentração: 2,0 mg/l KMnO_4 (em 10 ensaios independentes). Para avaliar a exatidão destes resultados, foi calculado e avaliado o erro médio relativo (tabela 4.12) dos resultados obtidos.

Tabela 4.12 Resultados do erro médio relativo para cada padrão usado no estudo da exatidão.

Padrão (mg/l KMnO_4) - X_v	\bar{X}_{lab}	\bar{Er} (%)
2,00	2,100	5,00
20,00	21,448	7,24
30,00	29,977	0,077

Analisando os resultados obtidos, é possível verificar-se que todos os resultados obtidos cumprem o critério de aceitação definido pelo LT ($\%Er < 10\%$), indicando uma boa exatidão do método.

4.1.7 *Sensibilidade*

Anteriormente, neste capítulo, foi já provada a linearidade do método em causa. Assim sendo, a sensibilidade do mesmo é definida pelo declive da reta de calibração.

Como tal, foi obtido o valor médio bem como o desvio para o declive das curvas entre os períodos de janeiro a março foi de $0,028 \pm 0,001$ mg/l O_2 , a partir da carta de controlo de médias elaborada para controlar os declives ao longo das sessões de trabalho.

4.1.8 *Comparação dos métodos*

- **Função de resposta**

A comparação entre o método titulométrico, método tomado como referência, e o método de análise em fluxo segmentado, foi realizada através de regressão linear.

Foram analisadas 41 amostras em ambos os métodos, abrangendo toda a gama de trabalho. Os resultados foram em seguida colocados num modelo de regressão linear criado no Microsoft Excel®, obtendo-se a representação gráfica que se segue:

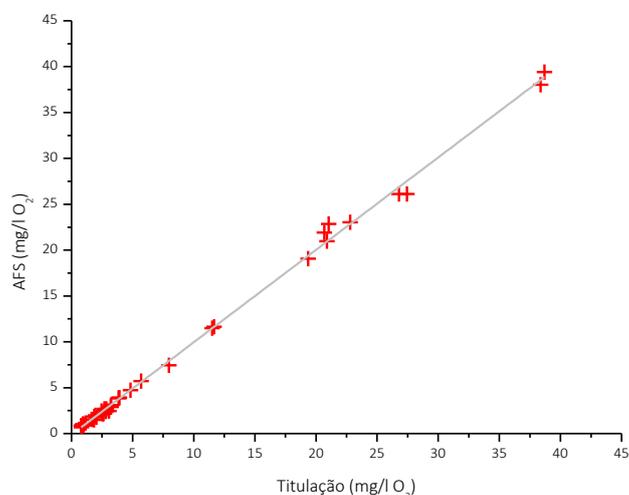


Figura 4.3 Função de resposta resultante da comparação do método titulométrico com a análise em fluxo segmentado.

Os valores obtidos para os parâmetros da reta ajustada aos pontos experimentais, encontram-se compilados na tabela 4.13.

Tabela 4.13 Resultados obtidos da aplicação de regressão linear para comparação dos métodos de análise.

Parâmetro da curva	Valor	Desvio padrão (s)	$t_{0,05}^b(N - 2)$	Parâmetro \pm $s \times t_{0,05}^b(N - 2)$
b_1 - declive	1,0074	0,0073	2,023	1,007 \pm 0,015
b_0 – ordenada na origem	-0,121	0,096		-0,12 \pm 0,19

Analisando a tabela 4.13, pode verificar-se que os métodos são comparáveis pois cumprem os requisitos descritos no subcapítulo 2.4.9: o valor obtido para o declive foi de $1,007 \pm 0,015$ incluindo, portanto, o valor 1 no intervalo e para a ordenada na origem $-0,12 \pm 0,19$, o valor zero insere-se neste intervalo.

- **Análise do padrão de Resorcinol**

Para aumentar a confiança obtida na comparabilidade entre os dois métodos, os padrões de resorcinol usados no método titulométrico (1,8 mg/l O₂ e 18,0 mg/l O₂), foram injetados no analisador de fluxo segmentado (analisados em 10 réplicas) em dois dias distintos e os resultados são apresentados na tabela seguinte.

Tabela 4.14 Resultados obtidos na análise dos padrões de resorcinol 1,8 e 18,0 mg/l O₂ no analisador de fluxo segmentado.

Padrão 1,8 mg/l O ₂										
D1	1,66	1,62	1,60	1,63	1,67	1,65	1,62	1,85	1,66	1,67
D2	1,76	1,72	1,70	1,73	1,77	1,75	1,72	1,85	1,76	1,77
Padrão 18,0 mg/l O ₂										
D1	16,25	16,39	16,75	17,02	16,89	17,54	17,68	17,91	18,06	18,14
D2	16,95	16,52	16,54	16,65	16,60	16,96	17,15	17,08	17,12	17,40

Em primeiro lugar, procedeu-se à verificação da existência de outliers nos conjuntos de dados obtidos, aplicando o teste de Grubbs.

O valor tabelado, $G_{crit}=2,29$, foi obtido para o nível de 95% de confiança e $n=10$. A este nível, verificou-se a existência de um valor anómalo (1,85 mg/l) nos dados do padrão de 1,8 mg/l O₂ (dia 1), pois o valor teste, $TV=2,66$, era superior ao tabelado.

Após a remoção deste valor, repetiu-se o procedimento anterior, mas agora para um valor tabelado, $G_{crit}=2,215$, obtido ao nível de 95% de confiança e para $n=9$. Sendo o valor teste, $TV=1,57$, inferior ao valor tabelado, os dados ficaram validados.

Relativamente ao conjunto de dados do padrão de 1,8 mg/l para o dia 2, não se verificou a presença de outliers, pois o valor teste, $TV=2,25$, obtido é inferior ao valor tabelado ($G_{crit}=2,29$).

Os dados referentes ao padrão de 18,0 mg/l não indicaram a presença de valores discrepantes nos dias 1 e 2, pois os valores teste, $TV=1,46$ e $1,65$, respetivamente, são inferiores a $2,29$.

Os mesmos padrões foram analisados, nos mesmos dias, por titulação, em 3 réplicas e os resultados constam na tabela 4.15.

Tabela 4.15 Resultados obtidos na análise dos padrões de 1,8 e 18,0 mg/l O₂ pelo método titulométrico.

Padrão 1,8 mg/l O ₂		Padrão 18,0 mg/l O ₂	
D1	D2	D1	D2
1,70	1,72	17,90	17,28
1,74	1,68	17,94	17,28
1,82	1,72	18,10	17,20

O mesmo teste estatístico foi aplicado aos valores obtidos para o método titulométrico, onde o valor tabelado, $G_{crit}=1,154$, foi obtido ao nível de 95% de confiança e para $n=3$.

Os dados referentes ao padrão de 1,8 mg/l não apresentaram valores anómalos, pois os valores teste dos dias 1 e 2, $TV=1,09$ e $1,15$ respetivamente, são inferiores ao valor tabelado. O mesmo se verificou no caso do padrão de 18,0 mg/l, em que os valores teste do dia 1, $TV=1,13$ e do dia 2, $TV=1,00$, surgem novamente inferiores ao valor tabelado.

As médias bem como os respetivos desvio padrão, s , dos conjuntos dados já validados encontram-se compilados na tabela 4.16.

Tabela 4.16 Resumo dos valores médios e respetivos desvio padrão da análise do padrão de resorcinol.

	P _{1,8} mg/l O ₂				P ₁₈ mg/l O ₂			
	AFS		Titulação		AFS		Titulação	
	Média	s	Média	s	Média	s	Média	s
D1	1,641	0,027	1,751	0,062	17,26	0,69	17,98	0,11
D2	1,753	0,041	1,707	0,023	16,90	0,30	17,253	0,046

O passo seguinte consistiu em verificar a existência de homogeneidade das variâncias entre os resultados obtidos, através da aplicação do teste de F.

O valor tabelado pela distribuição de Fisher, F_{crit} , para o padrão de 1,8 mg/l O₂, foi obtido para um nível de 95% de confiança e para $n=2$ (titulação) e $n=8$ (AFS), no caso do dia 1 e $n=9$ (AFS) e $n=2$ (titulação), no caso do dia 2.

Para o padrão de 18,0 mg/l O₂ o valor de F_{crit} , foi obtido para um nível de 99% de confiança e para n=2 (titulação) e n=9 (AFS). Neste caso foi necessário alargar o nível de confiança pois a 95% não seria possível garantir a homogeneidade de variâncias.

O valor tabelado pela distribuição de F, para os dados do dia 1 do padrão de 1,8 mg/l, $F_{crit}=6,06$, revelou-se superior ao valor teste, $TV=5,27$, ao nível de 95% de confiança, por isso, existe homogeneidade de variância entre estes dados. No caso dos valores obtidos para o dia 2, deste mesmo padrão, o valor teste, $TV=3,20$, foi novamente inferior ao valor tabelado, $F_{crit}=5,71$, indicando a mesma conclusão.

Também para os resultados obtidos no padrão de 18,0 mg/l, se confirmou a homogeneidade de variâncias em ambos os dias de análise: no dia 1 o valor teste foi, $TV=41,88$ e no dia 2 foi, $TV=43,29$, sendo inferiores ao valor tabelado, ao nível de 99% de confiança, $F_{crit}=199,39$.

Confirmada a homogeneidade entre as variâncias para os resultados de cada padrão, é necessário proceder à estimativa da dispersão recombinada, S_{pool} , devida aos dois métodos em comparação. Este valor foi obtido segundo a equação 2.6 e os resultados para cada padrão nos respetivos dias de análise, encontram-se na tabela 4.17.

Tabela 4.17 Resultados obtidos para a estimativa da dispersão recombinada dos padrões analisados nos dias 1 e 2.

	Padrão 1,8 mg/l O ₂		Padrão 18,0 mg/l O ₂	
	D1	D2	D1	D2
S_{pool}	0,037	0,039	0,627	0,276

A comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos de análise, após a validação dos mesmos, foi efetuada aplicando o teste t aplicado às médias dos resultados obtidos em cada método, onde o método titulométrico foi tomado como referência. O valor teste foi calculado segundo a equação 2.7.

Tabela 4.18 Resultados obtidos para o teste t aplicado às médias dos resultados obtidos por cada método, para o padrão de resorcinol, nos dias 1 e 2.

	Padrão 1,8 mg/l O ₂		Padrão 18,0 mg/l O ₂	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
Valor teste	4,50	1,81	1,72	1,96
t_{crit} (95% de confiança)	2,23	2,20	2,20	2,20
t_{crit} (99% de confiança)	3,17	--	--	--

Analisando os valores, é possível verificar que, para o padrão de resorcinol de 1,8 mg/l O₂, os valores obtidos pelo método titulométrico e AFS não são estatisticamente equivalentes quer ao nível de 95% de confiança, quer ao nível de 99% de confiança, no caso do dia 1. No entanto, encontram-se dentro dos critérios definidos pela norma ISO 8467:1993 [8], constantes na tabela em anexo. No dia 2, os resultados obtidos convergiram para a semelhança estatística entre os valores obtidos por titulação e AFS pois o valor tabelado é superior ao valor teste, ao nível de 95% de confiança.

Para o padrão de 18,0 mg/l O₂, ao nível de 95% de confiança, os resultados obtidos pelos dois métodos de análise são estatisticamente equivalentes, nos dias 1 e 2.

4.2 Estimativa de incertezas

Seguindo o método indicado pela norma ISO 11352:2012 e, conforme anteriormente descrito, foi efetuada a estimativa da incerteza para ambos os métodos de análise do índice de permanganato. Os resultados foram obtidos através da construção de folhas de cálculo no Microsoft Excel®, cujo conteúdo é apresentado em anexo.

4.2.1 *Análise volumétrica*

Como mencionado no subcapítulo 2.5.5., a análise do fluxograma constante na norma permitiu concluir que seria possível estimar a componente aleatória da incerteza para este método através dos dados obtidos para o padrão de controlo usado, de resorcinol. A componente sistemática foi determinada através dos resultados obtidos nos ensaios interlaboratoriais.

A componente aleatória, u_{RW} , foi calculada de acordo com a equação 2.30 e o valor obtido foi: $u_{RW} = 4,3\%$

A componente sistemática, u_b , determinada segundo a equação 2.25, resultou num valor de: $u_b = 5,4\%$

A incerteza expandida do método foi: $U_{tit} = 13,9\%$.

4.2.2 *Análise em fluxo segmentado*

A incerteza deste método foi determinada partindo dos resultados do padrão de controlo e dos ensaios de recuperação.

A componente aleatória, u_{RW} , foi calculada de acordo com a equação 2.25 e o valor obtido foi: $u_{RW} = 4,0\%$

A componente sistemática, u_b , determinada segundo a equação 2.33, resultou num valor de: $u_b = 11,2\%$.

A incerteza expandida do método foi: $U_{AFS} = 23,8\%$.

4.3 **Cartas de Controlo**

O uso de cartas de controlo é recorrente, no Laboratório Tomaz, para avaliar a existência de tendências nos métodos de análise.

Habitualmente, são controlados vários aspetos em cada método, nomeadamente: os ensaios de recuperação, os padrões de controlo, os padrões dos extremos das curvas de calibração (se aplicável), os duplicados e ainda os declives das curvas de calibração (se aplicável).

Para tornar este tópico o mais sucinto e representativo deste tipo de análise, serão aqui apenas avaliadas as cartas de controlo relativas ao padrão de controlo (10 mg/l $KMnO_4$), à amplitude dos duplicados e aos declives das curvas de calibração obtidas entre os meses de janeiro e março, para a determinação do índice de permanganato por AFS.

4.3.1 Sensibilidade

Na figura abaixo, é possível observar a carta dos declives obtidos para o método em implementação:

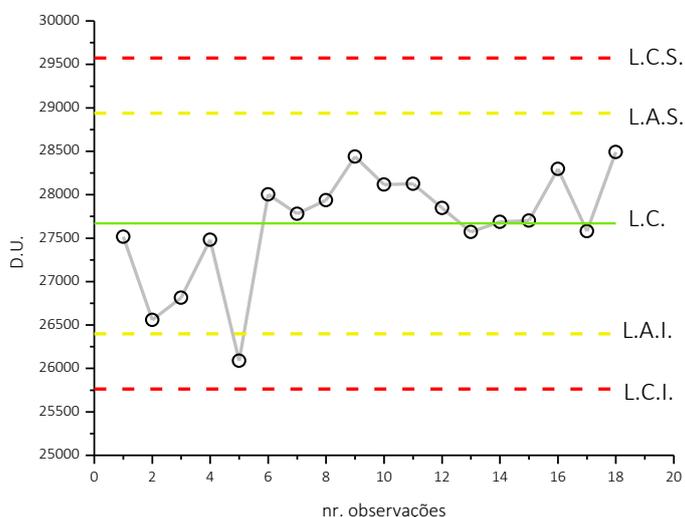


Figura 4.4 Carta de controle para os declives das curvas de calibração obtidas no método de análise do índice de KMnO_4 em fluxo segmentado (de janeiro a março).

Seguindo as indicações constantes na norma ISO 8258, discriminadas no capítulo 2, relativas a tendências em cartas de controle, verifica-se que, durante este período temporal, não foram observáveis tendências na carta de controle de declives deste método.

4.3.2 Padrão de controle

A carta de controle referente aos resultados obtidos para o padrão de 10 mg/l KMnO_4 , usado como controle das sessões de trabalho, no analisador em fluxo segmentado para a determinação do índice de permanganato, encontra-se na figura 4.5.

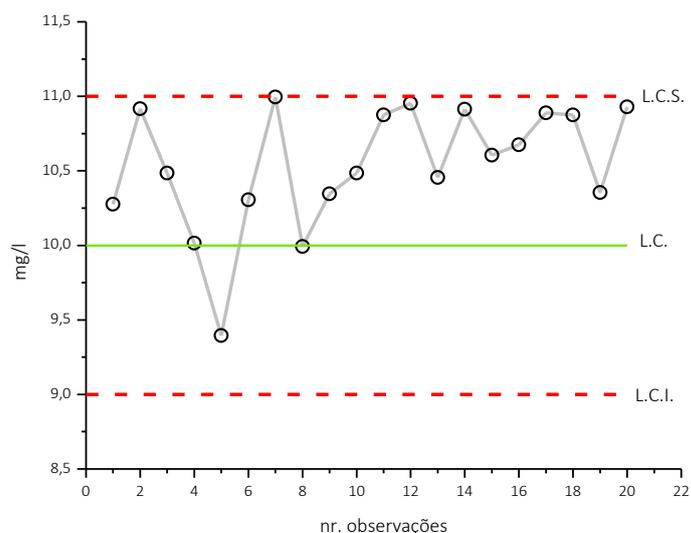


Figura 4.5 Carta de controlo do padrão de 10 mg/l KMnO_4 (de janeiro a março).

Nesta carta de controlo são apenas representadas as linhas superior e inferior de controlo, uma vez que, para que os valores possam ser aceites devem encontrar-se dentro do critério de aceitação de 10%, o que corresponde a uma variação de 10 ± 1 mg/l.

Em relação à análise de tendências, é possível verificar que existem pelo menos 9 pontos consecutivos de um dos lados da média, o que corresponde à existência de um desvio sistemático relativamente ao valor estabelecido. Tal poderá ser indicativo da existência de uma tendência positiva nos resultados obtidos por este método. No entanto, é de salientar que os valores se encontram dentro do critério de aceitação e são ainda em número reduzido para concluir de forma precisa sobre os mesmos.

4.3.3 Amplitudes

Para avaliar os resultados obtidos em duplicados, é calculada a amplitude relativa entre cada um dos valores obtidos para a amostra e posteriormente construída a respetiva carta de controlo (figura 4.6).

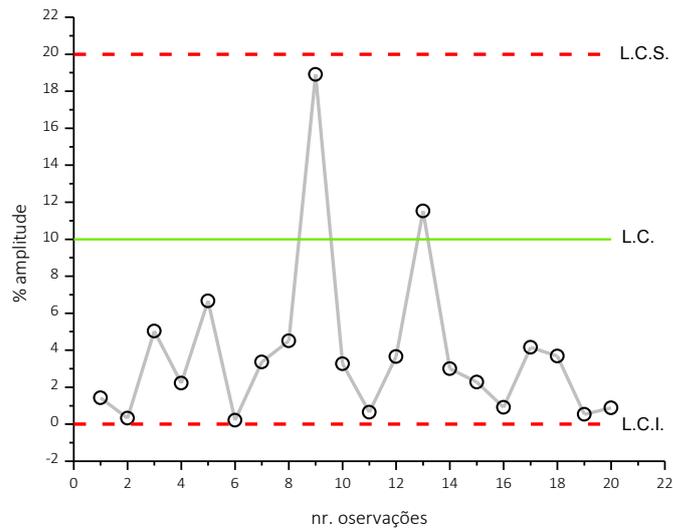


Figura 4.6 Carta de controle de amplitudes para os duplicados obtidos pela análise em fluxo segmentado do índice de KMnO_4 de amostras (entre janeiro e março).

Mais uma vez apenas são construídas as linhas que delimitam o intervalo definido pelo critério de aceitação do laboratório Tomaz: a amplitude não deve exceder os 20%.

Analisando a possibilidade de se verificarem tendências, pode concluir-se que tal não acontece neste período temporal. É ainda visível que a amplitude dos resultados obtidos, é na maioria, inferior a 10%.

5 Conclusões

Este projeto foi extremamente proveitoso no sentido em que permitiu a aplicação dos conhecimentos adquiridos no Mestrado, no contexto real, revelando-se enriquecedor a nível pessoal e profissional.

O principal objetivo deste trabalho foi alcançado: a validação do método de análise de fluxo segmentado para a determinação do índice de permanganato foi concluída com sucesso. Este é apenas um pequeno passo para a meta final da candidatura do método à acreditação.

O cálculo das incertezas dos métodos abordados neste trabalho foi um processo complexo mas também finalizado com sucesso. O resultado obtido para o método em implementação ($U_{AFS} = 23,8\%$) foi superior ao do método titulométrico ($U_{tit} = 13,9\%$). No entanto, tal não deve ser alvo de preocupação pois os dados disponíveis para esta estimativa são ainda em número reduzido.

O estudo da validação do método de AFS permitiu definir claramente qual a gama de trabalho a usar: de 0,51 a 12,67 mg/l O_2 . Esta foi validada em diferentes dias de análise e revelou-se eficaz na análise do índice de permanganato.

O método de análise em fluxo segmentado revelou-se ainda seletivo para a finalidade a que se destina, obtendo valores de taxas de recuperação na ordem dos 100%.

No que diz respeito ao modelo de ajuste para a curva de calibração aplicada, adota um comportamento totalmente linear, o que simplifica a sua aplicação.

O método de AFS revelou-se exato pois apresentou uma taxa de recuperação média de 103,28% e erros relativos para a análise de padrões inferiores a 10%: padrão 2,0 ($Er=5,02\%$), padrão 20,0 ($Er=7,2\%$) e padrão 30,0 ($Er=0,1\%$).

Em termos da avaliação da precisão por repetibilidade os coeficientes de variação obtidos respeitaram os critérios de aceitação definidos pela Relacre (inferior a 10%): para a amostra da piscina I o CV_r foi de 8,25%, no caso da piscina II, $CV_r=1,32\%$, o padrão de 20 mg/L de $KMnO_4$ resultou num $CV_r=1,87\%$ e para o padrão de 30 mg/L de $KMnO_4$ o valor foi, $CV_r=0,63\%$.

Os resultados da avaliação da precisão intermédia de uma amostra e de um padrão foram também concordantes com o critério de 10% definido pela Relacre, sendo que para o padrão se obteve $CV=3,38\%$ e para a amostra, $CV=8,47\%$.

Uma das etapas mais importantes neste processo de validação foi a comparação do método titulométrico com o novo método, a análise por fluxo segmentado, para a determinação da oxidabilidade em águas. A comparação entre os métodos foi abordada através da aplicação de um modelo de regressão linear, a partir do qual se verificou a concordância dos resultados obtidos por ambos. Também foram comparados os resultados obtidos para o padrão de Resorcinol, usado habitualmente no método titulométrico e aplicado no fluxo segmentado. Esta comparação revelou-se satisfatória e dentro dos critérios definidos pela norma ISO 8467.

Para finalizar e porque são parte integrada do controlo de qualidade no laboratório Tomaz, sendo mundialmente aceites para o devido efeito, foi feita uma breve análise de 3 cartas de controlo criadas durante a duração deste estágio. Não se encontraram, para já, anomalias que impliquem a tomada de ações corretivas.

6 Referências

- [1] Decreto-Lei nº 236/1998 de 1 de agosto. *Diário da República nº 176/98 – I Série A*. Ministério do ambiente, Lisboa.
- [2] Patnaik, Pradiot (2004). *Dean's Analytical Chemistry Handbook, Second edition*. Mc Graw – Hill, New York.
- [3] Instituto Português de Acreditação. A Acreditação, *www.ipac.pt*, consultado em 11.04.2016.
- [4] Instituto Português de Acreditação (2012). *DRC 001 Regulamento geral de acreditação*. Caparica, IPAC.
- [5] Instituto Português de Acreditação (2011). *OGC002 Guia para a acreditação de laboratórios químicos*. Caparica, IPAC.
- [6] Fiorucci, António Rogério *et al*, (2005). *A importância do oxigénio dissolvido em meios aquáticos*. Química nova na escola.
- [7] Decreto-Lei nº 306/2007 de 27 de agosto. *Diário da República nº 164/07 – I Série A*. Ministério do ambiente, do ordenamento do território e do desenvolvimento regional, Lisboa.
- [8] ISO 8467 (1993). *Water quality: determination of permanganate index*. Genève, Switzerland.
- [9] Harris, Daniel C. (2013). *Exploring Chemical Analysis, Fifth Edition*. W.H. Freeman and company, New York.
- [10] Skoog *et al* (2006). *Fundamentos de Química Analítica, 8ª edição*. Editora Thomson.
- [11] Svehia, G. (1997). *Vogel's Qualitative Inorganic Analysis*. Addison Wesley Longman Ltd., England.
- [12] Zagato, Elias A.G. *et al*, (2002). Information essential for characterizing a flow-based analytical system. IUPAC.
- [13] Skalar (2006). *Skalar methods, Potassium Permanganate Value*. Catnr. 524-002 issue 101315/WK/99301032.
- [14] Miller, James N. *et al* (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Sixth Edition*. Pearson Education Limited, England.
- [15] Relacre (2000). *Validação de métodos internos de ensaio em análise química*. Associação de laboratórios acreditados de Portugal. ISBN 972-8574-02-9.
- [16] Wikipédia (2001). Coeficiente de correlação, *pt.wikipedia.org*, consultado em 30.05.2016

- [17] Relacre (1996). *Validação de resultados em laboratórios químicos*. Associação de laboratórios acreditados de Portugal. ISBN: 972-96727-2-5.
- [18] ISO 11352:2012, (2012). *Water quality: estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data*. Genève, Switzerland:ISO.
- [19] Guia ISO/CEI 17043 (2010) *Evaluación de la conformidad – Requisitos generales para los ensayos de aptitud*. ISO, Génova.
- [20] ISO 8402 (1986). *"Quality - Vocabulary"*. International Organization for Standardization, Genève, Switzerland.
- [21] Comité de Materiales de Referencia de ISO (2009). *Información sobre REMCO*. Organización Internacional de Normalización.
- [22] Magnusson, B. et al, M. (2012). *Nordtest TR 537 Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*. Oslo: Nordic Innovation.
- [23] Departamento da qualidade (2014). *PE 203 – Determinação da oxidabilidade – método do permanganato em meio ácido*. Manual de Procedimentos, Laboratório Tomaz.
- [24] Skalar (2003). *FlowAccess® - Chapter 9: Data Processing*. Skalar, Netherlands.

7 Anexos

Tabela 7.1 Valores tabelados para o teste de t bilateral e unilateral

Bilateral			Unilateral		
	0,050	0,010		0,050	0,010
1	12,71	63,66	1	6,31	31,82
2	4,30	9,92	2	2,92	6,96
3	3,18	5,84	3	2,35	4,54
4	2,78	4,60	4	2,13	3,75
5	2,57	4,03	5	2,02	3,36
6	2,45	3,71	6	1,94	3,14
7	2,36	3,50	7	1,89	3,00
8	2,31	3,36	8	1,86	2,90
9	2,26	3,25	9	1,83	2,82
10	2,23	3,17	10	1,81	2,76
11	2,20	3,11	11	1,80	2,72
12	2,18	3,05	12	1,78	2,68
13	2,16	3,01	13	1,77	2,65
14	2,14	2,98	14	1,76	2,62
15	2,13	2,95	15	1,75	2,60
16	2,12	2,92	16	1,75	2,58
17	2,11	2,90	17	1,74	2,57
18	2,10	2,88	18	1,73	2,55
19	2,09	2,86	19	1,73	2,54
20	2,09	2,85	20	1,72	2,53
21	2,08	2,83	21	1,72	2,52
22	2,07	2,82	22	1,72	2,51
23	2,07	2,81	23	1,71	2,50
24	2,06	2,80	24	1,71	2,49
25	2,06	2,79	25	1,71	2,49
....				

Tabela 7.2 Valores tabelados para a distribuição de Fisher Snedecor.

$\alpha = 0,025$	v_1									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
v_2	1	647,80	799,50	864,20	899,60	921,8	937,10	948,20	956,60	963,30
	2	38,51	39,00	39,17	39,25	39298,00	39,33	39,36	39,37	39,39
	3	17,44	16,04	15,44	15,10	14885,00	14,74	14,62	14,54	14,47
	4	12,22	10,65	9,98	9604,00	9,36	9,20	9,07	8,98	8,91
	5	10,01	8,43	7,76	7388,00	7,15	6,98	6,85	6,76	6,68
	6	8,81	7,26	6,60	6227,00	5,99	5,82	5,70	5,60	5,52
	7	8,07	6,54	5,89	5523,00	5,29	5,12	5,00	4,90	4,82
	8	7,57	6,06	5,42	5053,00	4,82	4,65	4,53	4,43	4,36
	9	7,21	5,72	5,08	4718,00	4,48	4,32	4,20	4,10	4,03
	10	6,94	5,46	4,83	4468,00	4,24	4,07	3,95	3,86	3,78

$\alpha=0.01$		v_1				
		1	2	3	4	5
v_2	1	4052,20	4999,30	5403,50	5624,30	5764,00
	2	98,50	99,00	99,16	99,25	99,30
	3	34,12	30,82	29,46	28,71	28,24
	4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52
	5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97

$\alpha=0,005$		v_1									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
v_2	1	16212,00	19997,00	21614,00	22501,00	23056,00	23440,00	23715,00	23924,00	24091,00	24222,00
	2	198,50	199,00	199,20	199,20	199,30	199,30	199,40	199,40	199,40	199,40
	3	55,55	49,80	47,47	46,20	45,39	44,84	44,43	44,13	43,88	43,69
	4	31,33	26,28	24,26	23,15	22,46	21,98	21,62	21,35	21,14	20,97
	5	22,79	18,31	16,53	15,56	14,94	14,51	14,20	13,96	13,77	13,62
	6	18,64	14,54	12,92	12,03	11,46	11,07	10,79	10,57	10,39	10,25
	7	16,24	12,40	10,88	10,05	9,52	9,16	8,89	8,68	8,51	8,38
	8	14,69	11,04	9,60	8,81	8,30	7,95	7,69	7,50	7,34	7,21
	9	13,61	10,11	8,72	7,96	7,47	7,13	6,89	6,69	6,54	6,42
	10	12,83	9,43	8,08	7,34	6,87	6,55	6,30	6,12	5,97	5,85

Tabela 7.3 Valores tabelados para o teste de Grubbs

n	G(0.05)	G(0.01)	n	G(0.05)	G(0.01)	n	G(0.05)	G(0.01)
3	1,154	1,155	15	2,548	2,806	80	3,306	3,673
4	1,481	1,496	16	2,586	2,852	90	3,348	3,716
5	1,715	1,764	17	2,620	2,894	100	3,384	3,754
6	1,887	1,973	18	2,652	2,933	120	3,445	3,817
7	2,020	2,139	19	2,681	2,968	140	3,495	3,867
8	2,127	2,274	20	2,708	3,001	160	3,537	3,910
9	2,215	2,387	25	2,822	3,135	180	3,574	3,946
10	2,290	2,482	30	2,909	3,236	200	3,606	3,978
11	2,355	2,564	40	3,036	3,381	300	3,724	4,094
12	2,412	2,636	50	3,128	3,483	400	3,803	4,171
13	2,462	2,699	60	3,200	3,560	500	3,863	4,228
14	2,507	2,755	70	3,258	3,622	600	3,911	4,274

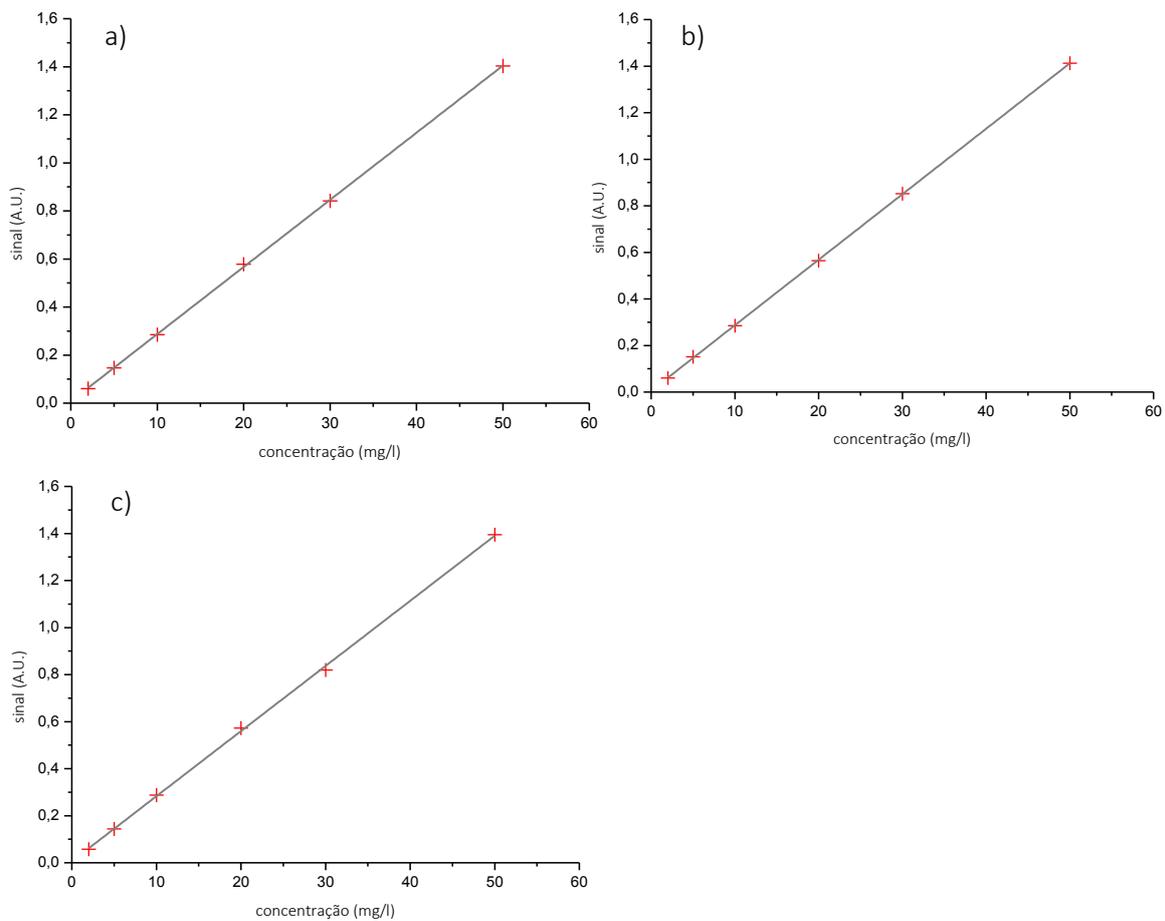


Figura 7.1 Representação gráfica das retas obtidas para o estudo da linearidade da AFS, nos dias 3,4 e 5: a) dia 3 – $y=0,0279x + 0,008$, $R=0,9998$; b) dia 4 – $y=0,0281 + 0,0057$, $R= 1,00$ c) dia 5 – $y=0,0277 + 0,0061$, $R= 0,9994$.

Tabela 7.4 Gama de resultados possível de obter na análise do padrão de Resorcinol. Retirado de [8]

Amostra	Índice de KMnO_4 (mg/l O_2)	Desvio padrão (mg/l O_2)
Resorcinol 1,0 mg/l	1,63 a 2,04	0,06 a 0,20
Resorcinol 10 mg/l ⁶	16,3 a 20,4	0,6 a 2,0

⁶ Estes valores foram obtidos por extrapolação relativamente ao padrão de 1,0 mg/l, aplicando um fator de $\times 10$.

- Componente associada à exatidão devida aos ensaios interlaboratoriais

Tabela 7.5 Cálculo de incertezas para o método titulométrico (Modelo criado no Microsoft Excel®)

Nº EIL	Vref	Vob	DP robusto	Nº participantes	Di (%)	Di ²	u(c,ref) (%)
mar-09	1,7	1,8	17,65	54	5,88	34,60	3,00
set-10	5,2	5,4	7,69	62	3,85	14,79	1,22
mar-10	9	8,4	8,89	45	-6,67	44,44	1,66
jun-12	19	20	10,53	58	5,26	27,70	1,73
set-12	15	16	6,67	50	6,67	44,44	1,18
mai-13	14	14	7,14	49	0,00	0,00	1,28
set-13	8,3	7,8	9,64	39	-6,02	36,29	1,93
jul-14	25	24	12,00	53	-4,00	16,00	2,06
nov-14	8	7,9	6,25	61	-1,25	1,56	1,00
jun-15	6	6	10,00	55	0,00	0,00	1,69
out-15	8,1	8,8	7,41	40	8,64	74,68	1,46
				Soma	12,36	294,52	18,20
				Média	1,12	26,77	1,65

RMS	5,174
u_b	5,433

- Componente associada à precisão através do padrão de controlo

Tabela 7.6 Cálculo de incertezas para o método titulométrico (Modelo criado no Microsoft Excel®)

Data	Padrão-Controlo	Data	Padrão-Controlo
20-11-15	1,64	26-01-16	1,68
25-11-15	1,77	28-01-16	1,80
26-11-15	1,76	29-01-16	1,82
27-11-15	1,90	02-02-16	1,79
01-12-15	1,77	04-02-16	1,88
02-12-15	2,01	05-02-16	1,89
04-12-15	1,60	08-02-16	1,81
09-12-15	1,77	10-02-16	1,85
11-12-15	1,81	12-02-16	1,77
15-12-15	1,72	15-02-16	1,68
16-12-15	1,96	16-02-16	1,80
18-12-15	1,83	17-02-16	1,76
22-12-15	1,92	19-02-16	1,93
23-12-15	1,80	23-02-16	1,81
29-12-15	1,76	25-02-16	1,78
31-12-15	1,86	26-02-16	1,70
05-01-16	1,81	01-03-16	1,89
07-01-16	1,84	03-03-16	1,77
08-01-16	1,85	04-03-16	1,76
12-01-16	1,83	08-03-16	1,80
14-01-16	1,83	10-03-16	1,79
15-01-16	1,81	11-03-16	1,87
19-01-16	1,85	15-03-16	1,85
20-01-16	1,80	16-03-16	1,82
22-01-16	1,66	18-03-16	1,84
		Média	1,81
		Desvio Padrão	0,07812535

U_{Rw}	4,326
----------	-------

- Estimativa Final

Tabela 7.7 Cálculo de incertezas para o método titulométrico (Modelo criado no Microsoft Excel®)

U_{Rw}	4,326
u_b	5,433
u_c	6,945
U_{tit}	13,9

- Componente associada à exatidão devida aos ensaios de recuperação e solução do analito adicionada

Tabela 7.8 Cálculo de incertezas para o método de AFS (Modelo criado no Microsoft Excel®)

% Recuperação	b(i,rel)	b(i,rel)^2
102,5425	0,0254	0,0006
115,0895	0,1509	0,0228
108,7055	0,0871	0,0076
103,9160	0,0392	0,0015
114,2640	0,1426	0,0203
108,5850	0,0858	0,0074
117,7180	0,1772	0,0314
105,3140	0,0531	0,0028
119,1685	0,1917	0,0367
105,8920	0,0589	0,0035
99,9700	-0,0003	0,0000
97,6270	-0,0237	0,0006
109,0500	0,0905	0,0082
110,6830	0,1068	0,0114
96,3760	-0,0362	0,0013
118,6229	0,1862	0,0347
86,2260	-0,1377	0,0190
	MÉDIA	0,0123
	SOMA	0,2098

u_{conc} (%)	1,1097
u_v (%)	1,1068
u_{ad} (%)	1,567

RMS	0,111
u_b	11,22

- Componente associada à precisão através do padrão de controlo

Tabela 7.9 Cálculo de incertezas para o método de AFS (Modelo criado no Microsoft Excel®)

Data	Padrão-Controlo
11-01-2016	10,28
13-01-2016	10,92
18-01-2016	10,48
20-01-2016	10,02
26-01-2016	9,40
27-01-2016	10,31
03-02-2016	10,99
08-02-2016	9,99
10-02-2016	10,35
17-02-2016	10,48
22-02-2016	10,88
24-02-2016	10,95
29-02-2016	10,45
02-03-2016	10,91
07-03-2016	10,61
09-03-2016	10,67
16-03-2016	10,89
23-03-2016	10,9
30-03-2016	10,4
Média	10,51617228
Desvio- Padrão	0,41565473

U_{Rw}	3,9525
----------	---------------

- Estimativa final

Tabela 7.10 Cálculo de incertezas para o método de AFS (Modelo criado no Microsoft Excel®).

U_{Rw}	3,95
u_b	11,22
U_c	11,90
U_{AFS}	23,8