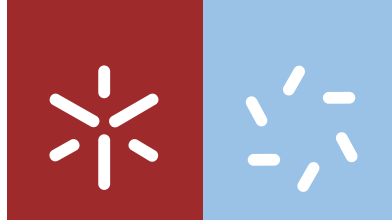


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Catarina Raquel Coutinho Ribeiro

**Validação de métodos analíticos:
determinação da turvação e da clorofila
a em águas**



Universidade do Minho
Escola de Ciências

Catarina Raquel Coutinho Ribeiro

**Validação de métodos analíticos:
determinação da turvação e da clorofila
a em águas**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho realizado sob orientação da
Dra Manuela Alexandra Ferreira da Silva
e da
Doutora Maria Dulce Silva Geraldo

julho de 2017

DECLARAÇÃO

Nome: Catarina Raquel Coutinho Ribeiro

Título da Dissertação de Mestrado: Validação de métodos analíticos: determinação da turvação e da clorofila α em águas

Orientadoras: Dra Manuela Alexandra Ferreira da Silva e Doutora Maria Dulce Silva Geraldo

Ano de conclusão: 2017

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho: ___/___/___

Assinatura: _____

Agradecimentos

“Aqueles que passam por nós, não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.” Antoine de Saint-Exupéry

Esta citação não pode ser mais correta. Se há um ano atrás achava que escrever uma dissertação sozinha seria fácil, hoje tenho uma opinião completamente errada. A verdade é que na ausência de várias pessoas, não teria chegado hoje ao fim deste capítulo.

Primeiro de tudo tenho de agradecer à minha família, a minha mãe e o meu irmão. Eles são e serão sempre a minha base. E toda a gente sabe que um prédio sem alicerces não consegue crescer.

Em segundo, não posso deixar de agradecer à Doutora Manuela Silva e Doutora Maria José Moura por oferecerem a oportunidade de criar um estágio onde consegui colocar em prática os ensinamentos adquiridos durante a formação académica.

Ao Engenheiro Vitorino José por todos os ensinamentos transmitidos, pelos momentos de alegria no Laboratório e sempre prestável para esclarecimento de dúvidas, sem esquecer a motivação dos momentos em os problemas pareciam ser maiores que as soluções.

À Doutora Dulce Geraldo, por ser uma orientadora incrível, motivadora e muito disponível.

À Doutora Helena Valentim e técnica Marianela Campos por me receberem bem, fornecerem uma convivência excelente, pelos bolinhos que de vez em quando era agradada e por todo o apoio e ajuda.

Ao Nuno Loureiro que apesar de ter estado neste percurso comigo apenas até janeiro, esteve sempre disposto a ajudar e incentivar e ainda hoje me dá dicas. À Gisana Pereira, estagiária do sector de Biologia, pela paciência que teve em ser as minhas mãos em procedimentos que eu não podia executar.

Ao Engenheiro Augusto Castro, das Águas do Porto, Engenheira Conceição Gago da ARH do Algarve e Doutora Elsa Alverca, do LRA, por prestarem ajuda a nível do procedimento de clorofila α . Também um agradecimento à Doutora Sandra Coelho e Doutora Luísa Mota, das Águas do Porto por me receberem numa visita de esclarecimento de questões.

Quero também agradecer a todas as pessoas pertencentes à Divisão de Planeamento e Informação pois foram sempre simpáticos comigo e me ajudaram a crescer.

Não posso deixar esquecer a presença incondicional de duas amigas, Ana Lima e Ana Cordeiro, que ouviram as minhas queixas, mas que mesmo assim nunca me largaram pelo caminho.

A todos eles, o meu sincero obrigada!

Resumo

A poluição ambiental é um dos fatores que contribui para a escassez das águas, sendo necessário a existência de critérios de manutenção permanente da sua qualidade, em conformidade com leis nacionais e internacionais, garantindo a preservação das suas reservas nas próximas gerações. Neste sentido, é recomendado implementar métodos analíticos de quantificação de espécies que comprometem a qualidade da água e comparar com valores estipulados na legislação.

Esta dissertação teve como objetivo a implementação, a validação e o controlo de qualidade do método analítico para a determinação da turvação de águas naturais doces segundo a norma EPA *Method* 180.1 por nefelometria.

Foi ainda iniciada a validação do método de doseamento da clorofila *a* em águas naturais doces segundo a norma NP 4327:1996, recorrendo à espectroscopia de absorção molecular com o método de extração por acetona, assim como o controlo de qualidade interno.

Durante a validação destes métodos foram avaliados como parâmetro de desempenho a seletividade, a linearidade, os limiares analíticos a precisão e a exatidão. As estimativas de incerteza associadas às calibrações foram também determinadas e o controlo de qualidade interno foi realizado recorrendo ao uso de cartas de controlo. Ambos apresentam uma boa correlação linear e os limiares analíticos são adequados ao uso. A precisão avaliada em condições de repetibilidade e de precisão intermédia foi satisfatória com coeficiente de variação e erro relativo adequados.

A determinação da turvação apresentou taxas de recuperação dentro dos valores estipulados, concluindo que o método é seletivo para as gamas de concentração estabelecida. Na avaliação da exatidão do método recorrendo a um material de referência certificado, obteve-se um valor de *Z-score* satisfatório. A incerteza do método determinada foi adequada para o uso.

Quanto ao método de determinação de clorofila *a* ainda não foi possível obter resultados para avaliar a exatidão, a seletividade e a incerteza de medição, dado que não se dispõe de materiais de referência certificados, participação em ensaios interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação ainda está a ser delineada em termos de procedimento.

Abstract

Environmental pollution is a key factor which contribute to water scarcity, requiring the existence of criteria for permanent maintenance of it is quality, in accordance with national and international laws, warranting the preservation of its reserves in the next generations. In this sense, the implementation of analytical methods for the quantification of species that compromise water quality and the comparison with values stipulated in the legislation is required.

In this thesis the implementation, validation and quality control of the analytical method for the determination of natural water turbidity according to EPA Method 180.1 by nephelometry, were performed. The validation of the chlorophyll a quantification method was also initiated in natural waters according to NP 4327:1996, using molecular absorption spectroscopy with the acetone extraction method, as well as the internal quality control.

In the validation of these methods, performance parameter such as selectivity, linearity, analytical thresholds, precision and accuracy were characterized. The uncertainty associated to calibrations curves were also determined and the internal quality control was performed using control charts. Both calibrations presented good linear correlation and analytical thresholds are suitable for use. The precision evaluated under repeatability and intermediate precision conditions was appropriate with variation coefficient and relative error less than adequate.

The turbidity method showed recovery rates within the demanded values, demonstrating its selectivity for the established concentration ranges. The method accuracy was evaluated using a certified reference material, and a satisfactory Z-score value was obtained. The uncertainty of the method was suitable for use.

Regarding the quantification method for chlorophyll a, accuracy, selectivity and measurement uncertainty were not evaluated since no certified reference materials, or participation in interlaboratory tests or recovery assays were available.

Índice

Lista de Abreviaturas e símbolos	xí
Índice de Figuras.....	xv
Índice de tabelas.....	xvii
Capítulo 1 – Introdução	21
1.1 Enquadramento.....	23
1.2 Agência Portuguesa do Ambiente, I.P.....	23
1.3 Água	27
1.3.1 Poluentes da água	30
1.3.2 Diretivas, planos e leis gerais para a gestão da água	31
1.3.3 Qualidade da água em Portugal	31
1.4 Qualidade	31
1.5 Monitorização das massas de água	32
1.5.1 Planeamento	33
1.5.2 Amostragem	33
1.5.3 Colheita de amostras	33
1.5.4 Preservação	39
1.5.5 Identificação da amostra	40
1.6 Métodos analíticos.....	41
1.6.1 Determinação da turvação por nefelometria.....	42
1.6.2 Determinação da clorofila <i>a</i> por espectrofotometria de absorção molecular	43
1.7 Validação de métodos analíticos	45
1.7.1 Curva de calibração	46
1.7.2 Seletividade	47
1.7.3 Gama de trabalho	48
1.7.4 Linearidade	49
1.7.5 Sensibilidade.....	49
1.7.6 Limiares analíticos	50
1.7.7 Precisão	51
1.7.8 Exatidão vs Justeza	54
1.7.9 Incerteza do método	57
1.8 Garantia de Controlo de Qualidade.....	59

1.8.1 Controlo de Qualidade Externo	59
1.8.2 Controlo de Qualidade Interno	59
Capítulo 2 – Parte experimental	63
2.1 Determinação da turvação	65
2.1.1 Reagentes, material e equipamentos	65
2.1.2 Preparação das soluções	66
2.1.2 Colheita e transporte de amostras	68
2.1.3 Procedimento experimental	68
2.2 Determinação de clorofila a por espectrofotometria de absorção molecular	68
2.2.1 Reagentes, material e equipamentos	68
2.2.2 Preparação das soluções	69
2.2.3 Amostragem e conservação das amostras	71
2.2.4 Procedimento experimental	71
Capítulo 3 – Apresentação e discussão dos resultados	73
3.1 Validação de métodos analíticos	75
3.1.1 Determinação da turvação	75
3.1.2 Controlo de qualidade associado à determinação da turvação	87
3.2.1 Determinação da clorofila a	93
3.2.2 Controlo de qualidade associado à determinação da clorofila a	103
Capítulo 4 – Conclusão	111
Capítulo 5 – Bibliografia	115
Capítulo 6 – Anexos	125

Lista de Abreviaturas e símbolos

a – Declive

A_a – Absorvância após acidificação com ácido clorídrico

A_o – Absorvância antes da acidificação com ácido clorídrico

A_{a665} – Absorvância a 665 nm após da acidificação com ácido clorídrico

A_{a750} – Absorvância a 750 nm após acidificação com ácido clorídrico

A_{o665} – Absorvância a 665 nm antes da acidificação com ácido clorídrico

A_{o750} – Absorvância a 750 nm antes da acidificação com ácido clorídrico

APA, I.P. – Agência Portuguesa do Ambiente, Instituto Público

ARHN – Administração da Região Hidrográfica do Norte

b – Ordenada na Origem

b – *Bias* estimado com a diferença entre o valor médio e um valor de referência aceite

C – Concentração

Ca – Concentração do analito na amostra não fortificada

C_{af} – Concentração amostra fortificada

Cc – Concentração de Clorofila *a*

Cce – Concentração de Clorofila *a* obtida experimentalmente

Ccp – Concentração de clorofila *a* dos padrões preparados

CBO₅ – Carência Bioquímica de Oxigénio ao 5º dia

C_f – Concentração da fortificação

COT – Carbono orgânico total

COV – Carbono orgânico volátil

CQ – Controlo de Qualidade

CQE – Controlo de Qualidade Externo

CQI – Controlo de Qualidade Interno

CQO – Carência Química de Oxigénio

CV – Coeficiente de Variação

DQA – Diretiva Quadro da Água

d₂ – Fator para o cálculo do desvio padrão do intervalo médio de amplitudes

DS² – Diferença entre Variâncias

EN – Erro Normalizado

EIL – Ensaio Interlaboraorial

ER – Erro Relativo

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

FNU – Unidades Nefelométricas de Formazina, através da mediação da luz dispersa a 90º da luz incidente segundo a norma ISO 7027

GQ – Garantia de Qualidade

H – Frases de Perigo

IPAC – Instituto Português de Acreditação

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

ISO – *Internation Standart for Organization* (Organização Internacional de Padronização)

K – Factor de correção

l – Percurso ótico

LA – Lei da água

LAI – Linha de aviso inferior

LAS – Linha de aviso superior

LCI – Linha de controlo inferior

LCS – Linha de controlo superior

LDD – Limite de deteção

LDQ – Limite de quantificação

LRA – Laboratório de Referência do Ambiente

min – Minuto

MRC – Material de Referência Certificado

MS – Quadrado das médias no teste de ANOVA

MS_b – Quadrado das médias entre grupos no teste de ANOVA

MS_w – Quadrado das dentro dos grupos no teste de ANOVA

n – Número de determinações em replicado

N – Número de padrões

N_{total} – Nitrogénio total

NP – Norma Portuguesa

NTU – Unidades Nefelométricas de Turvação através de mediação da luz dispersa a 90° da luz incidente segundo a norma US EPA *Method* 180.1

p – Número de grupos

pH – Valor de potencial de hidrogénio

P – Frases de prudência

P – Plástico

P_{total} – Fósforo total

PG – Razão entre variâncias

r – Coeficiente de correlação

r – Limite de repetibilidade

rpm – Rotações por minuto

R – Limite de reprodutibilidade

R – Razão máxima de A_{0665}/A_{a665}

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

R (%) – Taxa de recuperação em percentagem

RH – Região Hidrográfica

RH1 – Região Hidrográfica do Minho e Lima

RH2 – Região Hidrográfica do Cávado, Ave e Leça

RH3 – Região Hidrográfica do Douro

RH4A – Região Hidrográfica do Vouga, Mondego e Lis

RH5A – Região Hidrográfica do Tejo e Ribeiras do Oeste

RH6 – Região Hidrográfica do Sado e Mira

RH7 – Região Hidrográfica do Guadiana

RH8 – Região Hidrográfica Ribeiras do Algarve

s – Desvio padrão

s_a – Desvio padrão do declive

s_b – Desvio padrão da ordenada na origem

s_b – Desvio padrão do *bias* para valores medidos de material de referência

s_{between} – Desvio padrão entre amostras no teste de ANOVA

s_i – Desvio padrão da precisão intermédia

s_r – Desvio padrão da repetibilidade

s_{RW} – Desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial dos resultados para controlo de qualidade

$s_{y/x}$ – Desvio padrão residual

s_y^2 – Desvio padrão residual da função quadrática

s' – Desvio padrão corrigido

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

SS – Quadrado da soma no teste de ANOVA

SS_b – Quadrado da soma entre grupos no teste de ANOVA

SS_w – Quadrado da soma dentro do grupo no teste de ANOVA

SST – Sólidos Suspensos Totais

t – Parâmetro t de student

u_b – Incerteza padrão do *bias*

u_c – Incerteza padrão combinada

u_{Cref} – Incerteza padrão do valor de referência

u_{prec} – Incerteza padrão da precisão

u_{RW} – Incerteza padrão para a reprodutibilidade dentro do laboratório

T – Turvação

U – Incerteza expandida

V – Volume de água filtrada

v – Volume do extrato

UV-vis – Radiação ultravioleta-visível

VMA – Valor Máximo Admissível

VMR – Valor Máximo Recomendável

y – Sinal

Z – Fator de desempenho *Z-score*

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração das Regiões Hidrográficas presentes em Portugal Continental, que se encontram delimitadas por uma linha. RH1 – Minho e Lima; RH2 – Cávado, Ave e Leça; RH3 – Douro; RH4A – Vouga, Mondego e Lis; RH5A – Tejo e Ribeiras do Oeste; RH6 – Sado e Mira; RH7 – Guadiana; RH8 – Ribeiras do Algarve. As ARH encontram-se representadas por diferentes tonalidades: Norte, Centro, Tejo e Oeste, Alentejo e Algarve ¹.

Figura 2 – Distribuição da água existente na Terra. ²

Figura 3 – Consumo de água em Portugal por diferentes setores. Adaptado de: Relatório do Estado do Ambiente, PGRH, 2016 ³

Figura 4 – Formas de poluição da água ⁴.

Figura 5 – Colheita de amostras diretamente com o recipiente ⁵

Figura 6 – Balde de inox para colheita indireta ⁵.

Figura 7 – Exemplo de garrafas de *Van Dorn* ⁵.

Figura 8 – Sistema automático de colheita de amostras integradas ⁵.

Figura 9 – Medidor de nível utilizado em recolhas de águas subterrâneas pela ARHN ⁶.

Figura 10 – Representação de um furo com bomba (a) e de piezómetro (b) ⁵.

Figura 11 – Exemplo de um amostrador automático de amostras residuais ⁵.

Figura 12 – Turbídímetro TU5200 utilizado no laboratório da ARHN, que mede a turvação a 90 ° da fonte de luz. *Fonte:* Hach ® ⁴⁹.

Figura 13 – Estrutura química da clorofila *a* ⁷.

Figura 14 – Relação do resultado de medição e incerteza de medida. Erro de medição: medida de exatidão do método; Incerteza: possibilidade de erro do resultado ⁸.

Figura 15 – Esquema da relação entre a distribuição normal e a uma carta de controlo ⁹.

Figura 16 – Reação de formação do polímero de formazina, resultante da combinação de sulfato de hidrazina com hexametiltetramina ¹⁰.

Figura 17 – Representação gráfica dos valores de turvação em função dos padrões de formazina.

Figura 18 – Carta de aceitação de duplicados na determinação da turvação. LA = Limite de aceitação 10 %.

Figura 19 - Carta de controlo de indivíduos obtida com o padrão de controlo 10,0 NTU StabCal para garantir a veracidade da curva de calibração. LCS = limite de controlo superior; LAS = limite de aviso superior; LAI = limite de aviso inferior; LCI = limite de controlo inferior.

Figura 20 – Representação gráfica dos valores de concentração de clorofila a determinada experimentalmente, em função da concentração dos padrões de clorofila a preparados.

Figura 21 – Carta de aceitação de duplicados na determinação da clorofila a . LA = Limite de aceitação, 20 %.

Figura 22 - Carta de controlo de médias obtida para o controlo do padrão de 20,0 $\mu\text{g/L}$, para garantir a veracidade da curva de calibração. LCS = limite de controlo superior; LAS = limite de aviso superior; LAI = limite de aviso inferior; LCI = limite de controlo inferior.

Índice de tabelas

Tabela 1 – Tipos de contaminação consoante a fonte de poluição. ¹¹

Tabela 2 – Check list para três pontos de monitorização de águas naturais realizadas no mês de março de 2017 pela ARHN. (Ntotal – Nitrogénio total; Ptotal – fósforo total; COT – carbono orgânico total; COV – compostos orgânicos voláteis).

Tabela 3 – Medidas aplicadas para a conservação de amostras de acordo com o parâmetro analisado no laboratório da ARHN, V – Vidro; P – Plástico; (*) ¹².

Tabela 4 – Esquema da organização dos dados no ensaio de ANOVA um fator ¹³.

Tabela 5 – Tabela resumo com as expressões utilizadas para determinar a exatidão de um método analítico ^{14, 15, 16}.

Tabela 6 – Características dos reagentes utilizados na determinação da turvação ¹⁷.

Tabela 7 – Material de vidro utilizado na determinação da turvação.

Tabela 8 – Equipamentos utilizados na determinação da turvação.

Tabela 9 – Volumes utilizados da suspensão mãe de formazina para obter os padrões.

Tabela 10 - Características dos reagentes utilizados na determinação da clorofila *a* ¹⁷.

Tabela 11 – Material utilizado na determinação da clorofila *a*.

Tabela 12 – Equipamentos utilizados para a determinação da clorofila *a*.

Tabela 13 – Volumes utilizados da solução mãe de clorofila *a* para obter as soluções padrão necessárias, em volume final de 100 mL, à realização da curva de calibração.

Tabela 14 – Valores de turvação registados (NTU) para as soluções padrão de formazina numa gama de 0,0 a 20,0 NTU para o traçado da reta de calibração.

Tabela 15 – Intervalos de confiança do declive e da ordenada na origem associados à reta de calibração para a determinação da turvação por nefelometria, bem como valores do coeficiente de correlação, desvio padrão e coeficiente de variação do método.

Tabela 16 – Valores da sensibilidade do método obtidos em dias diferentes.

Tabela 17 – Valores de turvação obtidos no estudo da seletividade através de ensaios de recuperação em vários níveis de concentração de formazina.

Tabela 18 – Valores de turvação obtidos no estudo da gama de trabalho em condições de repetibilidade de 10 leituras independentes dos padrões de concentração mais baixa e mais alta, 1,0 e 20,0 NTU, respetivamente.

Tabela 19 – Valores utilizados na aplicação do teste de homogeneidade de variâncias para o estudo da gama de trabalho.

Tabela 20 – Avaliação da precisão do método de turvação em condições de repetibilidade.

Tabela 21 – Valores de turvação obtidos dos padrões de controlo de 20,0 NTU utilizados para avaliar a precisão em condições intermédias.

Tabela 22 – Valores obtidos a partir da ANOVA para a determinação da precisão intermédia em que s_r corresponde ao desvio padrão da repetibilidade e s_i corresponde à precisão intermédia.

Tabela 23 – Valores obtidos de turvação para dez padrões de concentração mais baixo (1,0 NTU) de modo a determinar os limiares analíticos.

Tabela 24 – Resultados obtidos para avaliar a exatidão da turvação.

Tabela 25 – Resultados obtidos com o Material de Referência Certificado da *Aquacheck* utilizados para calcular o valor do *bias* relativo ao parâmetro da turvação.

Tabela 26 – Média e desvio padrão obtidos na determinação da turvação de dez ensaios independentes de um MRC com um valor de referência de $2,30 \pm 0,03$ NTU.

Tabela 27 – Valores de turvação obtidos em vinte duplicados de forma a avaliar o controlo de qualidade interno para um limite de aceitação de 10 %.

Tabela 28 – Valores de turvação obtidos do padrão de 10,0 NTU para o cálculo dos limites da carta de controlo de indivíduos.

Tabela 29 – Dados obtidos da análise de vinte padrões de 10,0 NTU StabCal para a determinação das linhas de aviso e de controlo e construção da carta de controlo.

Tabela 30 – Valores de absorvância a 665 e 750 nm obtidos para as soluções padrão de clorofila a numa gama até 200,0 $\mu\text{g/L}$ para o traçado da reta de calibração. A_o refere-se às absorvâncias antes da adição, A_a refere-se às absorvâncias após a adição de ácido clorídrico.

Tabela 31 – Valores de concentração de clorofila a ($\mu\text{g/L}$) obtidos com as soluções padrão de clorofila a numa gama até 200,0 $\mu\text{g/L}$ para o traçado da reta de calibração.

Tabela 32 – Intervalo de confiança do declive e da ordenada na origem associados à reta de calibração para a determinação da clorofila a por espectrofotometria de absorção

molecular, bem como valores do coeficiente de correlação, desvio padrão do método e coeficiente de variação.

Tabela 33 – Valores obtidos no estudo da gama de trabalho em condições de repetibilidade de 10 leituras independentes dos padrões 20,0 e 200,0 µg/L.

Tabela 34 – Valores obtidos na aplicação do teste de homogeneidade de variâncias para o estudo da gama de trabalho para o método da determinação da clorofila *a*.

Tabela 35 – Resultados da avaliação da precisão do método de determinação de clorofila *a* em condições de repetibilidade.

Tabela 36 – Valores obtidos dos padrões de controlo de 200,0 µg/L utilizados para avaliar a precisão em termos de condições intermédias.

Tabela 37 – Valores obtidos a partir da ANOVA para a determinação da precisão intermédia em que s_r corresponde ao desvio padrão da repetibilidade e s_i corresponde à precisão intermédia.

Tabela 38 – Valores de clorofila *a* obtidos em vinte duplicados ao longo do tempo de forma a avaliar o controlo de qualidade interno.

Tabela 39 – Valores do padrão de 20,0 µg/L de clorofila *a* obtidos ao longo do tempo para o cálculo dos limites da carta de controlo.

Tabela 40 – Dados obtidos da análise de vinte amostras em duplicado para a determinação das linhas de aviso e de controlo da carta de controlo do padrão de 20,0 µg/L.

Tabela 41 – Valores de Z-score obtidos nos EIL promovidos pela *Aquacheck* para os diversos parâmetros analisados em rotina no Laboratório em matrizes de águas naturais.

Tabela 42 – Valores de obtidos nos EIL promovidos pela *Aquacheck* para os diversos parâmetros analisados em rotina pelo Laboratório em matrizes de águas residuais.

Tabela A1 – Advertência de perigo (H) associados aos reagentes utilizados na preparação de soluções.

Tabela A2 – Recomendação de precaução (P) associado aos reagentes utilizados na preparação de soluções.

Capítulo 1 – Introdução

1.1 Enquadramento

O trabalho apresentado foi desenvolvido no âmbito do Projeto Individual do Mestrado de Técnicas de Caracterização e Análise Química e decorreu na Administração da Região Hidrográfica do Norte, com duração de nove meses (outubro de 2016 a junho de 2017). Durante este período foi desenvolvido um conjunto de atividades a nível do Laboratório no Setor de Ensaio Físico-Químicos, nomeadamente:

1. Implementação, validação e controlo de qualidade de um método para analisar a turvação de águas naturais;
2. Validação de um método implementado na rotina do Laboratório, na área de Microbiologia, nomeadamente, a determinação de clorofila *a* em águas naturais.
3. Realização de ensaios físico-químicos dos parâmetros analisados rotineiramente em águas naturais e residuais.

1.2 Agência Portuguesa do Ambiente, I.P.

A Agência Portuguesa do Ambiente, I.P., denominada de APA, I.P., criada pelo Decreto-Lei n.º 56/2012, de 12 de março, é um instituto público integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio. A APA, I.P. resultou da fusão da Agência Portuguesa do Ambiente, do Instituto da Água, I.P., das Administrações de Região Hidrográfica, I.P., da Comissão para as Alterações Climáticas, da Comissão de Acompanhamento da Gestão de Resíduos e da Comissão de Planeamento de Emergência do Ambiente. Este novo organismo recebe ainda a generalidade das atribuições do Departamento de Prospetiva e Planeamento e Recursos Humanos^{18,19}. A APA, I.P. tem assim um papel determinante na proposta, desenvolvimento e execução das políticas de ambiente e de desenvolvimento sustentável, nomeadamente no âmbito da gestão dos recursos hídricos, do combate às alterações climáticas, da conservação da natureza e da proteção da biodiversidade, da gestão dos resíduos, da proteção da camada de ozono e da qualidade do ar, da recuperação e valorização dos solos e outros locais contaminados, da prevenção e controlo integrados da poluição, da prevenção e controlo do ruído, da prevenção de riscos industriais graves, da segurança ambiental e das populações, da rotulagem ecológica, das compras ecológicas, dos sistemas voluntários de gestão ambiental e avaliação ambiental de planos e programas¹⁹.

No que diz respeito aos recursos hídricos existe uma vasta regulamentação criada no sentido de alertar e promover uma gestão sustentável das águas.

A Lei da Água (LA - Lei n.º 58/2005, de 29 de Dezembro) ²⁰, alterada e republicada pelo Decreto-Lei n.º 130/2012, de 22 de junho ²¹, transpôs para a ordem jurídica nacional a Diretiva Quadro da Água (DQA - Diretiva 2000/60/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro) ²², estabelecendo um quadro de ação comunitária no domínio da política da água. Tem por objetivo proteger as massas de água superficiais interiores, as massas de água costeiras, as massas de água de transição e as massas de água subterrâneas.

De acordo com a referida lei é importante assumir uma atitude responsável e sustentável face à utilização dos recursos hídricos, devido ao seu valor social, que consagra o acesso universal para as necessidades humanas básicas, a custo aceitável, e sem constituir fator de discriminação ou exclusão, como refere o artigo n.º 3 da respetiva Lei ²⁰.

A Portaria n.º 108/2013, de 15 de março ²³, aprovou os Estatutos da APA, I.P., estabelecendo no artigo n.º 1 da sua organização interna em serviços centrais e em serviços territorialmente desconcentrados designados departamentos ou administrações, mais concretamente as Administrações de Região Hidrográfica (ARH), as quais exercem as competências de proteção e valorização dos Recursos Hídricos, na sua área geográfica, visando garantir o cumprimento dos objetivos da Lei da Água, nomeadamente no que se refere ao exercício das competências de monitorização, planeamento, fiscalização e licenciamento. Em Portugal, foram criados cinco departamentos de ARH distribuídos pelas regiões do Norte, Centro, Tejo e Oeste, Alentejo e Algarve, de modo a coordenar as oito regiões hidrográficas, RH, existentes em Portugal Continental, **Figura 1**.

No caso da Administração da Região Hidrográfica do Norte (ARHN), a sua circunscrição territorial abrange as Regiões Hidrográficas do Minho e Lima (RH1), do Cávado, Ave e Leça (RH2) e do Douro (RH3).

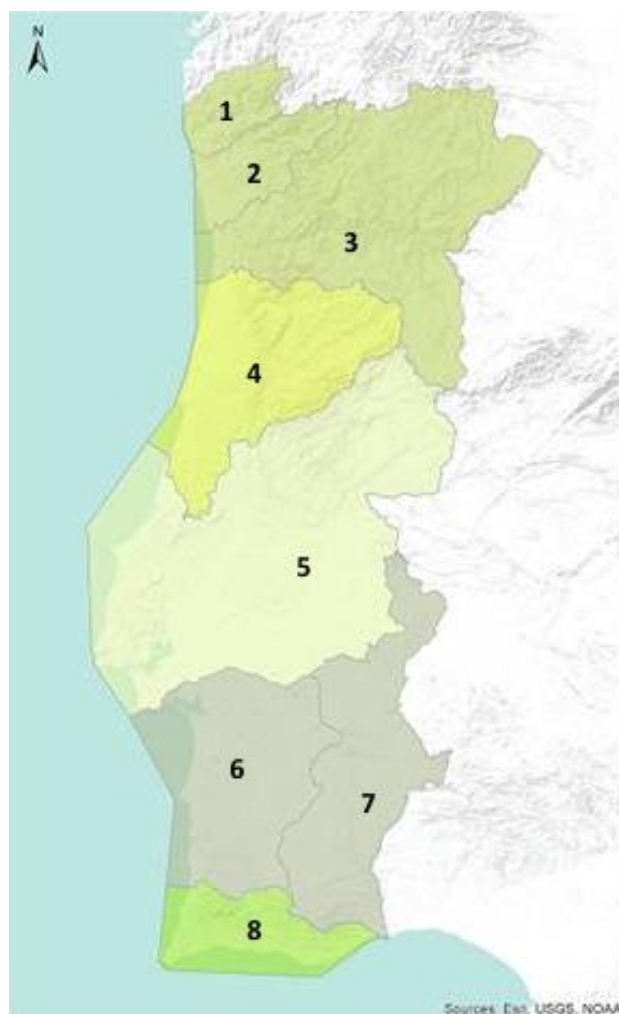


Figura 1 – Ilustração das Regiões Hidrográficas presentes em Portugal Continental, que se encontram delimitadas por uma linha. RH1 – Minho e Lima; RH2 – Cávado, Ave e Leça; RH3 – Douro; RH4A – Vouga, Mondego e Lis; RH5A – Tejo e Ribeiras do Oeste; RH6 – Sado e Mira; RH7 – Guadiana; RH8 – Ribeiras do Algarve. As ARH encontram-se representadas por diferentes tonalidades: Norte, Centro, Tejo e Oeste, Alentejo e Algarve ¹.

1.2.1 Apresentação dos Laboratórios da APA, I.P.

Segundo o Manual de Qualidade (MQ) da Rede de Laboratório da APA, I.P., “A APA, I.P. é um organismo central, com sede em Lisboa, com jurisdição sobre todo o território nacional. De entre as suas inúmeras atribuições salienta-se neste âmbito: *assegurar a gestão da rede de laboratórios do ambiente e colaborar na acreditação de outros laboratórios e de novas técnicas analíticas.*” ²⁴

Através do Despacho n.º 5271/2013 de 11 de abril, a equipa multidisciplinar do Laboratório de Referência do Ambiente (LRA) na dependência direta do membro do

conselho diretivo que tem a seu cargo a referida área, tendo como uma das suas competências gerir, dinamizar e racionalizar a rede de laboratórios da APA, I.P., criou a Rede Laboratorial da APA, I.P., que engloba:

- O Laboratório de Referencia do Ambiente (LRA);
- O Laboratório de Águas da ARH do Norte;
- O Laboratório de Águas da ARH do Centro;
- O Laboratório de Águas da ARH do Alentejo;
- O Laboratório de Águas da ARH do Algarve.

Os Laboratórios Regionais estão inseridos na Divisão de Planeamento e Informação de cada ARH, a quem cabe assegurar a gestão do laboratório de águas das ARH sob coordenação do LRA, conforme Despacho n.º 7714/2013 publicado em Diário da Republica em 14 de junho ²⁵.

A rede laboratorial da APA, I.P. contribui, no âmbito das suas competências, para o cumprimento das obrigações legais deste organismo, desenvolvendo trabalho analítico de suporte às Políticas de Ambiente em matéria de monitorização ambiental, fiscalização e resposta a emergências e reclamações.

Os laboratórios da rede também são prestadores de serviços a clientes externos. Com base nas competências atribuídas, o LRA desenvolve e executa ensaios em diversas matrizes ambientais: águas, sólidos, biota e ar ambiente, nas áreas de química geral, química orgânica, metais e biologia (microbiologia, ecotoxicologia, micologia e fitoplâncton).

Os Laboratórios Regionais centram as suas atividades no desenvolvimento e execução de ensaios físico-químicos e microbiológicos em amostras de águas. Funcionam como laboratórios de primeira linha de apoio regional à ARH da área de jurisdição, realizando trabalho analítico nas seguintes vertentes:

- Programas das redes de monitorização dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos;
- Controlo da qualidade das águas balneares;
- Apoio à fiscalização, no controlo das águas residuais domésticas e industriais;
- Análise de reclamações e de ocorrências pontuais de poluição.

Para além da atividade principal referida, os laboratórios realizam também outras ações que lhe são inerentes nas seguintes áreas:

- Colheita de amostras de águas;
- Desenvolvimento e implementação de novas técnicas analíticas;
- Participação em ensaios interlaboratoriais;
- Participação em ações de formação (estágios, cursos, etc.);
- Promoção e realização estágios curriculares;
- Participação em projetos de investigação em colaboração com diversas Entidades;
- Prestação de serviços a clientes externos (empresas, autarquias, entidades privadas e particulares).

O setor do Laboratório abrangido pela acreditação é o dos ensaios Físico-Químicos em águas naturais doces/residuais. A amostragem e o setor de Ensaios de Microbiologia e de Biologia não se encontram incluídos no âmbito da acreditação.

Também se encontra implementado um sistema de Gestão que visa atingir as seguintes ações:

- Cumprir a NP EN ISO/IEC 17025 ²⁶ e melhorar a eficácia do Sistema de Gestão da Qualidade;
- Cumprir boas práticas de laboratório de forma a garantir a eficácia dos resultados fornecidos ao cliente;
- Prestar um serviço de rigor e de excelência cumprindo os requisitos dos clientes assim como os requisitos normativos e legais;
- Obter o reconhecimento da competência técnica pela entidade nacional acreditadora, garantindo a credibilidade;
- Promover a formação contínua do pessoal, de modo a manter a qualificação necessária à fiabilidade do seu desempenho.

1.3 Água

A água desempenha um papel vital e insubstituível no equilíbrio ecológico, sendo um recurso natural imprescindível à manutenção da Vida na Terra. Uma ideia recorrente em vários documentos, eventos e comunicações refere o surgimento de vários conflitos pelo uso deste recurso tão necessário ao longo dos próximos cem anos. O *World Water Development Report* ²⁷ (relatório elaborado por 23 agências das Nações Unidas) reporta que a Terra já se encontra a viver uma “crise da água”, que tendencialmente

virá a piorar. A poluição é considerada a principal causa da redução dos recursos hídricos.

Em termos numéricos, o *World Resource Institute*, através do *Page Global Analysis of Global Ecosystems*, estima que em 2025, cerca de 3,5 mil milhões de pessoas estarão a ser suportadas por bacias hidrográficas que se encontram em “stress hídrico”, onde a agricultura e outras atividades económicas podem vir a sofrer severamente pela sua escassez ²⁸.

Ao pensar no ciclo hidrológico, é difícil imaginar que a água – que se evapora e sofre condensação num equilíbrio dinâmico – torna-se escassa numa escala planetária. Contudo, o Homem introduziu-se como um elemento neste ciclo, alterando o normal funcionamento deste fluxo. Em vez de apenas beber água, o ser humano serve-se deste recurso não só para consumo doméstico como também para indústrias e campos agrícolas, recorrendo às fontes hídricas mais acessíveis – à superfície – como também no subsolo, explorando depósitos que levam mais tempo a recuperar. Quando regressa ao meio recetor, a água transporta testemunhos, sob a forma de esgotos domésticos, poluição industrial e resíduos de fertilizantes e pesticidas. Este facto é particularmente preocupante quando apenas 2,5% de toda a água existente é doce e que menos de 1 % desta encontra-se disponível ², **Figura 2**.

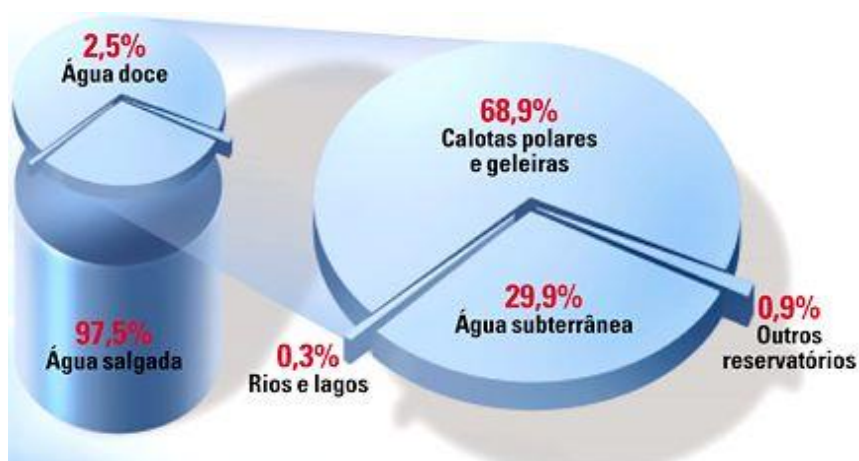


Figura 2 – Distribuição da água existente na Terra ².

Segundo dados do Relatório nº 2 do Plano Nacional da Água de 2015 ²⁹ e do Relatório do Estado do Ambiente de 2016 Nacional ³, o setor que mais água consome é a agricultura, chegando a rondar 75 % da água captada em Portugal, **Figura 3**.

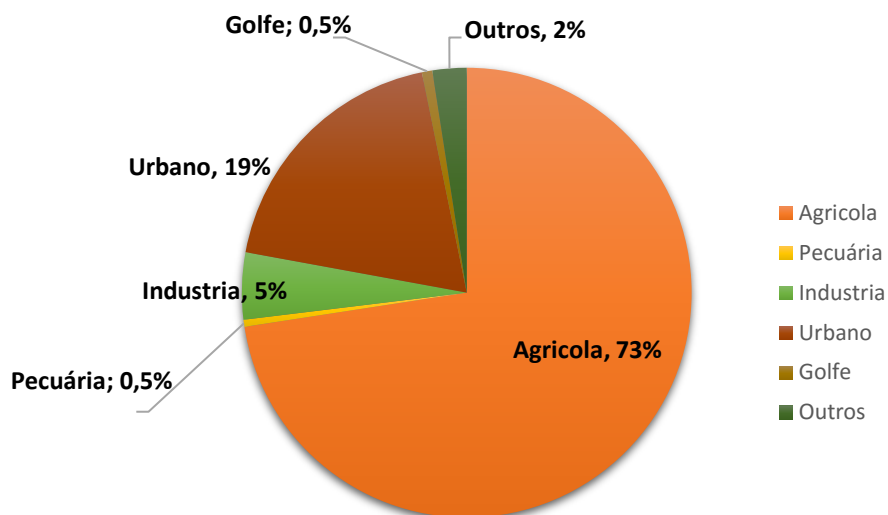


Figura 3 – Consumo de água em Portugal por diferentes setores. Adaptado de: Relatório do Estado do Ambiente, PGRH, 2016 ³.

A água desempenha um papel fundamental no organismo humano, já que se encontra presente em 75 - 80% da massa corporal, e intervém em inúmeros metabolismos, como a digestão, depuração renal, evolução celular e assegura o equilíbrio iónico. Daí a necessidade de se ingerir diariamente cerca de dois litros de água, como recomenda a Organização Mundial de Saúde (OMS) ³⁰. Uma das consequências dramáticas da escassez da água consiste nos efeitos na saúde das pessoas e de acordo com a UNESCO/OMS ³⁰:

- 2,2 mil milhões de pessoas, sobretudo crianças, morrem por diarreia todos os anos;
- 10 % da população dos países em desenvolvimento tem parasitas intestinais;
- 6 milhões de pessoas ficaram cegas devido a tracoma;
- 200 milhões de pessoas sofrem de esquistossomíase.

1.3.1 Poluentes da água

Apesar da escassez da água estar no centro da crise que muitos prenunciam, a poluição desta aparece com maior frequência na comunicação social, quer originada por fontes pontuais ou difusas. A **Tabela 1** resume vários tipos de contaminações possíveis

14.

Tabela 1 – Tipos de contaminação consoante a fonte de poluição. ¹¹

Fonte de poluição	Tipo de contaminação
Aterros de resíduos sólidos, lixeiras	Contaminação microbiológica, matéria orgânica, nutrientes, metais pesados
Depósitos de resíduos perigosos	Metais pesados, compostos orgânicos tóxicos
Esgotos urbanos, fossas sépticas	Contaminação microbiológica, matéria orgânica, fosfatos
Agricultura	Nitratos, salinização, compostos orgânicos tóxicos (pesticidas)
Pecuária	Contaminação microbiológica, matéria orgânica
Cemitérios	Contaminação microbiológica, nitratos
Minas	Metais pesados, acidificação
Indústrias	Metais pesados, matéria orgânica, compostos orgânicos pesados, fosfatos
Escorrências urbanas	Hidrocarbonetos, sólidos em suspensão, metais pesados
Sobre-exploração de aquíferos	Intrusão salina, esgotamento de aquíferos
Furos e poços mal construídos ou abandonados	Transmissão de contaminação de um aquífero para outro

A **Figura 4** representa de forma esquemática as várias fontes de poluição de origem antropogénica da água ⁴.



Figura 4 – Formas de poluição da água ⁴.

1.3.2 Diretivas, planos e leis gerais para a gestão da água

A proteção e gestão da água transcendem as fronteiras pelo que a União Europeia tem procurado adotar uma política global para garantir a qualidade das águas superficiais e subterrâneas por toda a Europa. Nesse sentido estabeleceu um quadro de ação comunitária relativa à água sendo o principal diploma legislativo a Diretiva Quadro da Água (DQA) que veio introduzir uma abordagem universal para a gestão e a proteção das águas superficiais e subterrâneas com base na bacia hidrográfica ²².

Os objetivos ambientais da DQA para as águas de superfície incorporam aspetos diretamente relacionados com a qualidade ecológica, nomeadamente o objetivo da não deterioração do “estado” das águas e o objetivo de atingir o “bom estado” que engloba “bom estado ecológico” e “bom estado químico” ²².

A implementação da DQA e, por conseguinte, o cumprimento dos objetivos ambientais, exigem o desenvolvimento e a aplicação dos princípios e orientações da Diretiva, através da implementação de um conjunto de medidas, quer pelos estados-membros quer pela Comissão.

Esta Diretiva foi transposta para o direito nacional através da Lei da Água ²⁰.

1.3.3 Qualidade da água em Portugal

A população está mais preocupada com a qualidade da água para consumo, do que propriamente refletir sobre o modelo de gestão dos sistemas multimunicipais de abastecimento e saneamento. Em Portugal, existe um controlo rigoroso das águas destinadas ao consumo humano pelas entidades competentes. Este controlo é realizado, quer na fonte onde é captada (água bruta), quer à saída, isto é, na casa do consumidor (água tratada). A classificação das águas brutas para consumo humano é baseada no Anexo I do Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de agosto ³¹. O ministério que tutela o Ambiente é a entidade responsável por comunicar os episódios de poluição da água. O controlo de qualidade da água encontra-se repartido por diversos organismos que asseguram os resultados através do cumprimento de diversas normas.

1.4 Qualidade

A *International Organization for Standardization* (ISO) é uma organização que tem como objetivo desenvolver e aprovar normas internacionais. Na norma ISO 8402 a

qualidade é definida como a totalidade de características de uma unidade, capaz de preencher os requisitos especificados e esperados ³².

Relativamente a uma organização, a qualidade é definida a partir das expectativas do cliente; exigências do mercado ou ambiente competitivo; objetivos organizacionais; e requisitos legais (norma, padrões, regulamento, lei, etc). Num laboratório, a qualidade engloba todas as ações que conduzem a resultados que se ajustam às necessidades específicas do cliente; atraem a confiança do cliente e de outros que utilizam os resultados e representam uma mais valia em termos económicos ³³.

As consequências dos erros em química analítica são muito superiores às dos custos de análises repetidas. Assim, é importante a implementação de um sistema de qualidade que garanta resultados com maior confiança, obtendo-se uma redução da variabilidade dos dados aumentando a precisão ³⁴. Além disso, verificam-se menos interrupções do ritmo de trabalho, por motivos de avaria do equipamento e também menos custos de reparações de equipamentos ³⁵.

A Rede Laboratorial da APA, I.P. subscreveu a Política da Qualidade publicada pelo Conselho Diretivo da APA, I.P., em abril de 2015, disponível no Anexo I ¹⁹. O Laboratório da ARHN tem a responsabilidade de realizar as atividades de ensaio de forma a cumprir os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025:2005 ³⁶, e da entidade que efetua o seu reconhecimento – Instituto Português de Acreditação (IPAC) – com vista a satisfazer as necessidades dos clientes e melhor exercer as suas competências.

Ao nível do Laboratório de análises é essencial que todas as políticas de qualidade sejam aplicadas para assegurar a fiabilidade dos resultados, bem como garantir a confiança por parte dos clientes.

1.5 Monitorização das massas de água

A DQA refere a importância da APA, I.P. delinear uma estratégia que permita a operacionalização de programas de monitorização otimizados e coerentes, uma vez que a monitorização é fundamental em vários aspetos, tais como avaliação do estado das massas de águas, sistemas de classificação das águas e implementação de programas de medidas. A APA, I.P. internalizou a monitorização de elementos de qualidade, permitindo desta forma o delineamento de uma estratégia de monitorização consistente e com poupança de recursos.

1.5.1 Planeamento

A fase inicial de qualquer procedimento é o planeamento que tem como objetivo definir atividades de colheitas, preservação, manuseamento e transporte de amostras, de modo a garantir todas as informações necessárias de forma precisa, com o menor custo possível ³⁷.

Esta fase deverá definir o programa de colheita, tendo em consideração os métodos analíticos a aplicar, assim como prever os recursos humanos, materiais e financeiros. Para um bom planeamento é importante a determinação cuidadosa dos pontos de colheita e o estabelecimento de um itinerário racional, evitando locais de tráfego intenso e regiões de vegetação que levam ao aumento da probabilidade de acidentes ³⁸, ter em consideração a disponibilidade do laboratório para a execução das análises e os prazos de preservação das amostras.

1.5.2 Amostragem

De acordo com a Norma ISO 17025:2005 ³⁶ a amostragem é um procedimento definido, pelo qual uma parte de um material ou produto é retirada de um todo para produzir uma parte representativa, para ensaio ou calibração.

A amostragem é um elemento importante do programa de controlo da qualidade da água porque o resultado da análise não corresponderá ao valor real, mesmo que utilizado um método analítico rigoroso, se a amostra não for representativa da água a controlar ⁵.

1.5.3 Colheita de amostras

Uma forma de agilizar o processo de amostragem, é realizar previamente uma *check list*, de modo a evitar que no local falte algum equipamento ou material ³⁷. Na **Tabela 2** encontra-se o exemplo de uma *chek list* ³⁹.

Tabela 2 – *Check list* para três pontos de monitorização de águas naturais realizadas no mês de março de 2017 pela ARHN. (N_{total} – Nitrogénio total; P_{total} – fósforo total; COT – carbono orgânico total; COV – compostos orgânicos voláteis).

Estação	Areosa	Pardelha	Bertiandos
Código SNIRH	40/1	14/N1	28/N1
Grupo Pesticidas	1	1	1
Observações		Furo	
Esquipa de colheita			
Data da colheita			
Bidão de 3 L			
Microbiologia			
Plástico Ntotal e Ptotal			
Plásticos Nutrientes			
Vidro Winkler Oxigénio (1mL de iodeto alcalino + 1 mL de sulfato manganoso)			
Vidro COT (acidificar com HCl)			
Plásticos Metais (acidificar com HNO ₃)			
Vial COVs (verificar a existência de bolhas)			
Vidro âmbar Hg (acidificar com HNO ₃)			
Vidro âmbar CN (basificar com NaOH)			
2,5 L âmbar (pesticidas neutros, herbicidas)			

A técnica adotada na recolha de amostras depende do tipo de matriz (água natural, subterrânea, residual) do tipo de amostragem (pontual, composta, integrada) e do ensaio (físico-químico, biológico, microbiológico, toxicológico). Sempre que necessário, durante a colheita, são realizadas determinações do pH e da temperatura. As determinações de campo são realizadas em recipientes separados daqueles que são enviados ao laboratório, evitando-se assim possíveis contaminações. Na determinação do pH deve sempre que possível, utilizar um medidor digital. A determinação da temperatura deve seguir a mesma técnica, quando na falta de um termómetro digital portátil com certificação de calibração, pode ser utilizado um termómetro calibrado com escala entre 0 °C – 50 °C. Além destas determinações, se possível podem ser realizadas as determinações da turvação, condutividade e oxigénio dissolvido^{37,38}. Mesmo quando

estas medições são realizadas em campo, os valores deveram ser confirmados em laboratório.

O Laboratório da ARHN é responsável por analisar águas de diferentes procedências, nomeadamente águas naturais (superficiais, em profundidade, amostras de água integrada, subterrâneas) e residuais. Os protocolos de amostragem seguem a Norma ISO 5667-3:2003 Water quality – Sampling – Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples ⁴⁰.

1.5.3.1 Águas naturais doces

As águas naturais (rios, lagos e albufeiras) apresentam uma grande heterogeneidade, quer na componente horizontal, quer na componente vertical, dificultando a definição dos pontos de colheita. Assim, estes deverão ter em consideração os aspetos morfológicos, hidromorfológicos e ainda a profundidade. De um modo geral, as amostras são colhidas à superfície e na zona mais central da massa de água em um ou mais pontos, dependendo da dimensão das mesmas, e verticalmente serão colhidas uma ou mais dependendo da profundidade da zona eufótica, do termoclima e da profundidade máxima da massa de água.

A colheita à superfície deve ser realizada a uma profundidade de 30 cm para evitar a interferência de materiais sólidos. Estas amostras podem ser colhidas diretamente para recipientes descontaminados e lavados de acordo com o parâmetro, **Figura 5**, ou de um modo indireto com um balde de inox, **Figura 6**.

A colheita em profundidade deve ser realizada de um a dois metros do fundo, utilizando garrafas de colheita, como garrafas de *Van Dorn*, **Figura 7**.

As amostras integradas são colhidas ao longo da coluna de água, em longitude ou profundidade. Estas colheitas podem ser realizadas com a ajuda de garrafas de colheita automática ao longo da coluna de água, **Figura 8** ou através de amostras discretas com garrafas de *Van Dorn* em diferentes profundidades ^{41, 5}.

As amostras compostas diferem das amostras integradas por se analisar as características em função do fator tempo. Este tipo de amostragem é escolhido para indicar melhor a composição média ⁵.

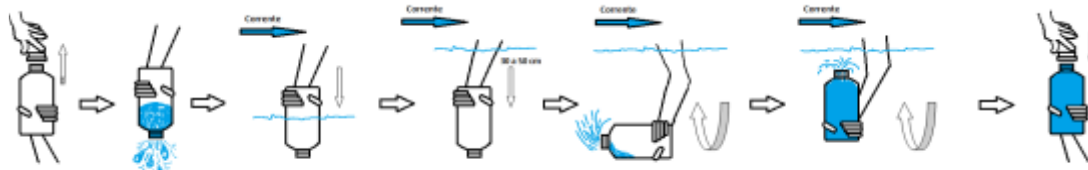


Figura 5 – Colheita de amostras diretamente com o recipiente ⁵



Figura 6 – Balde de inox para colheita indireta ⁵.



Figura 7 – Exemplo de garrafas de *Van Dorn* ⁵.



Figura 8 – Sistema automático de colheita de amostras integradas ⁵.

1.5.3.2 Águas subterrâneas

As águas subterrâneas encontram-se em poços/furos/piezômetro ¹⁹, sendo as suas informações recolhidas utilizando uma sonda/medidor de nível, **Figura 9**.



Figura 9 – Medidor de nível utilizado em recolhas de águas subterrâneas pela ARHN ⁶.

Tradicionalmente podem ser realizados dois métodos de colheita, colheita por bombagem, **Figura 10a**, ou colheita em profundidade.

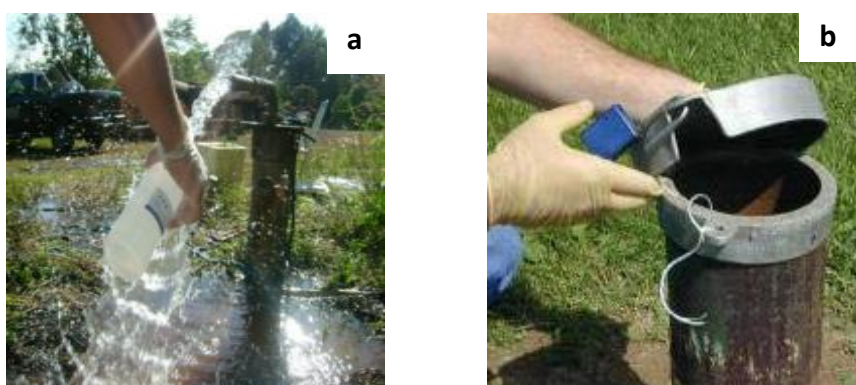


Figura 10 – Representação de um furo com bomba (a) e de piezómetro (b) ⁵.

Colheita com bomba à superfície: É um tipo de colheita recomendado em situações em que a qualidade da água subterrânea é verticalmente uniforme. Nestes casos, a amostra de água deve ser colhida tão próximo quanto possível da saída do poço/furo/piezómetro, a fim de evitar problemas de instabilidade da amostra. É importante que a bomba tenha funcionado o tempo suficiente para remover a água estagnada na coluna de água do furo, para assegurar que a água fresca está a ser colhida do aquífero ⁵.

Colheita com dispositivo de imersão: Consiste na imersão de um equipamento de colheita no poço/furo/piezómetro, até a uma profundidade conhecida, à qual se faz o enchimento com água, sendo depois transferido para o recipiente apropriado. Trata-

se de um método adequado para usar em poço/furo/piezómetro de controlo que não estão a ser bombados ⁵.

1.5.3.3 Águas residuais

Estas águas resultam de vários efluentes, por exemplo, domésticos, urbanos e industriais. A sua recolha diferencia-se em pontual e/ou composta. A amostra pontual é aplicável quando se pretende avaliar as características ou o cumprimento de valores de referência que não dependem da composição média da água residual e são essenciais para certas determinações, tais como, óleos e gorduras, hidrocarbonetos, sulfuretos, oxigénio dissolvido, cloro livre/total ⁵. A recolha composta é efetuada quando se pretende avaliar características ou o cumprimento de valores de referência que dependam da composição média da água residual. Normalmente recorre-se a um amostrador automático, **Figura 11**, que pode ser dotado de um medidor do caudal. O amostrador é colocado num local estável e ao abrigo do calor. Deve-se mergulhar a sonda à profundidade pretendida, lavar a tubagem com água do local e assistir à primeira amostra a ser recolhida para garantir que o equipamento se encontra a funcionar corretamente. Decorrido o intervalo de amostragem verificar se a operação correu bem e proceder ao transvase das amostras para os recipientes.

As recolhas pontuais são efetuadas no local para os recipientes, sendo que quando são realizadas em simultâneo com amostras compostas, devem ser recolhidas no primeiro dia da recolha, antes de colocar o amostrador automático, **Figura 11** ⁴².



Figura 11 – Exemplo de um amostrador automático de amostras residuais ⁵.

Um aspeto comum a todos os tipos de colheita é o facto de ser necessário a realização de ensaios microbiológicos. Nesse caso, é essencial que o processo de recolha se inicie sempre pelos recipientes destinados aos ensaios microbiológicos ^{41, 42, 6}.

Os protocolos para a recolha de águas balneares e de consumo não foram destacados pois não foram objetos de estudo durante este estágio curricular.

1.5.4 Preservação

Independentemente da natureza das amostras, águas naturais ou residuais, é importante aplicar técnicas de preservação para manter todas as características ³⁸. Existem várias abordagens adotadas, consoante o parâmetro a ser analisado. A ARHN segue a norma ISO 5667-3: *“Water Quality Sampling-Perservation and Handling of Water Samples”* para os parâmetros analisados em rotina. As indicações sobre Integridade, Preservação e Tempo de armazenamento de amostra estão apresentadas na **Tabela 3** ^{40, 42}. Mesmo quando a análise de um parâmetro é subcontratada, o processo de colheita e conservação é realizado pela ARHN ¹⁴.

Tabela 3 – Medidas aplicadas para a conservação de amostras de acordo com o parâmetro analisado no laboratório da ARHN, V – Vidro; P – Plástico; (*)¹².

Parâmetro	Tipo de Material / Frascos de Colheita	Método de Conservação da Amostra	Tempo Máximo de Conservação	Volume Mínimo de Amostra (mL)
Alcalinidade	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	14 dias	100
Azoto Amoniacal	V ou P	Acidificar a amostra com H_2SO_4 até pH <2; refrigerar $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	21 dias	500
Carência Química de Oxigénio	V ou P	Acidificação até pH <2 com H_2SO_4 Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	6 meses	50
Cloretos	V ou P	Não necessário	28 dias	100
Condutividade	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	28 dias	100
Cor	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*) Proteger da claridade	5 dias	100
Dureza total	V ou P	Adicionar H_2SO_4 ou HNO_3 até pH <2	6 meses	100
Fosfatos	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	48 horas	100
Nitratos + Nitritos	V ou P	Adicionar H_2SO_4 a pH <2 Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	28 dias	200
Nitritos	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	48 horas	100
Oxidabilidade	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	48 horas	100
Oxigénio dissolvido	Frasco de Winkler	Fixar oxigénio no campo ou imediatamente à chegada ao laboratório Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	4 dias	Frasco de Winkler cheio
pH	V ou P	Não necessário	24 horas	-
Sólidos	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	7 dias	500
Temperatura	No local	Não aplicável	15 min;	-
Turvação	V ou P	Não aplicável	24 horas	30
Clorofila <i>a</i>	V ou P	Refrigeração $\cong 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*)	Filtração em 24 h; Análise até 1 mês.	1000

1.5.5 Identificação da amostra

Todo o processo de colheita deve ser documentado, inclusive com fotografias. Cada conjunto de amostras é acompanhado por um relatório de campo, que representa a história cronológica da amostra e garante a integridade da informação nomeadamente

se os resultados se destinam para fins legais ou se existe qualquer suspeita que as amostras possam ser adulteradas em qualquer etapa do processo.

O relatório de campo entregue no laboratório no momento da receção das amostras deve incluir os seguintes tópicos:

- Código de identificação;
- Identificação do ponto;
- Autoridade solicitante;
- Procedência da amostra: rio, efluente, lago...;
- Condições hidrológicas e geológicas;
- Condições meteorológicas no momento e no período imediatamente anterior à recolha;
- Cadeia de custódias:
 - Nome do técnico e/ou equipa com data e hora de colheita;
 - Nome do técnico e/ou equipa de transporte;
 - Nome do técnico e/ou instituto que recebeu no laboratório;
- Possíveis observações de ocorrências anormais relacionadas com a amostragem, e condições especiais que possam fornecer dados importantes para a interpretação dos resultados.

As amostras devem ser devidamente identificadas em frascos, com tinta insolúvel em água ou etiquetas, devendo o técnico ter o cuidado de identificar corretamente o frasco e o relatório de campo a fim de evitar trocas de identificação.

Posteriormente, as amostras devem ser acondicionadas, e transportadas para o laboratório, no tempo necessário para que a sua análise ocorra no período de validade da preservação. O transporte deve ser realizado em malas térmicas que permitam o controlo da temperatura com a presença de termoacumuladores congelados ^{37, 14}.

1.6 Métodos analíticos

Ao longo desta secção são abordados os princípios dos métodos que foram validados nomeadamente a determinação da turvação por nefelometria e a determinação da clorofila *a* por espectrofotometria de absorção molecular, em águas naturais.

1.6.1 Determinação da turvação por nefelometria

A clareza da água é importante em diferentes operações como na produção de alimentos e produtos ou consumo humano. A determinação da turvação revela-se muito importante na monitorização operacional da água bruta, na desinfecção e nos sistemas de distribuição ⁴³.

A turvação na água deve-se à presença de suspensões e/ou partículas coloidais, finamente divididas como argila, limo, areias, matéria orgânica e inorgânica, plâncton e outros organismos microscópicos que dificultam a transmissão da luz através da água. A turvação é um termo para a propriedade ótica que as partículas provocam na água, fazendo com que a luz seja absorvida e dispersa, em vez de ser transmitida sem alteração na direção.

Contudo a turvação não é uma medida direta da matéria em suspensão pois não existe uma relação da turvação com o peso ou o número de partículas, uma vez que a forma e índice de refração das partículas afetam as propriedades de dispersão da luz ⁴⁴.

Embora a turvação não represente por si só um perigo para a saúde, uma turvação elevada, ao interferir com processos de desinfecção química e física protege os microrganismos, podendo influenciar o crescimento bacteriano ⁴⁵. O decreto-lei n.º 306/2007, de 27 de Agosto ⁴⁶, que estabelece o regime da qualidade da água destinada a consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água, define um valor paramétrico para a turvação de 4,0 unidades de turbidez nefelométricas (NTU) ⁴⁷.

Os turbidímetros medem a turvação através da incidência da radiação sobre a amostra e utilizam uma referência padrão. Assim, por comparação entre a intensidade de luz dispersa pelas duas suspensões é possível medir a turvação. Normalmente, a referência é um polímero de formazina cuja suspensão mãe apresenta uma turvação de 4000 NTU. Nos equipamentos mais recentes para avaliar a turvação, a luz é dispersa num ângulo de 90 ° em relação ao feixe incidente e é refletida através de um espelho cónico num anel a 360 ° em redor da amostra antes de ser capturada pelo detetor, **Figura 12**. A quantidade de luz dispersa é proporcional à turvação da amostra. Se a turvação da amostra for baixa, a quantidade luz dispersa detetada pela fotocélula será

baixa originando uma leitura de turvação baixa. Por outro lado, uma turvação elevada leva a que uma grande quantidade de luz seja dispersa, resultando numa leitura alta.

A turvação é um parâmetro com um tempo curto de análise, ou seja, é recomendável determiná-lo o mais rapidamente possível após a colheita da amostra após uma boa homogeneização. Só se recomenda a refrigeração a 4 °C para evitar decomposição microbológica em caso de alguma espera ^{48, 49}.



Figura 12 – Turbídmetro TU5200 utilizado no laboratório da ARHN, que mede a turvação a 90 ° da fonte de luz. Fonte: Hach ® ⁴⁹.

1.6.2 Determinação da clorofila *a* por espectrofotometria de absorção molecular

A espectrofotometria de absorção molecular é uma técnica analítica utilizada para a determinação quantitativa de muitas espécies, orgânicas ou inorgânicas em águas nomeadamente pigmentos fotossintéticos e seus produtos de degradação ^{50, 51}. Estas moléculas apresentam uma estrutura molecular complexa, apresentando elétrons π e/ou não ligantes permitindo a absorção na zona da radiação na região do ultravioleta e visível (100-700 nm). Esta técnica foi aplicada a determinação da clorofila *a*, **Figura 13** ⁵².

A clorofila (*a*, *b*, *c* ou *d*) é um dos pigmentos, além dos carotenoides (carotenos e xantofilas) e ficobilinas, responsável pelo processo fotossintético ⁵³. A clorofila *a* é o pigmento fotossintético encontrado em todos os grupos de algas e cianobactérias, enquanto as clorofilas *b*, *c* e *d* estão presentes em grupos específicos apenas. A clorofila *a* é frequentemente utilizada como indicador do estado trófico, uma vez que é o resultado do crescimento das algas e das cianobactérias devido ao enriquecimento por

nutrientes, como nitrogénio e fósforo ^{54, 55}.

A determinação da clorofila *a* permite calcular a biomassa e a atividade fotossintética das algas. Os principais produtos da degradação da clorofila são a feofitina e a feofofobida (feopigmentos) ⁵⁶. Os produtos de degradação das clorofilas podem, por vezes, constituir uma fração significativa dos pigmentos verdes totais presentes na água ⁵⁷⁻⁵⁹. Estas formas absorvem na zona vermelha do espectro e se estas existirem em concentrações elevadas relativamente à clorofila *a*, pode introduzir um erro grave nos resultados espectralométricos pois a absorção pelas formas degradadas não é discriminada da clorofila ativa ⁶⁰.

A adição de um ácido fraco à solução, permite reduzir o efeito de feopigmentos (feoferbina e feotina) ao remover o átomo de magnésio do anel de profirina ⁶¹. Deste modo, a quantificação da clorofila *a* em detrimento de outras formas fotossintéticas é possível recorrendo à espectralometria de absorção molecular. Geralmente recorre à medição em dois comprimentos de onda (665 e 750 nm), antes e depois da adição do ácido, sendo posteriormente calculada a concentração da clorofila em detrimento dos feopigmentos. A concentração da clorofila *a* na amostra/padrão analisada(o), expressa em µg/L, é calculada segundo a equação monocromática de *Lorenzen* ⁵⁸, apresentada na **Equação 1**.

$$C_c (\mu\text{g/L}) = \frac{(A_{o665} - A_{o750}) - (A_{a665} - A_{a750})}{V \cdot l} \cdot v \cdot K \cdot \frac{R}{R-1} \quad (1)$$

em que C_c é a concentração da clorofila *a* (µg/L), V o volume de água filtrada (L), l o percurso ótico da célula (cm), v o volume do extrato (mL), K o fator que exprime a correção para a acidificação ($1,7/0,7 = 2,43$), R a razão máxima de A_{o665}/A_{a665} (na ausência de feopigmentos = 1,7) e A_o e A_a são as absorvâncias medidas antes e após a acidificação, respetivamente.

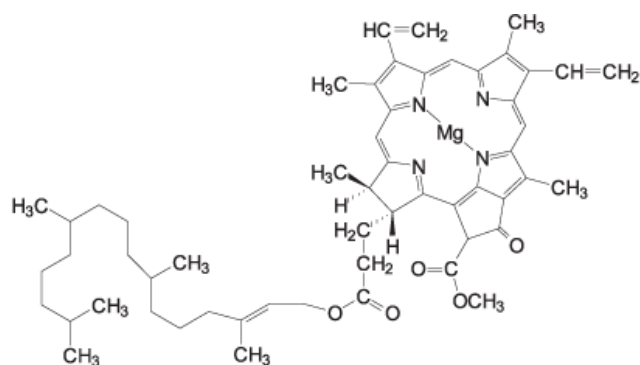


Figura 13 – Estrutura química da clorofila *a* ⁷.

1.7 Validação de métodos analíticos

Um dos principais requisitos em qualquer processo que envolva medições é a obtenção de dados de qualidade que alcancem os objetivos propostos. Nesse sentido, a validação de métodos analíticos tem como objetivo demonstrar, que o método é adequado aos requisitos exigidos para a aplicação pretendida, isto é, o processo de validação pretende demonstrar que o método se adequa à quantificação do analito na matriz, num certo nível de concentração, com exatidão (veracidade e precisão) satisfatória. Este processo é moroso mas vital para dar credibilidade ao método analítico desenvolvido^{15, 62, 63}.

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos, para demonstrarem através do processo de validação que os métodos internos de ensaio que executam, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida. Um laboratório que opera neste sentido poderá vir a ser acreditado. O processo de acreditação de um laboratório é realizado pelo organismo de acreditação, Instituto Português de Acreditação (IPAC), que avalia as competências do mesmo na realização de ensaios e calibrações ⁶⁴. A validação é importante, não só para os laboratórios ou instituições, como para os clientes destes, na medida em que é fundamental saber selecionar o método que melhor se adapta a cada análise e assegure a qualidade dos resultados ⁶². Os requisitos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento dos parâmetros de seletividade, gama de trabalho e linearidade, sensibilidade, limiares analíticos e finalmente precisão e veracidade.

1.7.1 Curva de calibração

Este parâmetro revela a forma como a resposta se relaciona com a concentração ou quantidade de substância, podendo variar de diferentes formas: linear, curvilínea, quadrática, variação logarítmica, entre outras, sendo que a verificação da linearidade do conjunto de dados de calibração pode ser realizada através da sua representação gráfica.

Quando se utiliza uma metodologia que envolve a realização de uma reta de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias, recorrendo à norma ISO 8466/1^{35, 65, 66} enquanto a norma ISO 8466/2^{65, 67} refere-se aos modelos quadráticos.

O método dos mínimos quadrados permite obter a equação de uma reta de calibração, dada pela **Equação 2**:

$$y = a \cdot c + b \quad (2)$$

em que y representa o resultado obtido, c a concentração do analito, a o declive da reta e b a ordenada na origem.

A partir da **Equação 2** é possível determinar concentrações de amostras por interpolação na reta. O coeficiente de correlação (**Equação 3**) utilizado para avaliar a qualidade do ajuste, apresenta valores entre -1 e 1 e geralmente considera-se como critério de aceitação um valor superior a 0,995 em módulo.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \cdot (y_i - \bar{y})^2]}} \quad (3)$$

Associado às medições, cada valor determinado apresenta sempre um erro associado. Assim, o declive e a ordenada na origem apresentam uma dispersão de valores que é função do método e para a determinação da sua incerteza é necessário calcular o desvio padrão residual $S_{y/x}$ (**Equação 4**), que fornece a dispersão do sinal instrumental em torno da reta de calibração.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (b + a \cdot x_i)]^2}{N-2}} \quad (4)$$

em que N é o número de padrões utilizados na reta de calibração e $b + a \cdot x_i$ representa o valor do sinal obtido (y) quando se interpola o valor de x_i na equação da reta.

Assim, os desvios padrão do declive a (**Equação 5**) e da ordenada na origem b (**Equação 6**), são expressos por:

$$S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2}{N \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

O intervalo de confiança do declive e da ordenada na origem podem ser calculados a partir das **Equações 8 e 9**, respetivamente. A equação da reta com as incertezas do declive e ordenada na origem é representada segundo a **Equação 10**, para um nível de confiança 95 % e N-2 graus de liberdade.

$$a \pm t s_a \quad (7)$$

$$b \pm t s_b \quad (8)$$

$$y = (a \pm t s_a) c + (b \pm t s_b) \quad (9)$$

1.7.2 Seletividade

A seletividade é capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência de outros componentes. Para avaliar a presença de interferentes poder-se-á realizar um teste de recuperação (**Equação 10**) utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas se faz variar a concentração de analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho:

$$R (\%) = \left(\frac{C_{af} - C_a}{C_f} \right) \times 100 \quad (10)$$

sendo, R a taxa de recuperação do analito; C_{af} a concentração do analito na amostra fortificada, C_a é a concentração do analito na amostra não fortificada, e C_f a concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

Convém que as amostras sejam analisadas em duplicado e condições de repetibilidade. As taxas de recuperação podem ser avaliadas em diferentes níveis de concentração ao longo da gama de trabalho. O método é considerado seletivo se as taxas de recuperação são próximas de 100 %, no entanto, dependendo da metodologia pode ser aceite gamas de recuperação mais alargada, sendo este intervalo estipulado pelo laboratório ¹⁵.

1.7.3 Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde ao intervalo no qual o método fornece resultados com uma incerteza aceitável ¹⁶. Quando se utiliza uma metodologia que envolve a realização de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada através do teste de homogeneidade das variâncias. A norma ISO 8466/1 ^{65, 66, 16}, utilizada para modelos lineares, recomenda a realização de dez pontos de calibração, distribuídos igualmente ao longo do intervalo de concentrações. O primeiro e último padrão devem ser analisados em dez réplicas independentes. As variâncias associadas a estas soluções padrões são examinadas para verificar se existem diferenças significativas entre elas recorrendo ao cálculo do valor de PG dado pelas Equação **11** ou **12**, de modo a PG ser sempre superior a 1.

$$PG = \frac{s_1^2}{s_{10}^2}, \text{ se } s_1 > s_{10} \quad (11)$$

$$PG = \frac{s_{10}^2}{s_1^2}, \text{ se } s_{10} > s_1 \quad (12)$$

em que s_1^2 representa a variância da solução padrão mais diluída e s_{10}^2 a variância da solução padrão mais concentrada.

O valor de PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Fisher-Snedecor*, para N-1 graus de liberdade. Se $PG \leq F$, a diferença de variâncias não é significativa e a gama de trabalho encontra-se bem ajustada. Pelo contrário, se $PG > F$,

existem evidências de diferença entre as variâncias e consequentemente a gama de trabalho não está ajustada, devendo ser reduzida até que a diferença das variâncias relativas ao primeiro e último padrão permitirem que o valor de PG seja inferior a F, ou deve-se testar uma regressão ponderada.

1.7.4 Linearidade

A linearidade de um método é capacidade de obter resultados proporcionais a concentrações do analito ¹⁶. Na norma ISO 8466/1 ^{65, 67}, utilizada para modelos quadráticos, recorre ao teste de Mandel para avaliar a linearidade sendo necessário determinar os resíduos para a função linear, $s_{y/x}$ e para a função quadrática s_{y2} . A diferença de variâncias, DS^2 , é calculada pela **Equação 13**:

$$DS^2 = (N - 2) s_{y/x}^2 - (N - 3) s_{y2}^2 \quad (13)$$

em que N é o número de padrões.

É realizado o teste PG de acordo com a **Equação 14** e é comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Fisher-Snedecor*. Se PG for menor ou igual ao valor tabelado de F, o ajuste é linear, pelo contrário se o valor de PG for superior ao valor de F, a função de calibração é não linear, devendo ser representada por uma função quadrática.

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y2}^2} \quad (14)$$

1.7.5 Sensibilidade

A sensibilidade pode ser definida como a razão entre a variação da resposta (ΔL) e a variação de concentração (ΔC) correspondente (**Equação 15**). Permite avaliar a capacidade de um método distinguir pequenas diferenças de concentração do analito.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (15)$$

Quando o modelo é linear a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e é igual ao declive. Num modelo quadrático, a sensibilidade varia ao longo

da gama de trabalho e corresponde à primeira derivada da curva de calibração numa determinada concentração ¹⁶.

1.7.6 Limiares analíticos

Existem diferentes formas de estimar os limiares analíticos de acordo com as metodologias usualmente utilizadas num laboratório ^{15, 68}. Segundo a IUPAC o limite de deteção (LDD), corresponde ao início da gama de concentrações em que é possível distinguir com uma dada confiança estatística (normalmente 95 %), o sinal do branco do sinal da amostra, e como tal indicar se o analito em questão está presente. A gama entre o LDD e o LDQ (limite de quantificação) deve ser entendida como uma zona de deteção qualitativa, e não quantitativa, pelo que não se devem reportar valores numéricos nesta gama. De um modo geral, o limite de deteção é calculado segundo a **Equação 16** ou **17**.

$$\text{LDD} = x_0 + K s_0 \quad (16)$$

$$\text{LDD} = x_0 + K s_0' \quad (17)$$

em que x_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou brancos fortificados com a concentração mais baixa aceitável (de pelo menos dez amostras independentes), s_0 representa o desvio padrão associado, s_0' representa o desvio padrão corrigido ($s_0' = \sqrt{\frac{s_0}{n}}$) e n corresponde ao número de réplicas e normalmente, considera-se o valor de $K = 3,3$.

Outra forma de avaliar o LDD consiste no uso de calibração linear, sendo que nesse caso o limite de deteção é estimado recorrendo à **Equação 18**.

$$\text{LDD} = 3,3 \frac{S_{y/x}}{a} \quad (18)$$

em que, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual e a ao declive da reta ¹⁵.

Quanto ao LDQ, a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) refere que este corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada veracidade e precisão. Na prática, o

LDQ corresponde normalmente ao padrão de menor concentração (excluindo o branco). De modo semelhante ao LDD, o LDQ pode ser calculado segundo a **Equação 19** ou **20**.

$$LDQ = x_0 + K s_0 \quad (19)$$

$$LDQ = x_0 + K s_0' \quad (20)$$

em que x_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou brancos fortificados com a concentração próxima do LDD (de pelo menos dez amostras independentes), s_0 representa o desvio padrão associado, s_0' representa o desvio padrão corrigido ($s_0' = \sqrt{\frac{s_0}{n}}$) e n corresponde ao número de réplicas. Normalmente, considera-se o valor de $K = 10$.

Quando o LDQ é estimado com auxílio de uma calibração linear, o LDQ é determinado recorrendo à **Equação 21**.

$$LDQ = 10 \frac{S_{y/x}}{a} \quad (21)$$

em que, $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual e a ao declive da reta ⁶⁹.

O limite de quantificação deve ser validado experimentalmente, em condições de precisão intermédia, em que se testa o limite de quantificação analisando uma solução padrão de concentração próxima do LDQ, em dez réplicas independentes e determina-se o CV e o ER. Caso estes valores sejam inferiores ou iguais à incerteza do método de ensaio, para o mesmo nível de confiança, ou em caso de ausência da incerteza, estes valores devem ser inferiores a 10 % para validar o LDQ do método. Tendo sido determinado o LDQ, o LDD pode ser estimado como sendo um terço do LDQ, **Equação 22**.

$$LDD = \frac{LDQ}{3} \quad (22)$$

1.7.7 Precisão

A precisão é um termo que remete para a forma de avaliar a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. A precisão geralmente varia com a gama de concentrações ^{15, 16}.

Este parâmetro pode ser expresso sob a forma de desvio padrão, s , de coeficiente de variação, CV (**Equação 23**) e limite de repetibilidade, r (**Equação 24**)^{15, 64, 70}.

Para considerar efeitos de matriz, é aconselhável avaliar a precisão sobre amostras¹⁵.

$$CV (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \% \quad (23)$$

em que s é o desvio padrão e \bar{x} é a concentração média dos resultados obtidos.

Para avaliar a precisão, recorre-se aos conceitos de repetibilidade, de reprodutibilidade e ainda a precisão intermédia ou variação intralaboratorial, de acordo com as condições em que este parâmetro é avaliado.

Assim, a repetibilidade é avaliada a partir da aproximação entre os resultados de medições sucessivas da mesma mensurada, efetuadas nas mesmas condições de medição no mais curto espaço de tempo, ou seja, medições em condições considerando o mesmo laboratório, analista, equipamento e tipo de reagentes.

A partir do desvio padrão de repetibilidade (s_r) obtido com dados do próprio laboratório, é calculado o limite de repetibilidade, r (**Equação 24**), que é definido como o valor abaixo do qual se deve situar, para uma dada probabilidade, a diferença entre dois ensaios, $|x_i - x_{i-1}| \leq r$.

$$r = 2,8 s_r \quad (24)$$

A precisão obtida em condições de reprodutibilidade é avaliada a partir da aproximação entre os resultados de medições sucessivas da mesma mensurada, efetuadas em laboratórios diferentes.

Tal como a repetibilidade, a reprodutibilidade pode ser expressa a partir do desvio padrão de reprodutibilidade (S_R) obtido em ensaios interlaboratoriais. O S_R permite determinar o limite de reprodutibilidade R (**Equação 25**). Este limite define o valor abaixo do qual dois resultados de medida se devem situar, para uma dada probabilidade, em condições de reprodutibilidade.

$$R = 2,8 S_R \quad (25)$$

Estas duas medidas de dispersão referidas representam os extremos da

variabilidade de um método de ensaio, sendo a repetibilidade uma medida de variabilidade mínima e a reprodutibilidade uma medida de variabilidade máxima dos resultados.

A precisão pode ainda ser avaliada numa situação intermédia chamada de precisão intermédia (ISO 5725-3) ¹⁵ e pode ser estimada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo ou diferente laboratório, mas definindo as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes dias; com ou sem variação de calibração.

Esta medida de dispersão é o parâmetro mais realista da variabilidade dos resultados num laboratório e pode ser controlado ao longo do tempo com recurso a cartas de controlo ou cartas de aceitação ^{15, 68}.

Quando se dispõem de muitos dados, uma forma adequada de estimar a precisão intermédia baseia-se na análise de variâncias (ANOVA) ³³. Nesta análise, o conjunto de dados replicados é agrupado, por exemplo, por analista, instrumento, dia, laboratório, método etc., e a variação total em todo o conjunto pode ser representada como a combinação das variâncias (s^2) entre e dentro dos grupos. Assim, a abordagem a ANOVA de um fator (do inglês, one-way ANOVA) é utilizada para obter informação acerca das fontes de variação e desta forma avaliar a precisão intermédia. Na **Tabela 4**, apresenta-se de uma forma esquemática a informação que se obtém a partir da ANOVA de um fator, considerando p grupos, com n replicados com um total de N análises ($N = p n$) para GL graus de liberdade. Cada linha da tabela relaciona-se com uma das fontes de variação: entre os grupos e dentro dos grupos.

Tabela 4 – Esquema da organização dos dados no ensaio de ANOVA um fator ¹³.

Fonte de Variação	Quadrado da soma (SS)	GL	Quadrado das média (MS)
Entre grupos (between)	SS_b	$p-1$	$MS_b = SS_b/(p-1)$
Dentro grupo (within group)	SS_w	$N-p$	$MS_w = SS_w/(N-p)$

O desvio padrão dos resultados para cada material (dentro grupo), permite estimar o desvio padrão de repetibilidade s_r , de acordo com a **Equação 26**:

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad (26)$$

O desvio padrão “entre grupos” é calculado segundo a **Equação 27**:

$$s_{\text{between}} = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}} \quad (27)$$

Por fim, o desvio padrão “entre grupos” é combinado com o desvio padrão de repetibilidade (a partir dos resultados para cada material), de modo a estimar o desvio padrão de precisão intermédia, s_i , **Equação 28**:

$$s_i = \sqrt{s_r^2 + s_{\text{between}}^2} \quad (28)$$

1.7.8 Exatidão vs Justeza

Segundo o Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM) ⁷¹, exatidão corresponde ao grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro. Este termo não deve ser confundido com justeza de medição. Esta por sua vez, corresponde ao grau de concordância entre a média dum número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência ⁷¹.

A exatidão sendo a aproximação entre o resultado da medição e o valor aceite como verdadeiro ^{16, 72}, pode ser estimada por diversas metodologias que consideram o uso de material de referência certificado; ensaios interlaboratoriais; ensaios de recuperação e comparação com métodos de referência.

1.7.8.1 Material de referência certificado

Um material de referência certificado (MRC) é um material de referência que possui um valor de concentração ou grandeza de um parâmetro ou mais parâmetros, respetiva incerteza conhecida e que vem acompanhado de um certificado. O MRC é utilizado no processo de validação de um método sendo que constitui uma boa ferramenta no Controlo de Qualidade Externo (CQE).

Com o uso de um MRC é possível avaliar o desempenho do laboratório. O valor obtido é comparado com o valor certificado e determina-se o *bias* da medição.

Conforme a metodologia definida para os resultados, o Laboratório pode adotar diferentes critérios para aceitação dos resultados MCR, nomeadamente:

- Erro relativo;
- Testes de hipótese (teste t): o valor de t (em módulo) é comparado com t_{tab} para N-1 graus de liberdade. Na situação em que $|t| \leq t_{tab}$ não há evidências significativas que existem erros sistemáticos, logo o ensaio é satisfatório. No entanto se $|t| > t_{tab}$ há evidência significativa que existem erros sistemáticos, logo o ensaio não é satisfatório;
- Fator de desempenho Z (Z-score): O desempenho é classificado consoante o valor de Z, em módulo. Assim se $|Z|$ for inferior ou igual a 2, o desempenho é considerado satisfatório, se $|Z|$ fica compreendido entre 2 e 3, o desempenho é questionável e nas situações em que $|Z|$ é maior que 3, o desempenho é não satisfatório ^{14,15}.
- Erro normalizado (EN): O conceito de EN é utilizado geralmente quando um laboratório calcula a incerteza do resultado de medição (U_{lab}), e o valor verdadeiro (X_v) não está dentro do intervalo de incerteza dos resultados do laboratório X_{lab} . Este intervalo poderá ser subestimado através do EN. Se $|EN| \leq 1$, então U_{lab} está bem estimada.

Na **Tabela 5**, é apresentado um resumo das expressões utilizadas para avaliar a exatidão de um método a partir das diversas metodologias referidas.

Tabela 5 – Tabela resumo com as expressões utilizadas para determinar a exatidão de um método analítico ^{14, 15, 16}.

Designação	Expressão	Significado
Erro relativo	$ER (\%) = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100$	X _{lab} : Valor médio obtido experimentalmente na análise do MRC; X _v : Valor aceite como verdadeiro para o MRC;
Teste de hipótese (teste t)	$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{S_{x_{lab}}}$	X _{lab} : Valor médio obtido experimentalmente na análise do MRC; X _v : Valor aceite como verdadeiro do MRC; N: Número de amostras ensaiadas; S _{x_{lab}} : Desvio padrão associado à média dos valores do laboratório (X _{lab}).
Fator de desempenho Z (Z-score)	$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S}$	X _{lab} : Valor médio obtido experimentalmente na análise do MRC; X _v : Valor aceite como verdadeiro do MRC; S: Unidade de desvio, que pode ser a incerteza do MRC ou outra unidade interna.
Erro Normalizado	$EN = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}}$	X _{lab} – Valor médio obtido experimentalmente na análise do MRC; X _v – Valor aceite como verdadeiro do MRC; U _{lab} – Incerteza do laboratório no seu resultado; U _{ref} – Incerteza do valor verdadeiro.

A periodicidade da análise de MRC deve ser estipulada em função da frequência de análises efetuadas (rotina ou carácter pontual), do grau de conhecimento das amostras, da complexidade das técnicas e do grau de confiança exigido para o resultado ^{15, 73}.

1.7.8.2 Ensaios interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais (EIL) são atividades realizadas para avaliar o desempenho de ensaios na mesma condição ou condições relacionadas por dois ou mais laboratórios de acordo com condições pré-definidas. Estas comparações são organizadas a todos os níveis científicos, mas os objetivos, os protocolos e os participantes variam ⁷⁴.

Dos vários EIL existentes, os mais comuns são os ensaios de aptidão que permitem avaliar o desempenho do laboratório e dos seus analistas, avaliando a qualidade das medições dos laboratórios. O desempenho do laboratório é feito pela entidade organizadora recorrendo à expressão do *Z-score*. Quando existem resultados superiores a dois deve ser elaborado um plano de ações corretivas de forma a procurar as causas do sucedido, corrigi-las e reavaliar-se o ensaio.

1.7.9 Incerteza do método

A incerteza de medição é um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensurada, com base nas informações utilizadas ⁷¹. A incerteza é um termo muitas vezes confundido com o erro de medição, contudo não representa o mesmo conceito, dado que o erro é diferença entre o valor medido e um valor de referência (exatidão) **Figura 14** ⁸.

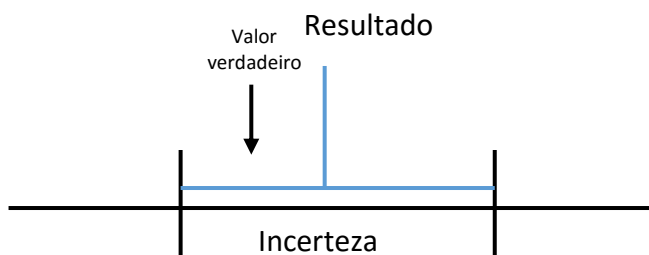


Figura 14 – Relação do resultado de medição e incerteza de medida. Erro de medição: medida de exatidão do método; Incerteza: possibilidade de erro do resultado ⁸.

A incerteza é uma propriedade fundamental do resultado, permitindo avaliar a confiança no resultado, bem como comparar resultados de medida. A NP EN ISO/IEC 17025:2005 reforça esta ideia requerendo que os laboratórios avaliem a sua incerteza de medição ^{36, 14, 8}.

Existem várias metodologias para a estimativa da incerteza da medição, nomeadamente a abordagem passo-a-passo, metodologia baseada nos ensaios interlaboratoriais e metodologia baseada em dados de validação e/ou controlo de qualidade do método analítico recolhidos em ambiente intra-laboratorial. Esta última será a metodologia descrita no presente trabalho uma vez que é a implementada no Laboratório da ARHN, de acordo com a ISO 11352 ⁷⁵.

Esta norma considera a estimativa de incerteza combinando a incerteza da precisão intermédia (reprodutibilidade intra-laboratorial – u_{RW}) e justeza do método e/ou laboratório (quantificado ao *bias* - u_b ou $u_{b,rel}$)⁷⁶.

1.7.9.1 Incerteza associada aos erros aleatórios (condições de precisão intermédia (u_{RW}))

A incerteza associada aos erros aleatórios pode ser quantificada através de diferentes metodologias e normalmente considera-se:

- O desvio padrão de resultados de duplicados ou replicados de uma amostra ou padrão controlo – metodologia utilizada durante a validação dos métodos analisados;
- O desvio padrão estimado a partir dos limites de uma carta de controlo de valores individuais em resultados de replicados ou ainda;
- A amplitude média relativa ou absoluta de resultados replicados de diversas amostras.

No caso do recurso às amostras de controlo, a componente de incerteza de precisão intermédia (u_{RW}) pode ser avaliada através do desvio padrão de amostras de controlo (s_{RW}), sendo $u_{RW} = s_{RW}$. De forma a que possa ser realizado o cálculo de uma forma relativa, a componente de incerteza associada à precisão é determinada pela **Equação 29**.

$$u_{RW} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (29)$$

em que s corresponde ao desvio padrão de uma série de ensaios de padrões controlo, em condições de precisão intermédia e \bar{x} é a concentração média dos padrões de controlo obtida experimentalmente ao longo do tempo²⁶.

1.7.9.2 Incerteza associada aos erros sistemáticos, determinada pelo *bias* (u_b ou $u_{b,rel}$)

O *bias* (desvio) é uma estimativa dos erros sistemáticos que pode ser estimado recorrendo a MRC, EIL ou ensaios de recuperação⁷⁷. No laboratório da ARHN o *bias* é estimado a partir dos resultados obtidos por EIL, recorrendo à **Equação 30**^{73, 78}.

$$u_b = \sqrt{b^2 + \left(\frac{sb}{\sqrt{nM}}\right)^2 + u(C_{ref})^2} \quad (30)$$

sendo b o *bias* (média das diferenças do resultado enviado pelo laboratório e o valor de referência em termos relativos), s_b o desvio padrão dos valores obtidos para análise do

valor de referência, n_M o número de ensaios realizados com o material de referência e $u(C_{ref})$ a incerteza associada ao valor de referência.

1.7.9.3 Incerteza padrão combinada e expandida

A incerteza combinada corresponde à combinação da incerteza associada à precisão (u_{prec}) e da contribuição do *bias* (u_b), **Equação 31** ⁷⁹.

$$u_c = \sqrt{(u_{prec})^2 + (u_b)^2} \quad (31)$$

A incerteza expandida corresponde ao intervalo no qual se espera que haja uma grande fração da distribuição dos valores que podem ser atribuídos à mensuranda. Para estimar a incerteza expandida multiplica-se o valor da incerteza combinada por um fator de expansão, k , para um dado nível de confiança (para 95 %, $k = 2$), **Equação 32**.

$$U = 2 u_c \quad (32)$$

1.8 Garantia de Controlo de Qualidade

Qualquer medição se encontra sujeita a erros, sendo necessário controlar (Controlo de Qualidade – CQ) e minimizar (Garantia de Qualidade – GQ) a sua ocorrência e desta forma o Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) adotado poderá ser garantido e melhorado. Um dos objetivos do SGQ é garantir e controlar a qualidade dos resultados obtidos diariamente, tornando-se necessário avaliar periodicamente a exatidão (veracidade e precisão) dos resultados, recorrendo ao CQ interno e externo ⁸⁰.

1.8.1 Controlo de Qualidade Externo

O controlo de qualidade externo (CQE) consiste nas ações de CQ efetuadas pelo laboratório mas cuja realização depende de uma intervenção externa ao laboratório ⁸¹, englobando o uso de MRC ou participação em EIL ⁸⁰.

1.8.2 Controlo de Qualidade Interno

O controlo de qualidade interno consiste nas ações de CQ cuja implementação depende apenas da vontade e meios do laboratório e não de um fator externo ⁸¹. Normalmente, este controlo é realizado através de cartas de controlo.

1.8.2.1 Cartas de controlo

Durante a monitorização dos resultados obtidos por um laboratório, gera-se uma grande quantidade de dados que por vezes dificulta a interpretação dos mesmos. No entanto, a utilização de cartas de controlo permite facilmente proceder a sua monitorização. As cartas de controlo, implementadas por Shewhart em 1931 ⁸², são gráficos onde os valores medidos (de uma determinação) são registados em função do tempo. Como consequência, é produzido um gráfico onde se podem observar facilmente as flutuações naturais do valor medido.

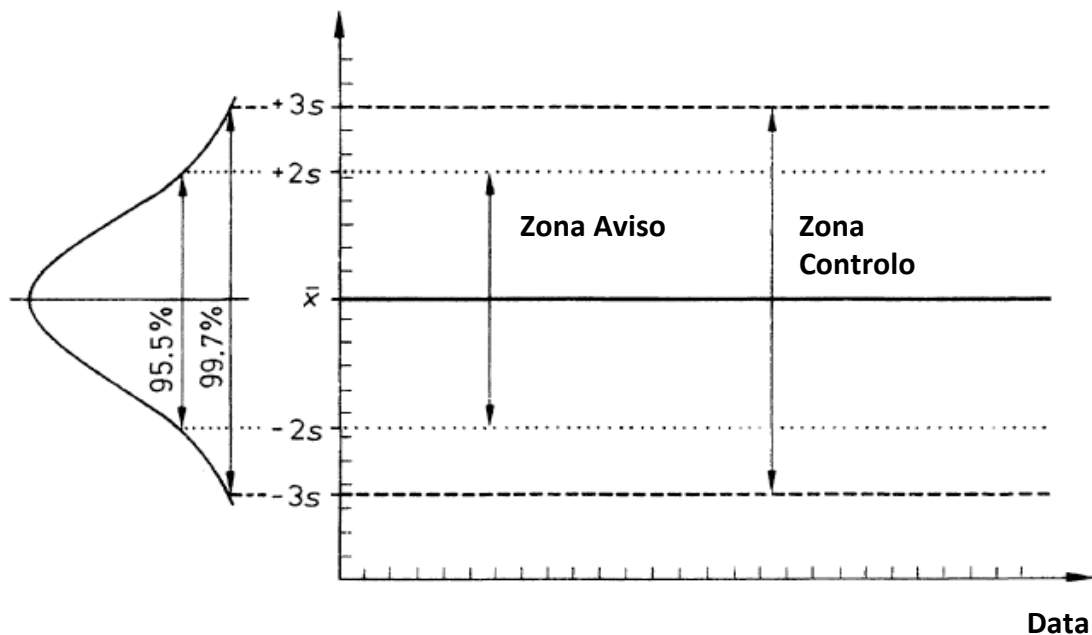


Figura 15 – Esquema da relação entre a distribuição normal e a uma carta de controlo ⁹.

O gráfico é baseado nas características estatísticas de variações aleatórias, definidas pela distribuição normal. O utilizador pode definir limites de aviso e limites de ação para atuarem como sistemas de alarme quando o sistema se encontra fora de controlo. A relação entre a curva de distribuição normal e a carta de controlo encontra-se na **Figura 15** ⁹.

Este gráfico, é constituído por cinco linhas: a linha central, LC, os limites de aviso superior e inferior, LAS e LAI, e os limites de controlo superior e inferior, LCS e LCI, e ⁶⁹.

As cartas de controlo mais utilizadas são as de indivíduos ou de médias e as cartas de amplitudes ⁸³.

As cartas de médias mostram o modo como os valores médios estão relacionados com o valor alvo. Não fornecem informação acerca da distribuição dos resultados individuais. Com as cartas de amplitudes pode controlar-se a precisão pois a amplitude é definida como a diferença entre o maior e o menor valor de um conjunto de análises ⁸⁴.

A linha central é obtida pelo valor atribuído correspondente à média das medições repetidas, \bar{x} . Os LA e de LC são determinados pelas **Equações 33 e 34**, para uma carta de indivíduos, respetivamente, e correspondem às probabilidades de 95% e 99,7%.

$$LA = \bar{x} \pm 2 s \quad (33)$$

$$LC = \bar{x} \pm 3 s \quad (34)$$

Para uma carta de médias as **Equações 35 e 36** correspondem ao cálculo das LA e de LC.

$$LA = \bar{x} \pm 2 \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (35)$$

$$LC = \bar{x} \pm 3 \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (36)$$

Desta forma, com pontos recolhidos como rotina, e a partir da média e do desvio padrão calculam-se a linha central e os limites.

Nas cartas de amplitudes, os limites podem ser determinados a partir de duplicados de uma amostra. O valor de s é determinado pelo quociente entre a média aritmética das amplitudes (\bar{R} , diferença entre dois valores num duplicado de amostras) e uma constante tabelada d_2 , **Equação 37**.

$$s = \frac{\bar{R}}{d_2} \quad (37)$$

O valor de d_2 depende do número de determinações, sendo o mais comum $n = 2$, e se o valor de referência é ou não conhecido ⁹.

Capítulo 2 – Parte experimental

Neste capítulo são apresentados os reagentes, a preparação das soluções padrão e os procedimentos utilizados para a determinação da turvação por nefelometria e determinação da clorofila *a* por espectrofotometria de absorção molecular. Os dados experimentais foram adquiridos com base nos procedimentos aplicados no Laboratório. Os métodos implementados foram utilizados na análise de amostras de águas naturais.

A água ultra-pura utilizada para a preparação das soluções foi obtida através de um sistema de purificação Millipore Milli-Q Gradient A10. Todo o material volumétrico utilizado foi de classe A.

As frases de advertência de perigo e recomendações de prudência relativas aos reagentes utilizados encontram-se apresentadas nos anexos **Tabelas A1 e A2**.

2.1 Determinação da turvação

2.1.1 Reagentes, material e equipamentos

Nas **Tabelas 6, 7 e 8** encontram-se as características dos reagentes, o material de vidro e os equipamentos utilizados na determinação da turvação, respetivamente.

Tabela 6 – Características dos reagentes utilizados na determinação da turvação ¹⁷.

Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Pureza (%)	Marca	H	P
Sulfato de hidrazina	H ₆ N ₂ SO ₄	130,12	99,0	Merck	H350; H301+H311+H331; H317; H410	P201; P273; P302+P352; P304+P340; P308+P310
Hexametenotetramina	C ₆ H ₁₂ N ₄	140,19	99,5	Riedel-de-Häen	H301 + H311 + H331; H317; H350; H410	P210; P261; P262; P280

Tabela 7 – Material de vidro utilizado na determinação da turvação.

Material	Volume (mL)
Balões volumétricos classe A	1000 ± 0,40
	500 ± 0,25
	250 ± 0,15
	200 ± 0,15
	100 ± 0,10
Frascos de amostra (<i>vials</i>)	30

Tabela 8 – Equipamentos utilizados na determinação da turvação.

Equipamento	Modelo	Marca	Incerteza	Gama
Turbidímetro	TU5200	Hach Lange	± 0,001 NTU	0 – 1000 NTU
Balança	PB1501-5	Mettler Toledo	± 0,1 g	5 - 1510 g
Balança	AG 204	Mettler Toledo	± 0,0001 g	0,1 – 210 g
Micropipeta	13220-00	Kartell	± 0,1 µL	0,1 - 1000 µL
	13013-00		± 0,05 µL	0,05 -200 µL

2.1.2 Preparação das soluções

Suspensão mãe de formazina

a) Solução I

Dissolveu-se 1,000 g de sulfato de hidrazina, $(\text{NH}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$, em água ultrapura e diluiu-se até 100 mL num balão volumétrico.

b) Solução II

Dissolveu-se 10,000 g de hexametenotetramina, $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$, em água ultrapura e diluiu-se até 100 mL num balão volumétrico.

As duas soluções foram misturadas e deixou-se repousar durante 24 h à temperatura ambiente. Guardou-se num frasco escuro, de forma a proteger da radiação. Esta suspensão mãe apresenta uma turvação de 4000 NTU e permanece estável num prazo de um ano. A reação subjacente à formação de formazinha encontra-se na **Figura 16**⁸⁵.

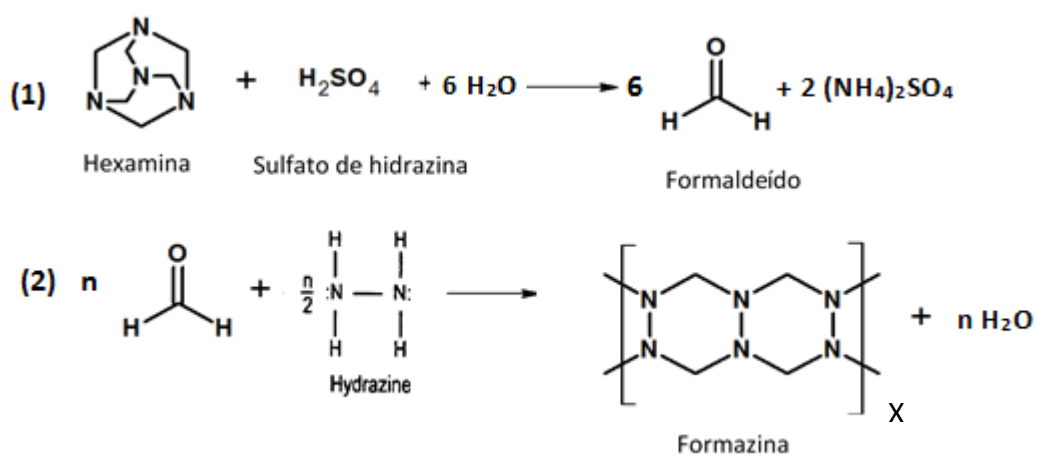


Figura 16 – Reação de formação do polímero de formazina, resultante da combinação de sulfato de hidrazina com hexametiltetramina ¹⁰.

Suspensão padrão de formazina

A partir da suspensão mãe de formazina, preparou-se uma série de padrões, com valores de turvação de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20 NTU¹, seguindo as instruções da **Tabela 9**.

Tabela 9 – Volumes utilizados da suspensão mãe de formazina para obter os padrões.

Suspensão padrão (NTU)	Volume da suspensão mãe (µL)	Volume final (mL)
1,0	250	1000
2,5	125	200
5,0	125	100
10,0	125	50
20,0	500	100

¹ Nota: Estas suspensões foram preparadas imediatamente antes de serem utilizadas e descartas no final do ensaio.

2.1.2 Colheita e transporte de amostras

As amostras foram colhidas em frascos de polietileno, colhendo no mínimo 2 L. De seguida foram transportadas para o Laboratório e analisadas de seguida. No caso de não serem analisadas imediatamente, foram conservadas a 4 °C e analisadas até 48 h.

2.1.3 Procedimento experimental

2.1.3.1 Reta de calibração

Realizou-se uma reta de calibração com as suspensões padrão de formazina preparadas como indicado na **Tabela 9**.

Antes da leitura, o frasco contendo o padrão foi agitado vigorosamente por inversão de forma a homogeneizar a suspensão. Transferiu-se o padrão para a célula de leitura até a marca. Fechou-se a tampa do equipamento e registou-se o valor medido em NTU.

2.1.3.2 Determinação da turvação

Para avaliar a calibração do equipamento, foi analisada a turvação da suspensão StabCal de 10,0 NTU (fornecida com o equipamento). Este padrão foi também medido a cada dez análises de amostras, tendo sido definido como critério de aceitação o valor de 10 %.

Tal como para os padrões, as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento, isto é, o frasco foi invertido para homogeneizar a suspensão antes de efetuar a leitura no nefelómetro.

2.2 Determinação de clorofila a por espectrofotometria de absorção molecular

2.2.1 Reagentes, material e equipamentos

Nas **Tabelas 10, 11 e 12** encontram-se as características dos reagentes, o material de vidro e os equipamentos utilizados na determinação da clorofila a , respetivamente.

Tabela 10 - Características dos reagentes utilizados na determinação da clorofila *a* ¹⁷.

Reagente	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Pureza (%)	Marca	H	P
Acetona 90% (V/V)	C ₃ H ₆ O	58,08	99,5	Sigma Aldrick	H225; H319; H336	P210; P305+P351+P338; P370+P378; P403+P235
Ácido clorídrico	HCl	36,46	37,0	Merck	H290; H314; H335	P261; P280; P305+P351+P338; P310
Clorofila <i>a</i> (<i>Anacystis nidulans</i> algae)	C ₅₅ H ₇₂ MgN ₄ O ₅	893,49	99,0	Sigma Aldrick	H302+H312; H332	P301+P310; P302+P352; P304+P340; P305+P351+P338:

Tabela 11 – Material utilizado na determinação da clorofila *a*.

Material	Volume (mL)
Balões volumétricos classe A	1000 ± 0,4 200 ± 0,15 100 ± 0,10
Proveta graduada	500 ± 2,5
Tubos de centrifuga	10 ± 0,1
Cuvettes com percurso ótico de 4 ou de 5 cm	5 - 10

Tabela 12 – Equipamentos utilizados para a determinação da clorofila *a*.

Equipamento	Modelo	Marca	Incerteza	Gama
Espectrofotómetro	U – L00	HITACHI	± 0,001	
Micropipeta	13220-00 13013-00	Kartell	± 0,1 µL ± 0,05 µL	0,1 - 1000 µL 0,05 - 200 µL
Pipeta Automática	X632800	Gilson	± 0,06 mL	0,06 – 10 mL
Balança	PB1501-5	Mettler Toledo	± 0,1 g	5 - 1510 g
Cronómetro	-	Timer Clock	± 1 s	-
Centrifuga	C312	Jouan	-	-
Bomba de vácuo	DOA-P181BN	Gelman Laboratory	-	-
Rampa de filtração	-	Milipore	-	-

2.2.2 Preparação das soluções

Acetona a 90 % (V/V)

Adicionou-se num balão volumétrico de 100 mL, 90 mL de acetona pró-análise e fez-se o volume com água ultrapura. Homogeneizou-se a solução e guardou-se em frasco de vidro vedado.

Ácido clorídrico (0,1N)

Mediu-se 8,5 mL de ácido clorídrico concentrado e transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL contendo 500 mL de água ultrapura. Deixou-se arrefecer e adicionou-se água ultrapura até prefazer os 1000 mL. Homogeneizou-se a solução e guardou-se em frasco escuro vedado.

Solução mãe de clorofila *a* (10 mg/L)

Dissolveu-se 1,0 mg de clorofila *a*, em água ultrapura e diluiu-se num balão volumétrico de 100 mL. Guardou-se em frasco de vidro envolto em papel de alumínio, a -20 °C. Esta solução permanece estável durante um ano.

Solução de trabalho de clorofila *a* (200 µg/L)

A partir da solução mãe de clorofila *a*, preparou-se uma solução padrão de 200 µg/L em cada mês (ou sempre que seja necessário). Retirou-se 50 µL da solução mãe para um balão volumétrico de 1000 mL. Guardou-se em frasco de vidro envolto em papel de alumínio e sempre que não estava em uso, guardou-se a -20 °C.

Soluções padrão de clorofila *a*

Preparou-se uma série de soluções padrões, com valores de concentração 20, 30, 50, 100 e 200 µg/L, de acordo com os valores apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Volumes utilizados da solução mãe de clorofila *a* para obter as soluções padrão necessárias, em volume final de 100 mL, à realização da curva de calibração.

Solução padrão (µg/L)	Volume da solução mãe (mL)
20	10
30	15
50	25
100	50
200	100

2.2.3 Amostragem e conservação das amostras

Amostragem

Foi colhido um mínimo de 2L de água em frascos de polietileno.

Conservação das amostras

As amostras foram transportadas e conservadas a $\pm 5,0$ °C e ao abrigo da luz. Entre a colheita e a filtração decorreu um intervalo inferior a 6 – 8 h².

2.2.4 Procedimento experimental

2.2.4.1 Reta de calibração

Filtração:

Inicialmente homogeneizou-se os padrões. Filtrou-se 100 mL através de uma membrana de acetato de celulose (com 47 mm de diâmetro e 0,45 μ m de porosidade), na rampa de filtração, tendo o cuidado de realizar a filtração a baixa pressão para evitar a fragmentação das células. Manteve-se a filtração por 10 minutos. Retirou-se a membrana com o auxílio de uma pinça, sobre o papel de filtro, dobrou-se e enxaguou-se as membranas. Procedeu-se à extração dos pigmentos, ou caso contrário, embrulhou-se as membranas em papel de alumínio devidamente identificado. Armazenou-se as amostras no escuro e no frio, ficando conservados alguns dias a 4 °C ou durante 1 mês a -20 °C.

Extração e centrifugação:

Introduziu-se a membrana após filtração num tubo de centrífuga de polietileno e adicionou-se 10 mL de acetona 90 %. Tapou-se o tubo com Parafilm M[®]. Para a preparação do branco, colocou-se num outro tubo de centrífuga, 10 mL de acetona 90 %, procedendo de igual forma às amostras. Centrifugou-se durante 10 - 15 minutos a 3000 - 4000 rpm. Realizou-se a leitura do padrão imediatamente após a centrifugação.

² Nota: além da luz, o pH também interfere pois converte a clorofila *a* em feofetinas *a*. Uma forma de superar a acidificação consiste na adição de 2 a 3 gotas de carbonato de magnésio ao filtro (numa solução saturada de 1,0 g em 100,0 mL de água).

Medições espectrofotométricas:

Transferiu-se 5 mL do extrato da solução padrão do tubo de centrifuga para a cuvette de 5 cm de percurso ótico pipetando cuidadosamente. Mediu-se a absorvância a 665 e 750 nm, face a um branco de acetona a 90 %. Adicionou-se 100 μ L de ácido clorídrico na cuvette e misturou-se cuidadosamente. Esperou-se dois minutos e mediu-se, outra vez, a absorvância do extrato da amostra a 665 e 750 nm, face ao branco de acetona a 90 %. Determinou-se as concentrações de clorofila *a* de acordo com a equação de Lorenzen (**Equação 1**).

2.2.4.2 Leitura das amostras

Para as amostras, o procedimento foi idêntico ao das soluções padrão apresentando duas diferenças. Durante a filtração, o volume de 1000 mL é passado pela membrana de filtração. No passo da extração, o tubo de centrifuga contendo a membrana e a acetona 90 %, é fechado com Parafilm M[®] e envolto com papel de alumínio sendo colocado no frigorífico a 4 °C de 8 - 20h.

Capítulo 3 – Apresentação e discussão dos resultados

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos, assim como as metodologias implementadas para a validação dos dois métodos analíticos: a determinação da turvação pelo método nefelométrico e a determinação de clorofilas *a* pelo método da espectrofotometria de absorção molecular.

Para a avaliação do desempenho dos métodos analíticos, seguiram-se os guias da Relacre nº 3, Validação de Resultados em Laboratórios Químicos ¹⁵, e nº 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química ⁶⁹ e a metodologia aplicada pelo Laboratório. Os parâmetros da seletividade, gama de trabalho, linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação e exatidão foram caracterizados. A incerteza de medição foi avaliada de modo a averiguar a dispersão dos valores atribuídos à mensuranda, com base em dados de validação e controlo de qualidade do método analítico. Concluído o processo de validação, fez-se um estudo do controlo de qualidade utilizando como ferramentas cartas de controlo.

Em termos de organização de conteúdos, apresenta-se em primeiro lugar a validação do método da determinação da turvação, seguida da determinação da clorofila *a*

Finalmente descreve-se sucintamente as outras atividades que foram desenvolvidas no laboratório durante o Projeto Individual.

3.1 Validação de métodos analíticos

3.1.1 Determinação da turvação

Na validação do método de turvação, foram considerados 10 padrões independentes para a avaliação de todos os parâmetros, à exceção da curva de calibração em que cada padrão foi analisado com três réplicas independentes. Em todos os casos, foi realizado o teste de *Grubbs* para analisar a necessidade de rejeição de valores discrepantes em réplicas.

3.1.1.1 Curva de calibração

A curva de calibração foi traçada considerando seis padrão e os respetivos valores de turvação, **Tabela 14**. Os valores apresentados são o resultado da média de três sinais obtidos para os padrões independentes. Apesar da norma EPA ⁸⁶, referir a

necessidade de calibrar o nefelômetro a cada seis meses, esta calibração foi realizada com mais regularidade para realizar os ensaios de validação.

Tabela 14 – Valores de turvação registados (NTU) para as soluções padrão de formazina numa gama de 0,0 a 20,0 NTU para o traçado da reta de calibração.

Padrão de Formazina (NTU)	Turvação média (NTU)	Desvio padrão (NTU)
0	0,093	0,018
1,00	1,010	0,011
2,50	2,510	0,013
5,00	5,11	0,25
10,00	9,71	0,43
20,00	20,24	0,93

A existência de *outliers* na reta de calibração foi avaliada através da aplicação da condição $|y_i - \hat{y}_i| > 2s_{y/x}$ e como nenhuma diferença entre o valor experimental e o valor interpolado na reta, em módulo, foi superior à duas vezes o valor dos resíduos, nenhum valor foi rejeitado.

Traçou-se a reta de calibração representando a turvação média experimentalmente em função da turvação dos padrões preparados, **Figura 17**. Para cada padrão foram analisadas três réplicas independentes, e no gráfico é apresentada o valor médio e a barra de erro (dada pelo desvio padrão). O valor do coeficiente de correlação obtido foi de 0,9997, que é superior a 0,999, valor recomendado pela norma ISO 8466 ⁶⁶.

Os valores das incertezas associadas à reta de calibração foram determinados e estão apresentados na **Tabela 15**. A reta é apresentada sob a forma $T \text{ (NTU)} = (a \pm t_{s_a}) C \text{ (NTU)} + (b \pm t_{s_b}) \text{ (NTU)}$ para uma probabilidade de 95 %, em que T representa a turvação lida e C a concentração dos padrões.

Tabela 15 – Intervalos de confiança do declive e da ordenada na origem associados à reta de calibração para a determinação da turvação por nefelometria, bem como valores do coeficiente de correlação, desvio padrão e coeficiente de variação do método.

$a \pm t s_a$	$b \pm t s_b$ (NTU)	$S_{y/x}$ (NTU)	r	S_m (NTU)	CV (%)
$1,0048 \pm 0,0019$	$- 0 \pm 0,30$	0,196	0,9997	0,195	3,0

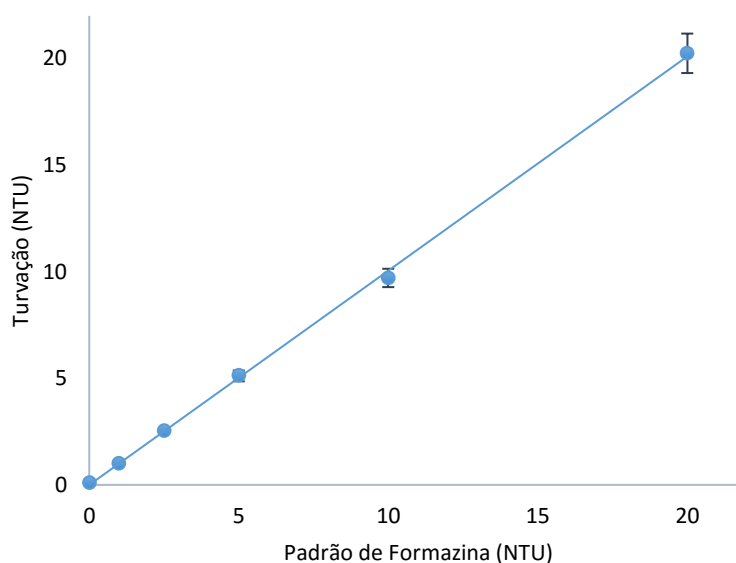


Figura 17 – Representação gráfica dos valores de turvação em função dos padrões de formazina.

A reta de calibração apresentada na **Figura 17**, tem como equação $T \text{ (NTU)} = (1,0048 \pm 0,0019) C \text{ (NTU)} - (0,00 \pm 0,30) \text{ (NTU)}$ e um coeficiente de correlação de 0,9997.

Para considerar a calibração aceitável, o declive deve ser unitário (1,00) e a ordenada na origem deve ser nula ⁸⁷. Os valores de declive ($1,00 \pm 0,00$) e de ordenada na origem de $- (0 \pm 0,30)$, demonstram que a calibração do equipamento é adequada.

As características do método, desvio padrão e coeficiente de variação, foram também determinadas e encontram-se apresentadas na **Tabela 15**. O coeficiente de variação do método é considerado aceitável quando este se encontra abaixo de 10 %. Neste método obteve-se um valor de 3,0 %, indicando uma baixa dispersão dos resultados ⁸⁶.

Como a reta de calibração apresentou um coeficiente de correlação muito elevado, $r = 0,9997$, considerou-se o ajuste da curva de calibração como sendo linear

não sendo necessário a avaliação da linearidade pelo teste de *Mandel*.

3.1.1.2 Sensibilidade

Dado que o método segue um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho e é igual ao declive da reta de calibração. Realizou-se um estudo da sensibilidade a partir da análise de 10 retas de calibração independentes. Os valores dos declives obtidos nos ensaios realizados em dias diferentes encontram-se apresentados na **Tabela 16**.

Tabela 16 – Valores da sensibilidade do método obtidos em dias diferentes.

Data de ensaio	Declive
27/04/2017	1,0090
27/04/2017	1,0510
27/04/2017	0,9544
2/05/2017	0,9901
2/05/2017	0,9929
4/05/2017	1,0470
4/05/2017	0,9589
8/05/2017	0,9952
9/05/2017	0,9992
15/05/2017	0,9768
Média	0,9975
s	0,032
s _r	0,064

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 16**, observa-se que os valores do declive são todos muito próximos. Nenhum valor foi rejeitado através do teste de *Grubbs*. O intervalo de confiança do declive apresentado para 95 % de probabilidade foi determinado como sendo $1,00 \pm 0,02$. O valor de referência de 1,00 está contido no intervalo de confiança demonstrando a validade da calibração ao longo dos vários dias. De referir ainda que a incerteza relativa apresenta um valor baixo de 2 % demonstrando a baixa dispersão entre os valores do declive ao longo dos dias.

3.1.1.3 Seletividade

A seletividade foi avaliada a partir de ensaios de recuperação expressos a partir da taxa de recuperação, recorrendo à análise de 10 ensaios independentes de padrões em diferentes níveis de concentração, P, amostras de água, A, e amostras fortificadas, AF, em vários dias. Na **Tabela 17**, encontram-se os valores dos resultados obtidos no estudo da seletividade do método, em que as matrizes foram fortificadas em três níveis de concentração: 1,0; 2,5 e 5,0 NTU.

Tabela 17 – Valores de turvação obtidos no estudo da seletividade através de ensaios de recuperação em vários níveis de concentração de formazina.

Data do ensaio	Turvação (NTU)			Taxa de recuperação
	P	A	AF	(%)
24/04/2017	1,123	1,110	2,242	100,0
24/04/2017	1,089	0,884	1,876	91,0
24/04/2017	1,012	1,174	2,190	100,0
24/04/2017	1,007	0,809	1,800	98,0
24/04/2017	1,006	1,094	2,023	92,0
24/04/2017	1,029	0,808	1,736	90,0
26/04/2017	2,531	2,654	5,259	102,0
26/04/2017	2,493	2,984	5,429	98,0
2/05/2015	4,928	3,945	9,202	107,0
4/05/2017	2,549	2,231	4,736	98,0

Com base na análise dos resultados apresentados na **Tabela 17**, verifica-se que as taxas de recuperação estão compreendidas entre 90 – 107 %. Estes valores encontram-se dentro dos limites de aceitação estabelecido pelo Laboratório da ARHN para este parâmetro (100 ± 10 %). De referir que os testes de recuperação foram o mais representativo possível, pois recorreu-se a amostras analisadas por rotina por parte do Laboratório. Assim, dado que as taxas de recuperação se encontram compreendidas no intervalo de 90 e 100%, pode-se concluir que a determinação da turvação é um método seletivo.

3.1.1.4 Gama de trabalho

A escolha dos padrões para o estudo da gama de trabalho foi realizada de acordo com os critérios implementados por outros laboratórios da APA, I.P. que realizam este ensaio, bem como o tipo de amostras que o Laboratório analisa em rotina. Deste modo, o padrão de concentração mais baixa de formazina escolhido foi de 1,0 NTU e o padrão de concentração mais elevada, o de 20,0 NTU. Os resultados obtidos no estudo da gama de trabalho encontram-se expressos na **Tabela 18**, em que foram analisadas 10 soluções independentes dos padrões de 1,0 e 20,0 NTU.

Tabela 18 – Valores de turvação obtidos no estudo da gama de trabalho em condições de repetibilidade de 10 leituras independentes dos padrões de concentração mais baixa e mais alta, 1,0 e 20,0 NTU, respetivamente.

Réplicas Padrões	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7	y8	y9	y10
0										
1,0	1,112	1,212	1,099	1,123	1,156	1,108	1,007	1,087	1,007	1,241
2,5										
5,0										
10,0										
20,0	20,25	20,46	20,55	20,42	20,64	20,38	20,65	20,36	20,38	20,50

A partir destes resultados realizou-se o teste de *Fisher-Snedecor* de modo a averiguar a homogeneidade de variâncias, com base na norma ISO 8466 ⁶⁶, **Tabela 19**.

Tabela 19 – Valores utilizados na aplicação do teste de homogeneidade de variâncias para o estudo da gama de trabalho.

Padrões (NTU)	Média (NTU)	s ² (NTU) ²	PG	F
1,0	1,1152	0,0057	3,066	4,026
20,0	20,459	0,016		

Conforme verificado na **Tabela 19**, o valor de PG calculado (3,066) é inferior ao valor de F tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor* (4,026) pelo que se pode concluir que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias dos padrões

mais diluído e mais concentrado, 1,0 e 20,0 NTU. Assim, concluiu-se que a gama de trabalho está bem ajustada ao objetivo.

3.1.1.5 Precisão

Durante este trabalho foi possível avaliar a precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia. A avaliação da precisão em condição de reprodutibilidade requer ensaios interlaboratoriais e como o método é recente no Laboratório (entrada em Fevereiro de 2017), a participação em ensaios interlaboratoriais ainda não ocorreu e, portanto, a reprodutibilidade não foi avaliada.

Repetibilidade

A precisão em condições de repetibilidade foi avaliada pela análise de 10 amostras independentes dos padrões 1,0 e 20,0 NTU num mesmo dia. Os resultados obtidos nesses ensaios encontram-se apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20 – Avaliação da precisão do método de turvação em condições de repetibilidade.

Formazina (NTU)	Padrão de 1,0 NTU	Padrão de 20,0 NTU
Y ₁	1,112	19,52
Y ₂	1,212	19,36
Y ₃	1,099	19,45
Y ₄	1,123	19,72
Y ₅	1,156	19,18
Y ₆	1,108	19,73
Y ₇	1,007	19,80
Y ₈	1,187	19,45
Y ₉	1,007	19,73
Y ₁₀	1,241	19,55
Médias (NTU)	1,117	19,55
r (NTU)	0,067	0,20
CV (%)	0,19	0,55
CV (%)	6,7	0,98
ER (%)	7,3	2,3

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 20**, concluiu-se que o método apresenta uma repetibilidade intra-dia satisfatória, visto que o coeficiente de variação relativo, CV, é inferiores a 10 %, para ambos os padrões, limite imposto pela norma EPA de Agosto de 1993 ⁸⁶. Como seria de esperar verifica-se que o valor de erro relativo para o padrão mais baixo (7 %) é maior do que o erro relativo para o padrão

mais elevado (2 %). Os valores de limite de repetibilidade obtidos foram 0,21 e 0,55 NTU para o padrão mais diluído e concentrado, respetivamente. Assim, num curto espaço de tempo a diferença entre dois duplicados relativos aos padrões de 1,0 e 20,0 NTU deverá ser inferior a 0,21 e 0,55 NTU, respetivamente.

Precisão intermédia

A precisão intermédia foi avaliada considerando dez amostras independentes para um nível de concentração analisadas em três dias diferentes, ISO 5667-3⁴⁰. A **Tabela 21** apresenta os resultados obtidos para a determinar a precisão intermédia, assim como a média, desvio padrão, coeficiente de variação e erro relativo de três conjuntos de dez análises independentes do padrão de 20,0 NTU. Como se pode observar, o valor do erro relativo da precisão representativo em condição de repetibilidade é de 2 %.

Tabela 21 – Valores de turvação obtidos dos padrões de controlo de 20,0 NTU utilizados para avaliar a precisão em condições intermédias.

Padrão de 20,0 NTU	11/04/2017	19/04/2017	20/04/2017
Y ₁	20,25	19,52	20,55
Y ₂	20,46	19,36	20,46
Y ₃	20,73	19,45	20,13
Y ₄	20,42	19,72	19,46
Y ₅	20,64	19,18	19,87
Y ₆	20,38	19,73	21,33
Y ₇	20,55	19,80	20,45
Y ₈	20,36	19,45	20,92
Y ₉	20,38	19,73	19,99
Y ₁₀	20,50	19,55	19,79
Média (NTU)	20,47	19,55	20,29
s (NTU)	0,14	0,20	0,53
CV (%)	0,68	0,98	2,66
ER (%)	2,34	2,26	1,47

A precisão intermédia foi determinada recorrendo à análise de variâncias (ANOVA) univariada¹³. As réplicas dentro de cada grupo foram obtidas em condições de repetibilidade e as condições analíticas foram variadas entre os grupos, nomeadamente as análises foram realizadas em dias diferentes. A partir das expressões referentes ao desvio padrão da repetibilidade, s_r , (**Equação 26**) e do desvio padrão do fator entre grupos, $s_{between}$, (**Equação 27**) foi possível determinado o valor do desvio padrão da

precisão intermédia, s_i , (**Equação 28**). Os valores obtidos encontram-se compilados na **Tabela 22**.

Tabela 22 – Valores obtidos a partir da ANOVA para a determinação da precisão intermédia em que s_r corresponde ao desvio padrão da repetibilidade e s_i corresponde à precisão intermédia.

MS_w	s_r	MS_b	$S_{between}$	s_i	r	CV (%)	ER (%)
0,12	0,35	2,38	0,27	0,44	1,25	2,24	0,5

O valor de precisão intermédia estimado a partir da ANOVA foi de 0,44 NTU, representando uma variação baixa (2 %). Foi também possível obter o valor da precisão em condições de repetibilidade (0,35 NTU), que é representativo dos valores obtidos referentes aos 3 conjuntos de análises realizados em dias distintos (**Tabela 21**).

Por sua vez, o valor de limite de precisão intermédia obtido foi 1,2 NTU, o que significa que a diferença entre dois valores obtidos, para o padrão de 20,0 NTU, deverá ser inferior a 1,2 NTU independentemente do tempo que decorre entre leituras.

Pode-se portanto concluir que o método é preciso, em condições de precisão intermédia, uma vez que o CV e ER revelaram ser inferiores a 10 % para o padrão de 20,0 NTU como refere a norma EPA ⁸⁶.

3.1.1.6 Limiares analíticos

Para a avaliação dos limiares analíticos, recorreu-se à análise de dez padrões independentes de concentração mais baixa de formazina (1,0 NTU), em condições de repetibilidade. Os valores obtidos encontram-se na **Tabela 23**.

Tabela 23 – Valores obtidos de turvação para dez padrões de concentração mais baixo (1,0 NTU) de modo a determinar os limiares analíticos.

Branco	Turvação (NTU)
Y ₁	1,112
Y ₂	1,212
Y ₃	1,099
Y ₄	1,123
Y ₅	1,241
Y ₆	1,156
Y ₇	1,087
Y ₈	1,108
Y ₉	1,007
Y ₁₀	1,007
Média (NTU)	1,115
s (NTU)	0,076
s' (NTU)	0,024
LDD (NTU)	0,078
LDQ (NTU)	0,24

A partir da análise dos dez ensaios independentes dos brancos calcularam-se os limiares analíticos segundo as **Equações 17** e **20**, respetivamente). Assim, pode-se afirmar que o método consegue detetar a partir de 0,078 NTU de turvação, mas apenas para valores superiores a 0,24 NTU é capaz de quantificar. No entanto, o valor do padrão mais baixo escolhido para a curva de calibração foi de 1,0 NTU para que o volume a retirar da solução *stock* seja considerável de modo a minimizar a incerteza na preparação dos padrões. Este valor é adequado considerando que o Decreto-Lei 306/2007 determina que o valor de turvação máximo de uma água de consumo não deverá exceder o valor 4,0 NTU^{31, 88}.

3.1.1.7 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que pode ser avaliado de formas distintas como já referido no capítulo 1, podendo envolver a realização de ensaios de recuperação, a participação de ensaios interlaboratoriais, EIL, ou ainda utilização de materiais de referência certificados, MCR. Como os ensaios de validação da turvação tiveram início no Laboratório da ARHN a partir de março de 2017, e os EIL em que o Laboratório participa, ocorrem em meados de outubro, não foi possível ainda participar num EIL para este parâmetro.

Contudo, a amostra enviada pela *Aquacheck* no ano anterior foi utilizada como um MRC (X_{ref}), e deste modo foi possível avaliar a exatidão com base no fator de desempenho Z. Preparou-se dez soluções independentes do MRC conforme o indicado pela *Aquacheck* e determinou-se a turvação (X_{lab}). Os valores de X_{ref} e X_{lab} estão comparados na **Tabela 24** onde se apresenta também o valor de *Z-score*.

Tabela 24 – Resultados obtidos para avaliar a exatidão da turvação.

MRC	Unidades do resultado	X_{lab}	X_{ref}	S_{MRC}	<i>Z-score</i>
<i>Aquacheck</i> 517 Sample 3S	NTU	2,110	2,300	0,267	-0,713

De acordo com o Guia ISO/CEI 43⁸⁹ um valor do *Z-score* inferior a 2 em módulo, corresponde a um desempenho satisfatório. Como se pode verificar o fator de desempenho Z é baixo e pode-se afirmar que os resultados apresentam uma boa exatidão.

3.1.1.8 Estimativa da incerteza de medição

A incerteza de medição associada ao método foi calculada recorrendo à metodologia que o Laboratório utiliza como rotina, nomeadamente a norma ISO 11352⁹⁰.

Em geral, a reprodutibilidade intralaboratorial (erros aleatórios) e o *bias* (erros sistemáticos) são determinados independentemente usando dados de validação e resultados analíticos de controlo de qualidade.

Como se dispunha apenas de um material de referência (amostra *Aquachek* 517 3S; $2,30 \pm 0,03$ NTU), os resultados foram tratados como a melhor estimativa disponível para a componente de incerteza de medição associado ao *bias* do método e do Laboratório, u_b , **Tabela 25**.

Tabela 25 – Resultados obtidos com o Material de Referência Certificado da *Aquacheck* utilizados para calcular o valor do *bias* relativo ao parâmetro da turvação.

b_{rel}	S_b	n_M	$u_{Cref,rel}$
-0,0823	0,0415	10	0,00434

O valor de u_b foi calculado segundo a **Equação 30**, tendo-se obtido um resultado de 0,0839, ou seja, 8,4 %. Os valores associados à reprodutibilidade intralaboratorial do Laboratório foram determinados com dez ensaios independentes do MRC e na **Tabela 26** encontram-se os valores da média e do desvio padrão associado.

Tabela 26 – Média e desvio padrão obtidos na determinação da turvação de dez ensaios independentes de um MRC com um valor de referência de $2,30 \pm 0,03$ NTU.

\bar{C}	S_{rw}	$u_{Rw,rel}$
2,110	0,088	0,042

Por fim, determinou-se o valor de $u_{Rw,rel}$, que apresentou o valor de 0,042, ou seja, 4,2 %. A partir das incertezas relativas, foi obtida a incerteza combinada relativa segundo a aplicação da **Equação 31** tendo-se obtido o valor de 9,4 %. A incerteza expandida, determinada pelo produto da incerteza combinada pelo fator de expansão, $k = 2$, representa o valor final da incerteza do método de turvação, e é de 18,8 %.

Quando não existem valores indicados na legislação para a exatidão, estabelecem-se critérios de aceitação. Neste caso considerou-se 10 % para critério de aceitação para a exatidão e também para a precisão. O cálculo do u_b , 8,4 %, revelou estar abaixo do valor máximo definido, assim como o valor da estimativa da incerteza associada à precisão, 4,2 %, portanto a abordagem mostrou ser adequada para a estimativa da incerteza.

3.1.2 Controlo de qualidade associado à determinação da turvação

Depois de terminar o processo de validação do método, procedeu-se à avaliação do controlo de qualidade intralaboratorial de amostras em águas naturais para a determinação da turvação durante a rotina do Laboratório.

Durante o projeto individual este parâmetro foi analisado em cerca de 300 amostras de águas naturais, recolhidas em dias diferentes e em pontos geográficos distintos. Nestas amostras os valores obtidos de turvação variaram entre 0,3042 NTU e 7,242 NTU. Pode-se verificar que todos os valores se encontravam acima do limite de quantificação (0,24 NTU) determinado a partir da **Equação 20**.

3.1.2.1 Controlo de qualidade interno

Por cada série de vinte amostras recebidas para análise da turvação foi efetuado um duplicado e um padrão de controlo por cada série de dez (**Tabela 27**). Pelo facto de este método ser novo e de não existir um histórico de resultados, os duplicados foram avaliados por meio de uma carta de aceitação de 10 % apresentada na **Figura 18** de forma a assegurar o controlo de qualidade interno e a precisão dos resultados.

Tabela 27 – Valores de turvação obtidos em vinte duplicados de forma a avaliar o controlo de qualidade interno para um limite de aceitação de 10 %.

Ensaio	Data do ensaio	Duplicados (NTU)		Amplitude relativa dos duplicados (%)
1	12/04/17	6,916	6,888	0,4057
2	20/04/17	4,238	4,195	1,020
3	21/04/17	2,708	2,820	4,052
4	27/04/17	1,097	1,123	2,342
5	27/04/17	1,298	1,370	5,397
6	02/05/17	3,945	3,946	0,0254
7	02/05/17	0,5456	0,5525	1,257
8	02/05/17	0,4948	0,5280	6,492
9	02/05/17	1,295	1,330	2,667
10	4/05/2017	0,5713	0,6223	8,546
11	8/05/2017	2,078	2,029	2,386
12	8/05/2017	2,572	2,483	3,521
13	9/05/2017	2,017	2,132	5,544
14	15/05/2017	1,242	1,205	3,024
15	15/05/2017	1,338	1,356	1,336
16	16/05/2017	2,381	2,277	4,465
17	17/05/2017	1,851	1,833	0,9772
18	22/05/2017	3,770	3,953	4,739
19	23/05/2017	0,4989	0,5160	3,350
20	30/05/2017	1,881	1,850	1,661

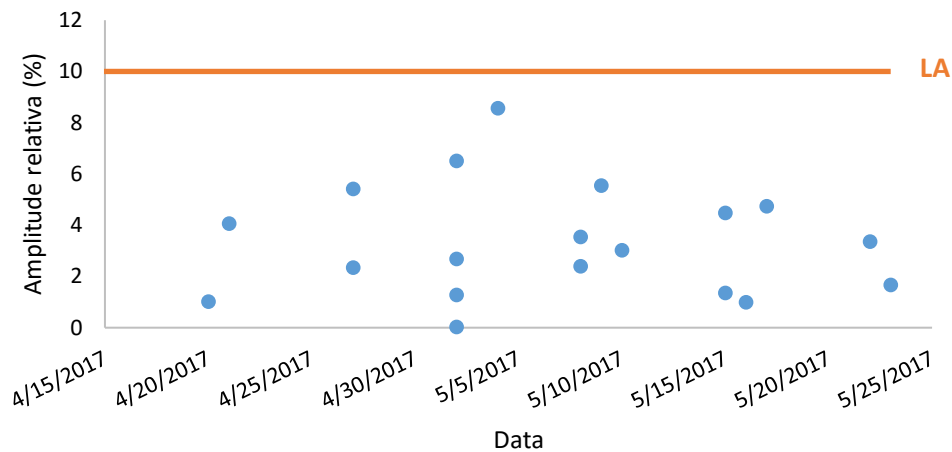


Figura 18 – Carta de aceitação de duplicados na determinação da turvação. LA = Limite de aceitação 10 %.

Como se verifica na **Figura 18**, as amplitudes dos duplicados encontram-se todas abaixo da linha limite de aceitação considerado de 10 %, indicando que o processo se encontra sob controlo e que os resultados são precisos face a este nível de aceitação.

3.1.2.2 Cartas de controlo como ferramenta de validação e controlo de qualidade

Após o método ter sido validado e aprovado, utilizou-se a metodologia aplicada ao controlo da qualidade do método. Com o propósito de monitorizar o padrão 10,0 NTU StabCal (padrão de controlo fornecido pelo fabricante), recolheram-se vinte dados do padrão de 10,0 NTU em duplicado a partir da entrada do método no Laboratório de forma a obter valores para construção da carta de controlo de médias, de acordo com as **Equações 35 e 36, Tabela 28**.

Tabela 28 – Valores de turvação obtidos do padrão de 10,0 NTU para o cálculo dos limites da carta de controlo de médias.

Ensaio	Data	10,0 NTU
1	11/04/2017	10,98
2	12/04/2017	10,65
3	12/04/2017	10,72
4	19/04/2017	10,17
5	19/04/2017	10,08
6	20/04/2017	10,31
7	20/04/2017	10,02
8	20/04/2017	10,25
9	21/04/2017	10,33
10	21/04/2017	10,17
11	24/04/2017	10,21
12	24/04/2017	10,17
13	27/04/2017	10,07
14	27/04/2017	10,97
15	27/04/2017	10,95
16	02/05/2017	10,85
17	02/05/2017	10,80
18	02/05/2017	10,33
19	04/05/2017	10,54
20	04/05/2017	10,69

Os valores do desvio padrão e dos limites de controlo e de aviso obtidos para padrão controlo 10,0 NTU (StabCal) estão apresentados na **Tabela 28**.

Tabela 28 – Dados obtidos da análise de vinte padrões de 10,0 NTU StabCal para a determinação das linhas de aviso e de controlo e construção da carta de controlo.

10,0 NTU	s (NTU)	n	LCI (NTU)	LAI (NTU)	LAS (NTU)	LCS (NTU)
10,46	0,33	20	9,00	9,33	10,67	10,99

De acordo com as indicações do fornecedor do equipamento, a reta de calibração deve ser repetida cada três meses. Numa fase inicial, realizou-se uma curva

de calibração em cada dia de análise, para a obtenção dos valores necessários para avaliar os parâmetros de validação. Assim, que se reuniu todos os resultados, a reta de calibração passou a ser realizada com a frequência indicada pelo fornecedor.

Contudo, importa referir que os padrões da curva de calibração foram preparados por uma solução mãe preparada no Laboratório, conforme indicado no capítulo 2, enquanto o padrão de controlo StabCal foi fornecido com o equipamento, e, portanto, representa um padrão independente.

Assim, como controlo interno da determinação da turvação, foi analisado um duplicado por cada série de vinte amostras, e um padrão de controlo StabCal 10,0 NTU por cada série de dez amostras. O gráfico da **Figura 19** apresenta a carta de controlo de indivíduos obtida com o padrão controlo StabCal.

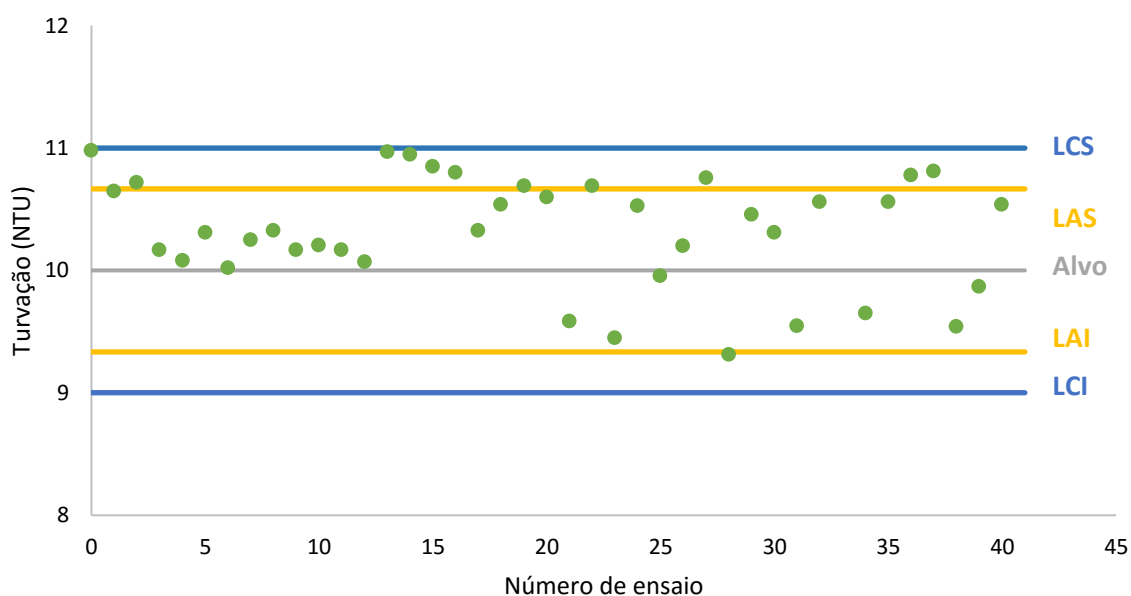


Figura 19 - Carta de controlo de indivíduos obtida com o padrão de controlo 10,0 NTU StabCal para garantir a veracidade da curva de calibração. LCS = limite de controlo superior; LAS = limite de aviso superior; LAI = limite de aviso inferior; LCI = limite de controlo inferior.

Ao analisar a **Figura 19** verifica-se que os primeiros 21 valores do padrão de controlo encontram-se sempre acima do valor alvo (10,0 NTU) constituindo uma situação fora de controlo. Uma explicação para este facto pode residir na preparação dos padrões da reta de calibração com concentrações ligeiramente menores (por exemplo, devido à uma ineficiente homogeneização). A medição do padrão de controlo, que é de outro lote de reagente, apresentaria então um ligeiro desvio positivo. Foi então

preparada uma nova calibração do equipamento, com novos padrões de calibração, e o padrão 10,0 NTU foi monitorizado. A partir desta nova calibração, os valores de turvação do padrão já se encontram distribuídos em torno do valor alvo, indicando que o processo se encontra sob controle.

Segundo as especificações do fabricante, assume-se como critério de aceitação o valor de 10 % para o padrão de 10,0 NTU. Como os valores encontrados durante a série de determinações não ultrapassa o intervalo de 9 - 11% pode-se afirmar que o método se encontra sob controle ⁸⁷. Assim também se pode inferir que o critério de aceitação inicialmente determinado de 10 % é verificado.

3.2.1 Determinação da clorofila a

A determinação da clorofila a é considerado um ensaio microbiológico dentro do Laboratório. Como este método não se encontra acreditado e não existem valores legais ou decreto-lei que regem este parâmetro, foi seguida a norma portuguesa NP 4327:1996 para realizar a determinação. Na norma apenas é indicado a utilização de uma solução de referência para realizar o doseamento da clorofila a (padrão de 200 $\mu\text{g/L}$) e o branco, não sendo portanto traçado uma reta de calibração ⁹¹.

Durante o período de estágio, este ensaio foi estudado e foram caracterizados os parâmetros de uma forma estatística significativa. Assim, para todos os parâmetros realizou-se uma análise de dez padrões independentes, à exceção da curva de calibração em que cada solução padrão foi analisada com três réplicas independentes. Em todos os ensaios, foi realizado o teste de *Grubbs* para avaliar a necessidade de rejeição de valores discrepantes.

Como controlo de rotina foi decidido analisar os padrões de 20,0 $\mu\text{g/L}$, de 200 $\mu\text{g/L}$ e um duplicado de cada amostra, apesar de na norma NP 4327 não haver indicações acerca do controlo de qualidade dos resultados.

3.2.1.1 Curva de calibração

A curva de calibração foi traçada considerando seis padrões de clorofila a com os respetivos valores de clorofila a obtidos experimentalmente, isto é, após a conversão das quatro absorvâncias lidas (665_o , 760_o , 665_a e 760_o) em concentração pela equação de *Lorenzen*.

Os valores de absorvância obtidos para os padrões, em triplicado, encontram-se registados na **Tabela 30**. Também na referida tabela se apresentam os valores de concentração de clorofila avaliada experimentalmente (C_{ce} ($\mu\text{g/L}$)), através da aplicação da equação de *Lorenzen*. A escolha das concentrações utilizadas para a realização da reta de calibração teve em conta o tipo de amostras analisadas em rotina, o padrão de solução de trabalho e de solução mãe, bem como com as particularidades que o método envolve (obtenção do valor de concentração de clorofila a utiliza quatro valores de absorvância, 665 e 750 nm antes e após a acidificação).

Tabela 30 – Valores de absorvância a 665 e 750 nm obtidos para as soluções padrão de clorofila *a* numa gama até 200,0 µg/L para o traçado da reta de calibração. A_0 refere-se às absorvâncias antes da adição, A_a refere-se às absorvâncias após a adição de ácido clorídrico.

Padrão de clorofila <i>a</i> (µg/L)	l (cm)	Absorvâncias				Cce (µg/L)
		665 ₀	750 ₀	665 _a	750 _a	
0	4	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	0,067
0	4	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	0,067
0	4	-0,001	-0,002	-0,001	-0,001	0,067
20,00	4	0,005	-0,002	0,004	-0,001	13,365
20,00	4	0,008	0,000	0,008	0,004	21,384
20,00	4	0,009	0,001	0,004	0,000	21,384
30,00	4	0,019	-0,001	0,016	0,000	33,413
30,00	4	0,018	-0,001	0,014	-0,001	26,730
30,00	4	0,020	-0,001	0,016	0,000	33,413
50,00	4	0,011	-0,003	0,004	-0,002	53,460
50,00	4	0,009	-0,002	0,002	-0,002	46,778
50,00	4	0,011	-0,004	0,004	-0,003	53,460
100,0	5	-0,036	-0,078	-0,052	-0,076	96,228
100,0	5	-0,036	-0,078	-0,052	-0,076	96,228
100,0	5	-0,039	-0,077	-0,058	-0,076	106,920
200,0	4	0,081	0,008	0,047	0,004	200,475
200,0	4	0,077	0,003	0,046	0,001	193,793
200,0	4	0,078	0,001	0,049	0,002	207,158

A média dos valores de Cce (µg/L) da **Tabela 30** foi determinada e encontra-se apresentada na **Tabela 31**, com respetivos desvios padrões.

Tabela 31 – Valores de concentração de clorofila *a* (µg/L) obtidos com as soluções padrão de clorofila *a* numa gama até 200,0 µg/L para o traçado da reta de calibração.

Padrão de clorofila <i>a</i> (µg/L)	Concentração de clorofila <i>a</i> (µg/L)	Desvio padrão (µg/L)
0	0,067	0
20,00	18,7	4,6
30,00	31,2	3,9
50,00	51,2	3,9
100,0	99,8	6,2
200,0	200,5	6,7

A existência de *outliers* foi testada através da aplicação da condição $|y_i - \hat{y}_i| > 2s_{y/x}$ e como nenhuma diferença entre o valor experimental e o valor interpolado na reta em módulo foi superior a duas vezes o valor dos resíduos, nenhum valor foi rejeitado.

Traçou-se a reta de calibração da concentração de clorofila *a* medida experimentalmente em função da concentração dos padrões de clorofila *a* preparados, **Figura 20**. Para cada padrão foram analisadas três réplicas independentes, e no gráfico estão representados os valores médios e a respectiva barra de erro dada pelo desvio padrão. O coeficiente de correlação de 0,9999 é superior ao valor recomendado pela norma 8466 (0,999) ⁶⁶. Os valores das incertezas associadas à reta de calibração foram determinados e estão apresentados na **Tabela 32** sob a forma de $C_{ce} (\mu\text{g/L}) = (a \pm t_{s_a}) C_{cp} (\mu\text{g/L}) + (b \pm t_{s_b})$ para uma probabilidade de 95 %, correspondendo C_{cp} à concentração dos padrões preparados.

Tabela 32 – Intervalo de confiança do declive e da ordenada na origem associados à reta de calibração para a determinação da clorofila *a* por espectrofotometria de absorção molecular, bem como valores do coeficiente de correlação, desvio padrão do método e coeficiente de variação.

$a \pm t_{s_a}$	$b \pm t_{s_b}$ ($\mu\text{g/L}$)	$S_{y/x}$ ($\mu\text{g/L}$)	r	S_m ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
$1,0018 \pm 0,0001$	$0,1 \pm 1,7$	1,05	0,9999	1,05	1,58

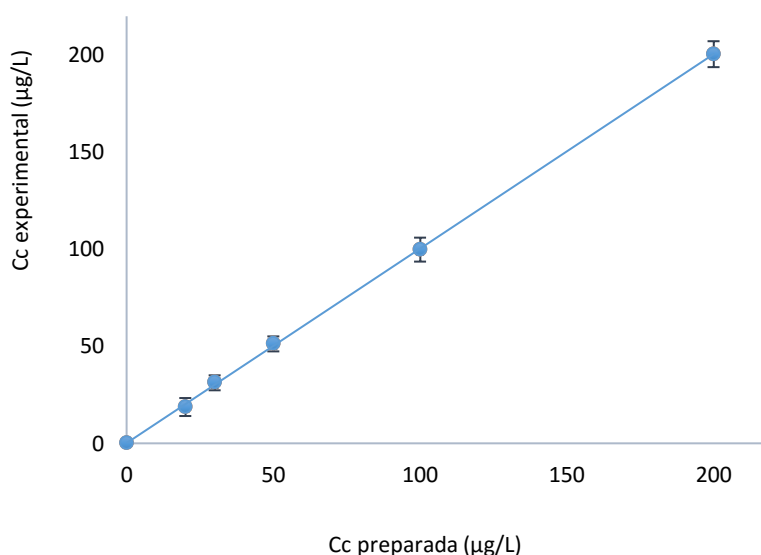


Figura 20 – Representação gráfica dos valores de concentração de clorofila *a* determinada experimentalmente, em função da concentração dos padrões de clorofila *a* preparados.

A reta de calibração apresentada na **Figura 20**, tem como equação $C_{ce} (\mu\text{g/L}) = (1,0018 \pm 0,0001) C_{cp} (\mu\text{g/L}) - (0,13 \pm 1,70)$ e um coeficiente de correlação de 0,9999. Para considerar a calibração aceitável, o declive deverá ser unitário (1,00) e a ordenada na origem nula ⁶⁵. Os valores de declive de $(1,00 \pm 0,00)$ e de ordenada na origem de $(0 \pm 0,60)$, demonstram que a calibração é adequada. As características do método, desvio padrão e coeficiente de variação, foram também determinadas e encontram-se apresentadas na **Tabela 32**. O coeficiente de variação do método é aceitável quando se encontra abaixo de 10 %. Neste caso, obteve-se um valor de 1,6 %, indicando uma boa qualidade dos resultados.

Considera-se que a reta de calibração tem um coeficiente de correlação elevado ($r = 0,9999$), já que o valor é muito próximo de 1, e, portanto, o ajuste é considerado elevado para aceitar uma função linear, não sendo necessário realizar o teste *Mandel* para averiguar a linearidade.

3.2.1.2 Seletividade

Como já referido, a seletividade é a capacidade de um método identificar um analito em particular numa matriz muito complexa sem interferência de outros componentes ¹⁵.

Uma forma de avaliar a seletividade consiste no estudo do efeito de interferentes ⁹². Segundo a *EPA Method 446.0* ⁹³, não é possível obter água natural e/ou espécies interferentes puras na determinação da clorofila *a* ⁹². Dado que também não foi possível adquirir de outro laboratório padrões para este parâmetro, a seletividade analisada recorrendo ao estudo com interferentes tornou-se inviável.

Uma estratégia alternativa consiste em utilizar ensaios de recuperação, no entanto, não foi possível encontrar na bibliografia, nem informação em outros laboratórios nacionais que analisam a presença de clorofila *a*, os procedimentos para ensaios de recuperação. Assim, o desenho experimental para avaliar este parâmetro ainda se encontra em desenvolvimento e por este motivo, a seletividade deste método não foi determinada.

3.2.1.3 Gama de trabalho

A escolha dos padrões foi realizada de acordo com o tipo de amostras que o Laboratório analisa em rotina considerando a resolução do espectrofotómetro. Deste modo, o padrão mais baixo de clorofila *a* escolhido foi de 20,0 µg/L, e o padrão mais elevado de 200,0 µg/L. Os resultados obtidos no estudo da gama de trabalho encontram-se expressos na **Tabela 33**, em que foram analisadas dez soluções independentes dos padrões de 20,0 e 200,0 µg/L.

Tabela 33 – Valores obtidos no estudo da gama de trabalho em condições de repetibilidade de 10 leituras independentes dos padrões 20,0 e 200,0 µg/L.

Réplicas Padrão	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7	y8	y9	y10
0										
20,0	21,38	21,28	26,73	21,38	26,73	37,42	32,08	26,73	26,74	5,35
30,0										
50,0										
100,0										
200,0	233,89	193,79	220,52	193,79	207,16	200,48	233,89	213,84	227,21	233,89

Foi aplicado o teste de *Grubbs* para verificar se existiam valores discrepantes e nenhum valor foi rejeitado para um nível de confiança de 95%.

A partir dos resultados obtidos realizou-se o teste de *Fisher-Snedecor* de modo a averiguar a homogeneidade de variâncias, com base na norma ISO 8466⁶⁶, **Tabela 34**.

Tabela 34 – Valores obtidos na aplicação do teste de homogeneidade de variâncias para o estudo da gama de trabalho para o método da determinação da clorofila *a*.

Concentração (µg/L)	Média (µg/L)	s ² (µg/L) ²	PG	F
20,0	24,58	71,21	3,780	4,026
200,0	215,85	268,43		

De acordo com a análise da **Tabela 34**, o valor de PG calculado (3,780) é inferior ao valor de F_{tabelado} da distribuição de *Fisher-Snedecor* (4,026) pelo que se pode concluir com 95 % de probabilidade que não existe diferença estatisticamente significativa entre

as variâncias dos padrões mais diluído e mais concentrado, 20,0 e 200,0 µg/L, respetivamente.

Assim, concluiu-se que a gama de trabalho se encontra bem ajustada ao objetivo.

3.2.1.4 Precisão

Durante este trabalho foi possível avaliar a precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia. A avaliação da precisão em condição de reprodutibilidade requer ensaios interlaboratoriais e como o método ainda se encontra em processo de validação, a participação em EIL ainda não ocorreu e, portanto, não foi possível avaliar a reprodutibilidade.

Repetibilidade

A precisão em condições de repetibilidade foi avaliada pela análise de 10 amostras independentes dos padrões de 20,0 e 200,0 µg/L num mesmo dia. Os resultados obtidos nos ensaios para avaliar a repetibilidade do método relativos aos padrões de 20,0 e 200,00 µg/L encontram-se apresentados na **Tabela 35**.

Tabela 35 – Resultados da avaliação da precisão do método de determinação de clorofila *a* em condições de repetibilidade.

Clorofila <i>a</i> (µg/L)	Padrão de 20,0 (µg/L)	Padrão de 200,0 (µg/L)
Y ₁	16,036	213,840
Y ₂	21,384	193,784
Y ₃	21,384	207,160
Y ₄	16,038	193,785
Y ₅	21,384	213,840
Y ₆	20,048	213,840
Y ₇	21,384	207,156
Y ₈	21,384	207,165
Y ₉	20,148	213,840
Y ₁₀	21,384	207,160
Médias (NTU)	20,1	207,2
r (µg/L)	2,2	7,7
CV (%)	6,1	22
CV (%)	11	3,9
ER (%)	0,29	3,6

Ao analisar-se os resultados obtidos para a precisão em condições de repetibilidade da concentração de 200,0 µg/L, verifica-se que a repetibilidade intra-dia

é satisfatória, visto que o coeficiente de variação relativo, CV, é inferior a 10 %, limite recomendado pela norma EPA *Method* 446.0⁹⁴.

Relativamente à repetibilidade do padrão mais diluído, o valor de CV, 11 %, não é significativamente diferente do recomendado (10 %). Assim, pode-se considerar que para estes níveis de concentração a repetibilidade intra-dia é satisfatória visto que a concentração de 20,0 µg/L é um valor muito abaixo do padrão recomendado pela NP 4327:1996 (200 µg/L). Além disso a solução mãe tem uma concentração de 20 mg/L e, portanto, é de esperar que o padrão de 20,0 µg/L apresente um erro relativo mais elevado.

O limite de repetibilidade, r , foi avaliado, para uma probabilidade de 95 %, de acordo com a **Equação 24**. Os valores de limite de repetibilidade obtidos foram 6,1 e 21,6 µg/L para o padrão mais diluído e concentrado, respetivamente, ou seja, significa que num curto espaço de tempo a diferença entre dois duplicados relativos aos padrões de 20,0 e 200,0 µg/L deverá ser inferior a 6,1 e 21,6 µg/L. Estes limites de repetibilidade são amplos, contudo não são de estranhar uma vez que a existe uma dispersão apreciável dos resultados.

Precisão intermédia

A precisão intermédia foi avaliada considerando dez amostras independentes para um nível de concentração analisados em quatro dias diferentes, ISO 5667-3⁴⁰. A **Tabela 36** apresenta os valores dos resultados obtidos para a avaliação da precisão intermédia, nomeadamente o desvio padrão, limite de repetibilidade, coeficiente de variação e erro relativo.

Tabela 36 – Valores obtidos dos padrões de controlo de 200,0 µg/L utilizados para avaliar a precisão em termos de condições intermédias.

Padrão de 200,0 (µg/L)	30/05/2017	31/05/2017	5/06/2017	7/06/2017
Y ₁	233,89	213,84	187,11	200,47
Y ₂	193,79	193,79	193,79	193,79
Y ₃	220,52	207,16	193,79	207,16
Y ₄	193,79	193,79	193,79	193,79
Y ₅	207,16	213,84	187,11	213,84
Y ₆	200,48	213,84	213,84	200,48
Y ₇	233,89	207,16	207,16	207,16
Y ₈	213,84	207,16	200,48	207,16
Y ₉	227,21	213,84	187,11	213,84
Y ₁₀	233,89	207,16	213,84	207,19
Média (µg/L)	215,85	207,16	197,8	204,48
s (µg/L)	16,4	7,72	10,0	7,18
r (µg/L)	45,9	21,6	28,0	20,1
CV (%)	8,2	3,9	5,0	3,6
ER (%)	7,9	3,6	4,4	9,0

A precisão intermédia foi determinada recorrendo à ANOVA ³³, em que as réplicas dentro de cada grupo foram obtidas em condições de repetibilidade e as condições analíticas foram variadas entre os grupos, ou seja, os valores foram obtidos em dias diferentes. A partir das expressões referentes ao desvio padrão da repetibilidade, s_r , (**Equação 26**) e do desvio padrão do fator entre grupos, $S_{between}$, (**Equação 27**) foi determinado o valor do desvio padrão da precisão intermédia, s_i , (**Equação 28**). Os valores obtidos encontram-se compilados na **Tabela 37**.

Tabela 37 – Valores obtidos a partir da ANOVA para a determinação da precisão intermédia em que s_r corresponde ao desvio padrão da repetibilidade e s_i corresponde à precisão intermédia.

MS_w	s_r	MS_b	$S_{between}$	s_i	r	CV (%)	ER (%)
122,69	11,08	557,9	0,52	11,09	22,2	5,5	3,2

A estimativa do valor de precisão intermédia obtida a partir da ANOVA é de 11,1 µg/L, apresentando uma variação relativa é baixa (5,5 %).

Também foi possível avaliar a precisão em condições de repetibilidade (11,1 µg/L), que se situa entre os valores obtidos anteriormente determinados de

repetibilidade, com os padrões de 20,0 e 200,0 µg/L, **Tabela 36**. De notar que os valores de precisão obtidos em condições de repetibilidade e em condições de precisão intermédias são idênticos demonstrando que existe uma grande dispersão dentro do próprio dia, no padrão de 200,0 µg/L.

Por sua vez, o valor de limite de precisão intermédia obtido foi 22,2 µg/L, o que significa que a diferença entre dois valores obtidos, para o padrão de 200,0 µg/L, deverá ser inferior a 22,2 µg/L independentemente do tempo que decorre entre leituras.

Pode-se portanto concluir que o método é preciso, em condições de precisão intermédia, uma vez que o CV revelou ser inferior a 10 % para o padrão de 200,0 µg/L como refere a norma EPA *Method 446.0*⁹³.

3.2.1.5 Limiares analíticos

Para a avaliação dos limiares analíticos, recorreu-se à análise de dez brancos independentes (acetona 90 %) em condições de repetibilidade e os valores obtidos encontram-se na **Tabela 39**.

Tabela 39 – Valores obtidos de concentração de clorofila *a* para dez brancos de modo a determinar os limiares analíticos.

Acetona 90% (V/V)	Concentração de clorofila <i>a</i> (µg/L)
Y ₁	0,067
Y ₂	0,067
Y ₃	0,000
Y ₄	0,000
Y ₅	0,067
Y ₆	0,067
Y ₇	0,067
Y ₈	0,000
Y ₉	0,067
Y ₁₀	0,000
Média (µg/L)	0,040
s (µg/L)	0,035
s' (µg/L)	0,011
LDD (µg/L)	0,076
LDQ (µg/L)	0,14

A partir da análise dos dez ensaios independentes dos brancos calcularam-se os limiares analíticos segundo as **Equações 17** e **20**, respetivamente. Assim, pode-se

verificar que o método consegue detetar a partir de 0,076 µg/L de clorofila *a*, mas apenas para valores superiores a 0,14 µg/L é capaz de quantificar.

O valor de LDD obtido está de acordo com o referido na norma NP 4327 de 0,1 µg/L ⁹¹.

Pelo facto da solução mãe apresentar uma concentração de clorofila *a* de 20,0 mg/L e da solução de trabalho apresentar uma concentração de 200,0 µg/L, resolveu-se optar como o padrão mais baixo de 20,0 µg/L para a validação do método.

Este método tem a particularidade de envolver medições em mais que um comprimento de onda e existir uma expressão de conversão para a concentração **(Equação 1)**, e portanto encontra-se sujeito a vários erros devido aos valores de absorvância medidos serem muito baixos. Para além disso e como já foi referido este método não envolve o traçado da reta de calibração e o padrão de referência indicado é de 200,0 µg/L.

3.2.1.6 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que pode ser avaliado de formas distintas como já referido no capítulo 1, quer pela realização de ensaios de recuperação, quer pela participação de ensaios interlaboratoriais ou ainda recorrendo a materiais de referência certificados.

No entanto, para este parâmetro, não existem procedimentos para os ensaios de recuperação (como explicado no estudo da seletividade), nem materiais de referência certificados.

Quanto à participação em ensaios interlaboratoriais, o Laboratório ainda não inclui este parâmetro no planeamento anual de atividades. Sendo assim, uma possível alternativa para avaliar a exatidão do método da determinação de clorofila *a* consiste na participação em ensaios bilaterais ⁹⁵. Nestes ensaios, considera-se cinco amostras analisadas segundo o mesmo procedimento, em parceria com um laboratório que apresenta o método acreditado.

Devido a limitações de tempo, estes testes ainda não foram realizados, mas brevemente os ensaios serão realizados e os resultados analisados.

3.2.1.8 Estimativa da incerteza de medição

Tal como a seletividade e a exatidão, a estimativa de incerteza de medição associado ao método ainda não foi determinada por não existirem dados de ensaios de recuperação ou de testes bilaterais. Contudo, assim que possível, esta será determinada recorrendo à metodologia que o Laboratório utiliza como rotina, que é baseada na norma ISO 11352 ⁷⁷.

3.2.2 Controlo de qualidade associado à determinação da clorofila α

Procedeu-se à avaliação do controlo de qualidade intralaboratorial durante a rotina do Laboratório de amostras em águas naturais para a determinação da clorofila α .

Durante o projeto individual foram analisadas cerca de 180 amostras de águas naturais, recolhidas para este parâmetro em dias diferentes e em pontos geográficos distintos variando desde o limite de quantificação (0,14 $\mu\text{g/L}$) a cerca de 100,0 $\mu\text{g/L}$.

3.2.2.1 Controlo de qualidade interno

Como controlo de qualidade interno, foi efetuado um duplicado por cada amostra recebida para a determinação de clorofila α (**Tabela 38**), um padrão de controlo 200,0 $\mu\text{g/L}$ e um branco por cada série de dez amostras.

Este método não se encontra ainda acreditado, mas apresenta um histórico de resultados sem ter sido definido um critério de aceitação de duplicados. Assim, foi estabelecido um limite de 20 %, de forma a verificar o controlo das leituras dos duplicados (**Figura 21**) para avaliar a precisão de resultados e o controlo interno.

Tabela 38 – Valores de clorofila *a* obtidos em vinte duplicados ao longo do tempo de forma a avaliar o controlo de qualidade interno.

Ensaio	Data do ensaio	Duplicados ($\mu\text{g/L}$)		Amplitude relativa dos duplicados (%)
1	11/07/16	1,470	1,609	9,03
2	11/07/16	0,200	0,200	0,00
3	11/07/16	1,337	1,247	6,97
4	11/07/16	3,119	3,564	13,32
5	18/07/16	2,495	2,673	6,89
6	18/07/16	0,535	0,535	0,00
7	18/07/16	2,072	2,072	0,00
8	25/07/16	1,247	1,158	7,40
9	26/07/16	2,183	1,960	10,77
10	27/07/16	2,673	2,851	6,44
11	10/08/16	25,661	27,532	7,03
12	10/08/16	1,871	1,693	9,99
13	27/09/16	2,339	2,339	0,00
14	27/09/16	0,668	0,668	0,00
15	27/09/16	7,083	7,351	3,71
16	10/10/16	1,403	1,537	9,12
17	17/10/16	9,430	9,540	1,16
18	28/11/16	1,136	1,203	5,73
19	06/12/16	5,146	5,613	8,68
20	20/02/17	1,737	1,737	0,00

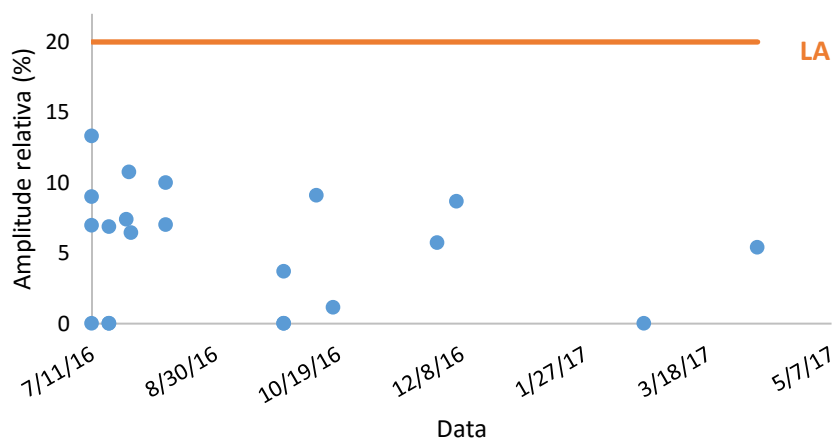


Figura 21 – Carta de aceitação de duplicados na determinação da clorofila *a*. LA = Limite de aceitação, 20 %.

Como se verifica na **Figura 21**, os valores das amplitudes dos duplicados encontram-se todos abaixo da linha limite de aceitação considerado de 20 %, indicando que o processo se encontra sob controlo e que os resultados são precisos face a este nível de aceitação.

3.2.2.2 Cartas de controlo como ferramenta de validação e controlo de qualidade

De modo a validar o método, recorreu-se a metodologia aplicada ao controlo da qualidade do método. Com o propósito de monitorizar o controlo do padrão de 20,0 µg/L, recolheram-se dados de vinte leituras do referido padrão de forma a obter valores para construção da carta de controlo de médias, de acordo com as **Equações 35 e 36**, **Tabela 39**.

Tabela 39 – Valores do padrão de 20,0 µg/L de clorofila *a* obtidos ao longo do tempo para o cálculo dos limites da carta de controlo.

Ensaio	Data do ensaio	20,0 µg/L
1	20/04/16	16,05
2	29/04/16	21,38
3	03/05/16	21,38
4	03/05/16	16,04
5	03/05/16	21,39
6	29/06/16	20,05
7	01/08/16	21,35
8	13/10/16	21,35
9	13/10/16	20,05
10	20/10/16	21,39
11	10/11/16	21,39
12	10/11/16	21,39
13	10/11/16	26,73
14	27/12/16	21,38
15	27/12/16	26,73
16	13/01/17	13,37
17	13/01/17	20,05
18	13/01/17	20,05
19	13/01/17	26,73
20	20/02/17	21,39

Os valores do desvio padrão e dos limites de controlo e de aviso obtidos para o controlo do padrão de 20,0 µg/L estão apresentados na **Tabela 40**.

Tabela 40 – Dados obtidos da análise de vinte amostras em duplicado para a determinação das linhas de aviso e de controlo da carta de controlo do padrão de 20,0 µg/L.

Padrão de 20,0 µg/L	s (µg/L)	n	LCI (µg/L)	LAI (µg/L)	LAS (µg/L)	LCS (µg/L)
20,98	3,25	20	17,82	18,55	21,45	22,18

O gráfico da **Figura 22** apresenta a carta de controlo de médias obtidas para um padrão de 20,0 µg/L.

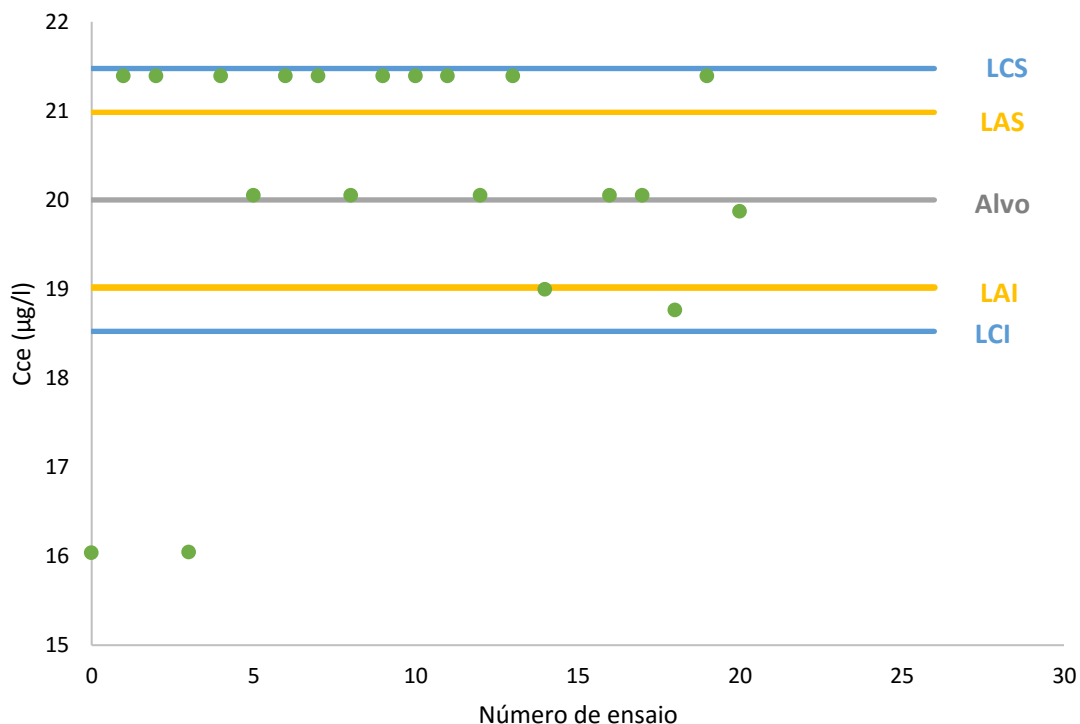


Figura 22 - Carta de controlo de médias obtida para o controlo do padrão de 20,0 µg/L, para garantir a veracidade da curva de calibração. LCS = limite de controlo superior; LAS = limite de aviso superior; LAI = limite de aviso inferior; LCI = limite de controlo inferior.

Ao analisar a **Figura 22** verifica-se que dois dos primeiros quatro valores se encontram abaixo do limite de ação inferior. Após a quarta medição, preparou-se um novo padrão de 20,0 µg/L e os dados recolhidos, ao longo do tempo com este novo padrão, encontram-se dentro das linhas de limite indicando que o método se encontra sob controlo.

Assumiou-se como critério de aceitação o valor de 20 % para os duplicados. Como os valores encontrados durante a série de determinações não ultrapassaram o intervalo de 13 - 15% pode-se afirmar que o método se encontra sob controlo. Assim também se pode inferir que o critério de aceitação inicialmente determinado de 20 % é verificado, podendo se considerar baixar este critério para 15 %, futuramente.

3.3. Outras atividades desenvolvidas no Laboratório

Para além da validação dos dois métodos apresentados foi também possível desenvolver outras atividades durante o Projeto Individual.

Numa fase inicial, obtive formação em todos os métodos físico-químicos, na receção de amostras, preparação de material, soluções e reagentes e preservação das mesmas. Assim, a receção de amostras, a verificação da chegada das mesmas ao Laboratório bem como a organização dos frascos pelos ensaios foi uma valência adquirida.

Ao longo desse ano, em que foram analisadas uma média de 45 amostras por mês, exceto análises extras ao plano, tive a oportunidade de realizar muito métodos físico-químicos, tendo-me sido atribuída a responsabilidade dos ensaios e do controlo de qualidade dos parâmetros:

- pH;
- CQO;
- condutividade;
- CBO₅;
- Turvação.

Além destes ensaios físico-químicos, ainda-me foi atribuída a responsabilidade de realizar a fixação do teor de oxigénio, de acidificar/alcalinizar amostras para enviar ao LRA, e de preparar o material para os ensaios da dureza, cloreto e alcalinidade.

Com a participação em EIL, foi ainda possível avaliar o meu desempenho participando em matrizes de águas naturais e de águas residuais. Anualmente, o Laboratório estabelece no plano anual de atividades a participação em ensaios interlaboratoriais de forma a avaliar o seu desempenho. O principal intuito é avaliar o desempenho dos técnicos, dos métodos aplicados e ainda a exatidão dos resultados. Assim, os técnicos responsáveis por cada método realizam o ensaio e permitem que alguns técnicos não responsáveis realizem também o teste.

Na matriz de águas naturais, realizei os EIL dos parâmetros de pH, condutividade, SST, CBO₅ e CQO, enquanto nas águas residuais participei nos EIL dos parâmetros pH, condutividade, SST e CQO. Os valores de *Z-score* de todos os parâmetros analisados referentes às águas naturais do dia 18/12/2016 estão apresentados na

Tabela 41, enquanto os de águas residuais do dia 18/11/2016 na **Tabela 42** e revelam um desempenho satisfatório.

Tabela 41 – Valores de *Z-score* obtidos nos EIL promovidos pela *Aquacheck* para os diversos parâmetros analisados em rotina no Laboratório em matrizes de águas naturais.

Parâmetro	Expressão do resultado	X _{ref}	X _{lab}	Z-score
Dureza	mg Ca/L	52,0	53,2	0,23
Alcalinidade	mg HCO ₃ /L	93,9	96,6	0,29
Cloretos	mg Cl/L	12,82	13,06	0,24
Nitritos	mg NO ₂ /L	0,281	0,281	0,00
Amónia	mg NH ₄ /L	0,188	0,229	1,92
Fosfatos	mg P/L	962	924	-0,53
pH	Escala de pH	4,90	4,75	-1,50
Condutividade	µS/cm (20 °C)	600	598	0,00
Cor	Hazen	14,61	14,84	-0,07
Permanganato	mg O ₂ /L	5,78	5,75	-0,05
Nitrato	mg NO ₃ /L	19,61	19,64	0,02
CBO₅	mg O ₂ /L	3,14	2,80	-1,08
CQO	mg O ₂ /L	181,5	192,0	0,76
SST	mg/L	181,6	181,0	-0,04

Nota: os ensaios assinalados em negrito foram realizados pela autora do Projeto Individual

Tabela 42 – Valores de obtidos nos EIL promovidos pela *Aquacheck* para os diversos parâmetros analisados em rotina pelo Laboratório em matrizes de águas residuais.

Parâmetro	Expressão do resultado	X_{ref}	X_{lab}	<i>Z-score</i>
pH	Escala de pH	5,82	5,84	0,20
Condutividade	$\mu\text{S/cm}$ (20 °C)	22,40	21,83	-0,34
CBO ₅	mg O ₂ /L	117,0	105,0	-1,03
CQO	mg O ₂ /L	175,4	172,0	-0,26
SST	mg/L	18,8	18,6	-0,11

Nota: os ensaios assinalados em negrito foram realizados pela autora do Projeto Individual

Os valores de *Z-score* em módulo encontram-se todos abaixo de 2 demonstrando que o Laboratório apresenta um desempenho adequado e que os resultados têm uma exatidão adequada face ao objetivo e que são fornecidos ao cliente com confiança.

Relativamente aos valores de *Z-score* dos ensaios que realizei apresentam-se compreendidos dentro dos valores de *Z-score* obtidos pelos técnicos responsáveis dos métodos.

Capítulo 4 – Conclusão

No presente Projeto Individual, pretendeu-se numa primeira fase validar dois métodos internos que se encontram, ainda, fora do âmbito da acreditação no Laboratório da ARHN.

Um dos métodos, a determinação da turvação, é baseado na capacidade nefelométrica das partículas em suspensão e foi introduzido no Laboratório apenas este ano. O outro método, que consiste na determinação da clorofila a , recorre a espectrofotometria de absorção molecular.

O processo de validação iniciou-se com a construção das retas de calibração. A escolha dos padrões teve em consideração as particularidades de cada método e as amostras analisadas em rotina.

Em ambos os casos foi possível definir a gama de trabalho, tendo-se obtido uma boa linearidade, o que permite assumir que o ajuste linear é adequado ao uso pretendido.

O estudo da seletividade foi apenas realizado na determinação da turvação uma vez que o método referente à clorofila a ainda necessita de ajustes neste sentido, dado não existir documentação acessível quanto a este parâmetro.

Os resultados obtidos nos ensaios de recuperação no método da turvação cumpriram com o critério de aceitação estabelecido de 10 %. Neste sentido, comprovou-se que o método se encontra isento de interferências e não há efeitos de matriz.

Em ambos os métodos a precisão foi avaliada em condições de repetibilidade e precisão intermédia e os resultados obtidos mostraram-se satisfatórios por se encontrarem dentro dos critérios estipulados em ambos os métodos.

Os limiares analíticos revelaram-se apropriados para análise de rotina.

A participação em ensaios interlaboratoriais ainda não foi possível para estes parâmetros. A entrada da determinação da turvação no Laboratório é recente e para a determinação da clorofila a o Laboratório ainda não solicitou a participação neste tipo de ensaios. Neste sentido, a exatidão da turvação foi calculada recorrendo a MRC, apresentando um valor satisfatório.

A estimativa de incerteza tendo por base a norma ISO 11253 demonstrou ser adequada, para a avaliação da turvação.

Quanto ao método para avaliar a clorofila a devido à inexistência de EIL, MRC e ensaios de recuperação não foi possível avaliar a exatidão, nem estimar a incerteza do método.

Após o estudo da validação, houve a necessidade de avaliar o sistema de controlo de qualidade, de modo a garantir que os resultados sejam credíveis durante a análise por rotina do parâmetro em questão. No que diz respeito ao controlo de qualidade interno, a análise dos padrões de controlo escolhidos para cada método, veio confirmar que o processo se encontrava sob controlo, dado que nenhum resultado excedeu os critérios de aceitação estabelecidos.

A participação nos EIL para os parâmetros pH, condutividade, SST, CQO, CBO em águas naturais e pH, condutividade, SST e CQO em águas residuais permitiram avaliar o desempenho na execução destes ensaios e demonstram que os resultados obtidos são satisfatórios.

A par da validação dos métodos anteriormente referidos, foram realizados outros ensaios físico-químicos em rotina, nomeadamente a determinação do pH, condutividade, CBO, SST, alcalinidade, dureza, CQO, determinação de cloreto, nitrato, nitrito, fosfato e amónia.

Foi ainda assegurada toda a logística referente à preparação de soluções padrão, solução de trabalho, controlo de qualidade e registo de resultados.

Além destas competências mais científicas, foi desenvolvida a capacidade de trabalhar em equipa assim como a obtenção de uma maior autonomia no laboratório.

O Projeto Individual realizado no âmbito do segundo ano do Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química permitiu colocar em prática os conhecimentos adquiridos no primeiro ano, desenvolver um espírito crítico para analisar resultados, assim como criar a capacidade para ultrapassar os obstáculos que foram surgindo no ambiente empresarial.

Capítulo 5 – Bibliografía

1. APA, I.P., Agência Portuguesa do Ambiente. *Água*, 2016. Disponível em: www.apambiente.pt, acessado a 15-10-2016.
2. Branco, A. *Novos paradigmas para a gestão da água e dos serviços de água e saneamento: o caso de Portugal*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, 2007.
3. APA, I.P., Agência Portuguesa do Ambiente. Relatório do Estado do Ambiente Portugal, 2016. Disponível em: <http://sniamb.apambiente.pt/infos/geoportaldocs/REA/REA2016/REA2016.pdf>, acessado a 24-10-2016.
4. BioLugar, Colégio 7 fontes. Fontes de poluição aquática, 2012. Disponível em: <http://1.bp.blogspot.com/-jltGi3IRWNU/T89-HJxD-NI/AAAAAAAAAZU/tVHn9MOT4Sw/s1600/Imagem1.jpg>., acessado a 24-10-2016.
5. RELACRE. *Guia Relacre 28 - Amostragem de águas*. Comissão Técnica Relacre CTR07, Grupo de Trabalho GT3. 01-2017. Portugal 978-972-8574-42-0.
6. Manual de Procedimentos 3.100 LAB 1.0 - Recolha de águas subterrâneas. Edição n.º 1, Revisão n.º 0 de 15-05-2011.
7. Moreira, Leonardo M., et al. *Química Nova*. 2ª Edição. São Paulo. 2010. ISBN 0100-4042. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000200005, acessado a 23-05-2017.
8. Bettencourt Ana P. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Métodos de Validação Analítica: Estimativa da Incerteza de Medição, Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
9. Funk W., Dammann V., Donnevert G. *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. 2ª Edição. Alemanha:Wiley-VCH. 2007. ISBN 978-3-527-31114-9.
10. Sadar M. J. *Stabilized formazin composition*. Hach Company. United States Patente 08/566, 166. 1-12-1995.
11. Chamley H. *Environnements Géologiques et Activités Humaines*. Paris: Vuibert. 2002. ISBN 2-7117-5284-4.
12. Manual de Procedimentos - 3.031 LAB 1.6 - Colheita e Conservação de Amostras. Edição n.º 1, Revisão n.º 0 de 2014.

13. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: Laboratory Guide to Method Validation and related Topics*. 2nd Edition. 2014.
14. Santos E. *Validação de métodos analíticos e monitorização da qualidade de águas subterrâneas*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2016.
15. RELACRE. *Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*. Comissão Técnica da Relacre 03, Grupo de Trabalho GT3. 02-2000. Portugal 972-8574-02-9.
16. Geraldo D. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Métodos de Validação Analítica: Validação de Métodos Analíticos. Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
17. SIGMA-ALDRICH. Safety Data Sheet. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/>., consultado em 23-05-2017.
18. Decreto-Lei n.º 56/2012 de 12 de março de 2012.
19. www.apaambiente.pt, acedido a 11-11-2016.
20. Lei 58/2005, Diário da República de 29 de dezembro de 2005.
21. Decreto-Lei n.º 130/2012 de 22 de junho de 2012.
22. DIÁRIO DA REPÚBLICA. Directiva 2000/6/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000.
23. Diário da república. Portaria n.º 108/2013, março 2013.
24. Rede laboratorial da APA, I.P. *Manual da Qualidade*. 3ª Edição. Lisboa. 02-2017.
25. APA I.P. Diário da República, 2.ª série — N.º 113 — 14 de junho de 2013.
26. Ribeiro Patrícia I. *Requisitos de Gestão e Técnicos no Laboratório de Análises das Águas do Porto à luz da norma NP EN ISO/IEC 17025*. Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2015.
27. UNESCO. *Water and Jobs*. The United Nations World Water Development Report. 2016.
28. Revenga C, Brunner J, Henninger N, Kassen K, Payne R. *Pilot Analysis of Global Ecosystems: Freshwater Systems*. World Resource Institute: Washinigton DC. 2000.
29. APA I,P. *Plano nacional da água - Relatório n.º 2: Análise dos principais problemas, diagnóstico, objectivos e medidas*. junho de 2015.

30. WORLD HEALTH ORGANIZATION . *Guidelines for Drinking-water Quality*. 4ª Edição. WHO. 2011. ISBN 978-92-4-154815-1.
31. Decreto-Lei n.º306/2007 de 27 de agosto de 2007.
32. ISO 8402:1994. *Quality management and quality assurance — Vocabulary*. 1994.
33. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods: Laboratory Guide to Method Validation and related Topics*. 2ª edição. 2014.
34. ISO 9001:2008. *Quality management system - Requirements*. 4th Edition. 17-07-2009.
35. Geraldo D. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Métodos de Validação Analítica: Introdução à Qualidade no Laboratório de Química Analítica. Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
36. NP EN ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaios de calibração*. 2005.
37. MINISTÉRIO PÚBLICO DE SANTA CATARINA. *Manual Técnico Para Coleta de Amostras de Água*. Suporte Técnico-Jurídico: Brasil. 2005.
38. ANA - Agência Nacional de Águas. Guia nacional de coleta e preservação de amostras - Água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Brasil. 2012.
39. ARHN - Administração da Região Hidrográfica do Norte. Plano de monitorização de 2017.
40. ISO 5667-3. *Water Quality - Sampling - Part 3: Preservation and handling of water samples*. 4nd Edition. 15-11-2012.
41. Manual de Procedimentos - 3.099 LAB 1.0 - Recolha de Águas Superficiais. Edição n.º1. Revisão n.º 0 de 2011.
42. Manual de Procedimentos 3.097 - LAB 1.0 - Recolha de águas residuais. Edição n.º 1. Revisão n.º 0 de 2011.
43. Federal Provincial Territorial Committee on Drinking Water of the Federal Provincial Territorial Committee on Health and the Environment. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Summary Table*. Canada. 2017.
44. Conner C, Visser A. A laboratory investigation of particle size effects on an optical backscatterance sensor. Elsevier. 2nd Edition. *Marine Geology*. 1992. vol. 108:

- 151-159.
45. Recomendação IRAR n.º 05/2007 - Desinfecção da água destinada ao consumo humano. 2007.
 46. Decreto-Lei n.º306/2007 de 27 de agosto de 2007.
 47. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. *Ficha Técnica - Turvação*. Disponível em http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041548-ft_qi_09_turvacao_23102012.pdf, acessado a 20-04-2017.
 48. APHA/AWWA/WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington DC. 23ª Edição. 2017. ISBN 9781625762405.
 49. ISO 7027-1. *Water Quality - Determination of turbidity - Part 1: Quantitative methods*. 1st Edition. 2016.
 50. APHA/AWWA/WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Biological examination, Plankton (10200)*. Washington DC. 22th Edition. 2012. ISBN 9780875530130.
 51. Medeiros Suelen S. *Determinação de pigmentos fotossintéticos em água por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC-DAD) e espectrofotometria*. Projeto de graduação de licenciatura em química, Universidade Federal de Santa Catarina, FLORIANÓPLIS, 2016.
 52. Costa S. Apontamentos da Unidade Curricular Análise Estrutural: Espectroscopia de Ultravioleta-Vísivel (UV-Vis). Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
 53. CETESB - Norma técnica L5.306. Determinação de Clorofila *a* e Feotina *a*: método espectrofotométrico. 3ª Edição. São Paulo. 2014.
 54. Esteves, Francisco A. *Fundamentos de Limnologia*. 2ª Edição. Interciências, Rio de Janeiro. 1998.
 55. Edmondson W. T. *Limnology and Oceanography*. 1st Edition. Ediciones Omega, S. A., Barcelona. 1983.
 56. NP 4327:1996. *Doseamento da Clorofila a e feopigmentos por espectroscopia de absorção molecular - Método de extração com acetona*. 1ª Edição. 1996.
 57. Yentsch, Charles S., Menzel David W. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. Elsevier. 3rd Edition.

- Deep Sea Research and Oceanography*. 1963. vol. 10: 221-231.
58. Lorexén C. Determination of Chlorophyll and pheo-pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology. Institute Marine Resource*. 1967. vol. 12: 343-346.
59. Yentsch C. Distribution of chlorophyll and pheophytin in the open ocean. *Deep-Sea Resource*. 1965. vol. 12: 653-666.
60. Richards F., Thompson T. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analyses. II. A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments. *Journal Marine Resource*. 1952. vol.11: 156-172.
61. Vernon L. Spectrophotometric Determination of Chlorophylls and Pheophytins in Plant Extracts. *Analytical Chemistry*. 1960. vol. 32: 1144-1150.
62. Leite F. *Validação Em Análise Química*. 5ª edição. Campinas: Átomo. 2008.
63. Taylor J. *Quality Assurance of Chemical Measurements*. 1st Edition. Lewis Publishers. 1987. ISBN 978-0873710978.
64. Harvey D. *Modern Analytical Chemistry*. 1st Edition. Modern analytical chemistry. 2000. ISBN 0-07-237547-7.
65. Almeida M. *Validação de um Método Analítico: Determinação de fósforo total*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
66. ISO 8466 - 1. *Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*. 1st Edition. 1-03-1990.
67. ISO 8466 - 2. *Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics, Part 2: Statistical strategy for non-linear second-order calibration functions*. 2nd Edition. 1-11-2001.
68. Manual de Procedimentos - 3.049 LAB 1.1 - Validação de métodos de ensaios. - "físico-químicos". Edição n.º 1, Revisão n.º 5 de 2012.
69. RELACRE. *Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos*. Comissão Técnica da Relacre 03, Grupo de Trabalho GT02. 01-1996. Portugal 972-96727-25.
70. Ribani M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*. 2004. vol. 27: 771-780.
71. IUPAC. *Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM)*. 1ª edição. 2012.

72. IUPAC. *Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis*. Pure Applied Chemical. 2002. vol. 74: 835-855.
73. Bettencourt Ana P. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Métodos de Validação Analítica: Material de Referência. Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
74. Bettencourt Ana P. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Métodos de Validação Analítica: Ensaios Interlaboratoriais. Mestrado em Técnicas de Caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
75. Nordtest TR 569. *Internal Quality Control*. 4th Edition. Handbook for Chemical Laboratories. Norway. 2011. ISSN 0283-7234.
76. Nordtest TR 537. *Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*. 3.1^a Edição. 11-2012.
77. ISO 11352. *Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty Based on Validation and Quality Control Data*. 1^a Edição. 1-07-2012.
78. Fifield F., Kealey D. *Principles and Practice of Analytical Chemistry*. Blackwell. USA. 2008.
79. IPAC. *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos - OGC007*. 31-01-2007.
80. IPAC. *Guia para Acreditação de Laboratórios Químicos - OGC002*. 18-05-2011.
81. Bettencourt Ana P. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade de Métodos de Validação Analítica: Validação de Resultados. Mestrado em Técnicas de caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).
82. Deming E. *Water A. Shewhart, 1891-1967*. American Statistician. 1967. vol. 21: 39-40.
83. RELACRE. *Guia Relacre 9 - Alguns Exemplos de Cartas Decontrolo Em Laboratório de Análise Química*. 1^a Edição. 1998. ISBN: 972-96727-8-4.
84. Bettencourt Ana P. Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade de Métodos de Validação Analítica: Ferramentas de Controlo de Qualidade. Mestrado em Técnicas de caracterização em Análise Química, Universidade do Minho, (2015/2016).

85. The Pulsar. Amp Power LED driver with Modulation Input. *Electricity and Electronics*. Published: 1-05-2017. Disponível em: <http://www.thepulsar.be/article/1-amp-power-led-driver-with-modulation-input>, acessado em 27-05-2017.
86. United States Environmental Protection Agency. *Method 180.1 - 1: Determination of Turbidity by Nephelometry*. 1993.
87. HACH LANGE. *Manual básico do utilizador TU5200*. 2016. Disponível em: http://hachcompany.custhelp.com/app/answers/answer_view/a_id/1003936/~tu5200-series-user-manual-, acessado em 29-03-2017.
88. Associação Portuguesa de Distribuição e Drenagem de Águas. Comissão Especializada de Qualidade da Água. Ficha Técnica - Turvação. 11-12-2012. Disponível em: http://www.apda.pt/site/ficheiros_eventos/201212041548-ft_qi_09_turvacao_23102012.pdf, acessado a 1-04-2017.
89. ISO/IEC 43-1 - *Proficiency testing by interlaboratory comparisons - Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes*. 2nd Edition. 1997.
90. IPAC - *Guia para a quantificação de incerteza em ensaios químicos*. OGC007. 31-01-2007.
91. NP 4327:1996. *Doseamento da Clorofila a e feopigmentos por espectroscopia de absorção molecular - Método de extração com acetona*. 1^a Edição. 1996.
92. González G, Herrador A. *A practical guide to analytical method validation , including measurement uncertainty and accuracy profiles*. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2015. vol. 26: 227-238.
93. Arar E. J. *Method 446.0: In Vitro Determination of Chlorophylls a , b , c1 + c2 and Pheopigments in Marine And Freshwater Algae by Visible Spectrophotometry*. National Exposure Research Laboratory. U.S. ENvironment Protection Agency. Revision 1.2. 1997.
94. IPAC. *Procedimento para acreditação de laboratórios DRC005*. 11-12-2012.

Capítulo 6 – Anexos

Frases de risco e segurança dos reagentes utilizados ao longo do desenvolvimento laboratorial.

Tabela A1 – Advertência de perigo (H) associados aos reagentes utilizados na preparação de soluções.

Reagentes	Perigo (H)
Acetona 90 % (V/V)	H225: Líquido e vapor facilmente inflamáveis. H319: Provoca irritação ocular grave. H336: Pode provocar sonolência ou vertigens.
Ácido clorídrico	H290: Pode ser corrosivo para os metais. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias.
Clorofila A	H302+H312: Nocivo por ingestão ou contacto com a pele. H332: Nocivo por inalação
Hexametilenodiamina	H302+H312: Nocivo por ingestão ou contacto com a pele. H314: Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. H335: Pode provocar irritação das vias respiratórias. H410: Muito tóxico para organismos aquáticos, com efeitos prolongados.
Sulfato de hidrazina	H301 + H311 + H331: Tóxico se ingerido, inalado ou contacto com a pele. H317: Pode provocar reações alérgicas na pele. H350: Pode causar cancro. H410: Muito tóxico para organismos aquáticos, com efeitos prolongados.

Tabela A2 – Recomendação de precaução (P) associado aos reagentes utilizados na preparação de soluções.

Reagentes	Precaução (P)
Acetona 90 % (V/V)	P210: Manter afastado do calor, superfícies quente, faíscas, chamas abertas e outras fontes de ignição. Não fumar. P305 + P351 + P338: Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar P370 + P378: Em caso de incêndio: para extinguir utilizar pó seco ou areia seca. P403 + P235: Armazenar em local bem ventilado. Conservar em ambiente fresco.
Ácido clorídrico	P261: Evitar respirar as poeiras/ fumos/ gases/ névoas/ vapores/ aerossóis P280: Usar luvas de proteção/ vestuário de proteção/ proteção ocular/ proteção facial. P305 + P351 + P338: Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar P310: Contacte imediatamente um centro de informação antivenenos/ médicos.
Clorofila <i>a</i>	P301 + P310: Em caso de ingestão: caso sinta indisposição, contacte um centro de informação antiveneno P302 + P352: Em caso de contacto com a pele, lavar abundantemente com sabão e água. P304 + P340: Em caso de inalação: retirar a vítima para um local ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

	P305+P351+P338: Se entrar em contacto com os olhos: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar
Hexametilelenotratamina	P210: Manter longe do calor, faíscas, labaredas ou superfícies quentes – Não fumar P261: Evitar respirar as poeiras/ fumos/ gases/ névoas/ vapores/ aerossóis P262: Evitar contacto com os olhos, pele ou roupa P280: Usar luvas/ vestuário/proteção fácil.
Sulfato de hidrazina	P201: Pedir instruções específicas antes da utilização. P273: Evitar libertar para o ambiente. P302 + P352: Se entrar em contacto com a pele: lavar abundantemente com água e sabão. P304 + P340: Se cheirar: Levar a pessoa para um local ao ar livre e confortável para respirar. P308 + P310: Se exposto: contactar imediatamente o centro de venenos ou um médico.