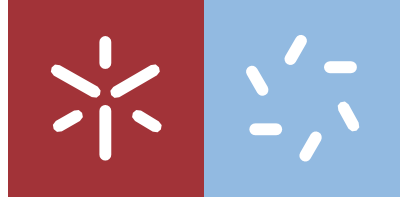


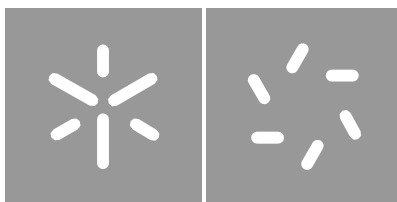


Implementação e validação do método de determinação do urânio por ICP-MS em águas de consumo humano e águas naturais (superficiais e subterrâneas)

João Manuel Lopes Oliveira

Universidade do Minho
Escola de Ciências





Universidade do Minho

Escola de Ciências

João Manuel Lopes Oliveira

**Implementação e validação do método de
determinação do urânio por ICP-MS em águas de
consumo humano e águas naturais (superficiais e
subterrâneas)**

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob a orientação da

Dra. Ana Cristina Pereira de Castro

e da

Doutora Maria Dulce Silva Geraldo

outubro de 2023

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

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

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

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

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição - Não Comercial - Compartilha Igual

CC BY-NC-SA

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

Agradecimentos

Ao longo destes dois anos, e sobretudo na realização desta dissertação de Mestrado, pude contar com importantes apoios e incentivos de pessoas que não poderia deixar de nomear e mostrar a minha imensa gratidão.

À empresa **Águas do Norte, S.A.** e ao **Engenheiro Marco Silva**, por darem a oportunidade de estagiar e criar um estágio no qual foi possível colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos durante a formação académica, assim como possibilitar as condições necessárias para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, **Professora Doutora Dulce Geraldo**, expresso desde já o meu enorme reconhecimento por me ter aceite como seu estagiário, por toda a ajuda infindável, grande amizade, e por se ter mostrado sempre disponível durante todo o trabalho, assim como pela transmissão de conhecimentos científicos.

À responsável técnica **Dr. Ana Castro**, orientadora destacada pela empresa, por ter despendido o seu tempo para me acompanhar ao longo de todo o processo experimental para que este fosse concluído com sucesso, e por me oferecer bons conselhos.

A todos membros do laboratório, **Carlos, Clara, Marília, Paulo, Patrícia Cruz, Patrícia Fernandes, Pedro, Raquel, Tiago, Zé Nuno**, por me terem acolhido durante estes meses de estágio, pelo espírito de entreajuda sempre mostrado, e pelos bons momentos que me proporcionaram. A todos eles, desejo as maiores felicidades, tanto a nível profissional como pessoal.

À minha **Mãe** e ao meu **Pai**, pelo amor, carinho, afeto e dedicação. Obrigado por terem feito de mim a pessoa que sou hoje, por estarem sempre presentes na minha vida, e por acreditarem em mim e no meu trabalho.

À minha **Irmã**, pelo compreensão, força, apoio e por nunca me falhar nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos de infância, **Gabi, Guida, Bia e Xica**, por estarem comigo desde o primeiro dia desta jornada e por sempre me apoiarem e se mostrarem prontas para me ouvirem.

Aos meus amigos, em especial aos que conheci no Mestrado, **Nuno, Diogo, Paula, Andreia**, não esquecendo a minha **Diana** e a família “**Pullum**”, que nasceu na “Bila”. A todos eles, agradeço toda a amizade, companhia e motivação durante estes anos.

A todos, o meu sincero e profundo **Muito Obrigado!**

Declaração de integridade

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

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

Implementação e validação do método de determinação do urânio por ICP-MS em águas de consumo humano e águas naturais (superficiais e subterrâneas)

Resumo

A água constitui um bem essencial à vida, apresentando-se como um recurso indispensável à sobrevivência da biosfera, em geral. Posto isso, o controlo de qualidade da água é essencial para comprovar o nível de qualidade da água aliado ao cumprimento da legislação em vigor através da manutenção de um controlo operacional que permita detetar possíveis anomalias na qualidade da água, de modo a permitir que sejam postas em prática medidas preventivas/corretivas eficazes.

Esta dissertação teve como objetivo a implementação, a validação e o controlo de qualidade do método de determinação do urânio por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS) em matrizes de águas de consumo humano e águas doce naturais (superficiais e subterrâneas).

Antes de iniciar a validação do método propriamente dita foi necessário escolher o isótopo em estudo assim como o padrão interno a utilizar. O método foi então caracterizado considerando os parâmetros de desempenho: gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, seletividade, limiares analíticos, precisão, justeza, assim como a estimativa da incerteza de medição. Posteriormente, foi monitorizado o controlo de qualidade interno com recurso a cartas de aceitação. Os resultados obtidos foram comparados com os critérios de aceitação definidos pelo Laboratório e com os valores estabelecidos na Diretiva (EU) 2020/2184, assim como pelo Decreto-Lei n.º 69/2023.

O isótopo escolhido foi o 238 e o padrão interno utilizado foi o bismuto. O método analítico apresentou uma excelente linearidade e verificou-se ainda que a sensibilidade encontrava-se dentro do estipulado pelo fabricante, assim como os limites analíticos encontravam-se adequados. O método apresentou taxas de recuperação dentro dos valores estipulados, concluindo que o método é seletivo. A precisão do método foi caracterizada recorrendo a ensaios realizados em condições de repetibilidade e de precisão intermédia em três níveis de concentração e duplicados de amostras. Os valores dos coeficientes de variação foram satisfatórios para todos os níveis de concentração e para os duplicados de amostras. Recorrendo a ensaios de recuperação e a um Material de Referência Certificado (MRC), constatou-se que não foi evidenciada ocorrência de erros sistemáticos, demonstrando assim a justeza do método. A estimativa da incerteza baseada nos dados de validação foi calculada e demonstrou ser adequada para o uso. O método foi devidamente implementado, validado e foi demonstrada a sua adequação para a quantificação do urânio em diferentes matrizes de água.

Palavras-chaves: Águas; Controlo de qualidade; ICP-MS; Urânio; Validação de métodos.

Implementation and validation of the method for determining uranium by ICP-MS in drinking water and natural waters (surface and groundwater)

Abstract

Water is essential to life and an indispensable resource for the survival of the biosphere in general. That said, water quality control is essential to verify the level of water quality and compliance with the legislation in force through maintenance of an operational control that allows possible anomalies in water quality to be detected, so that effective preventive/corrective measures can be put in place.

The aim of this dissertation was to implement, validate and control the quality of the method for determining uranium by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) in drinking water matrices and natural freshwater (surface and groundwater).

Before starting the actual validation of the method, it was necessary to choose the isotope under study and the internal standard to be used. The method was then characterized considering the performance parameters: working range, linearity, sensitivity, selectivity, analytical thresholds, precision, accuracy, as well as the estimation of measurement uncertainty. Subsequently, internal quality control was monitored using acceptance charts. The results obtained were compared with the acceptance criteria defined by the Laboratory and with the values established in Directive (EU) 2020/2184, as well as Decree-Law No. 69/2023.

The isotope chosen was 238 and the internal standard used was bismuth. The analytical method showed excellent linearity and it was also found that the sensitivity was within the manufacturer's stipulations, and the analytical limits were adequate. The method presented recovery rates within the stipulated values, concluding that the method is selective. The precision of the method was characterized using tests carried out under repeatability conditions and intermediate precision was evaluated at three concentration levels and duplicate samples. The coefficient of variation values were satisfactory for all concentration levels and duplicate samples. Using recovery tests and a Certified Reference Material (CRM), it was found that there were no systematic errors, thus demonstrating the fairness of the method. The uncertainty estimate based on the validation data was calculated and proved to be suitable for use. The method was properly implemented and validated and its suitability for quantifying uranium in different water matrices was demonstrated.

Keywords: Water; Quality control; ICP-MS; Uranium; Method validation.

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xvii
Capítulo 1 Enquadramento do trabalho	1
1.1. Apresentação da empresa	2
1.2. Laboratório da Águas do Norte, S.A.	4
1.3. Objetivos	5
1.4. Organização da dissertação	6
Capítulo 2 Introdução	7
2.1. Água	8
2.1.1. Águas superficiais	10
2.1.2. Águas subterrâneas	10
2.2. Urânio	11
2.2.1. Propriedades físicas, químicas e radiológicas	12
2.2.2. Toxicidade	13
2.2.3. Legislação	14
2.3. Técnicas espectrométricas para determinação de urânio	14
2.3.1. Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo	15
2.3.2. Princípio de funcionamento da técnica	16
2.3.3. Interferências.....	20
2.3.3.1. Interferências espectrais	21
2.3.3.2. Interferências não espectrais	23
2.3.4. Outras técnicas.....	25
2.4. Validação de métodos analíticos.....	27

2.4.1. Curva de calibração	28
2.4.2. Gama de trabalho	29
2.4.3. Linearidade.....	29
2.4.4. Sensibilidade	31
2.4.5. Seletividade e especificidade	31
2.4.6. Limiares analíticos	32
2.4.6.1. Limite de deteção	32
2.4.6.2. Limite de quantificação.....	33
2.4.7. Precisão	34
2.4.7.1. Repetibilidade.....	34
2.4.7.2. Precisão intermédia.....	35
2.4.8. Justeza	37
2.4.8.1. Materiais de Referência Certificados.....	37
2.4.8.2. Ensaio Interlaboratoriais.....	40
2.4.8.3. Ensaio de Recuperação.....	40
2.4.9. Incerteza de medição.....	40
2.4.10. Garantia de Controlo de Qualidade.....	43
2.4.10.1. Controlo de qualidade interno	43
Capítulo 3 Metodologia experimental.....	45
3.1. Materiais e Equipamentos	46
3.2. Reagentes e gases.....	47
3.3. Preparação de soluções	48
3.3.1. Preparação da solução de padrão interno de bismuto (5 µg Bi/L)	48
3.3.2. Preparação da solução de lavagem (2 % HNO ₃ v/v).....	48
3.3.3. Preparação do branco de trabalho (1 % HNO ₃ v/v)	48
3.3.4. Preparação de soluções e padrões utilizados para a curva de calibração.....	48
3.3.5. Preparação de soluções e padrões utilizados para o controlo de qualidade.....	49
3.4. Condições experimentais	50
3.5. Procedimento experimental.....	51
3.5.1. Estudo do padrão interno	51
3.5.2. Estudo de interferências.....	51

3.5.3. Curva de calibração	52
3.5.4. Amostras	52
3.5.5. Ensaios de recuperação	52
3.5.6. Material de colheita, colheita e transporte de amostras	52
3.6. Análise e apresentação de resultados.....	53
Capítulo 4 Apresentação e discussão de resultados.....	54
4.1. Estabelecimento das condições analíticas	55
4.1.1. Seleção do isótopo	55
4.1.2. Verificação inicial do equipamento.....	55
4.1.3. Seleção do padrão interno.....	57
4.1.4. Estudo de interferências.....	58
4.2. Validação do método de determinação de urânio por ICP-MS	58
4.2.1. Análise de dados ICP-MS e estratégias de calibração	59
4.2.2. Curva de calibração	61
4.2.3. Linearidade.....	63
4.2.4. Sensibilidade	65
4.2.5. Seletividade	67
4.2.6. Limiares analíticos	68
4.2.6.1. Limite de deteção	68
4.2.6.2. Limite de quantificação.....	68
4.2.7. Precisão	69
4.2.7.1. Repetibilidade.....	70
4.2.7.2. Precisão Intermédia.....	70
4.2.8. Justeza	75
4.2.9. Incerteza de medição.....	76
4.2.10. Controlo de qualidade do método.....	80
4.2.10.1. Controlo de Qualidade Interno.....	81
4.3. Outras atividades desenvolvidas no Laboratório	86
Capítulo 5 Conclusão	88
Capítulo 6 Referências bibliográficas.....	91

Anexos..... 97

Anexo 1 Programa da máquina de lavar utilizada para a lavagem do material afeto ao ICP-MS.....	98
Anexo 2 Incerteza expandida da concentração de soluções padrão	99
Anexo 3 Instruções de funcionamento do ICP-MS Thermo Scientific iCAP RQ	100
Anexo 4 Exemplo do <i>Performance Report</i> , obtido no dia 10 de maio de 2023.....	102
Anexo 5 Resultados obtidos pelo <i>software</i> para a curva de calibração realizada no dia 23 de maio de 2023, com respetivos fatores de correção e concentrações corrigidas	105
Anexo 6 Curvas de calibração realizadas ao longo da validação do método de determinação do urânio e respetivos valores das incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem, bem como os coeficientes de determinação obtidos para cada curva.	106
Anexo 7 Carta de controlo para estudo de estabilidade dos declives	107
Anexo 8 Ensaios de recuperação em três matrizes para o estudo da seletividade.....	108
Anexo 9 Limiares analíticos do método	109
Anexo 10 Precisão do método em condições de repetibilidade	110
Anexo 11 Precisão do método em condições de precisão intermédia	111
Anexo 12 Cartas de controlo	112

Índice de figuras

Figura 1 Empresas nacionais e internacionais integradas no Grupo Águas de Portugal [3].	2
Figura 2 Mapa do sistema multimunicipal de abastecimento de água e saneamento do norte de Portugal, efetuado pela Águas do Norte, S.A. [4].	3
Figura 3 Distribuição global da água no planeta Terra.	8
Figura 4 Representação esquemática do sistema de um ICP-MS (adaptada de [49]).	16
Figura 5 Representação esquemática das diferentes zonas de temperatura no plasma (adaptada de [61]).	17
Figura 6 Representação esquemática da seção transversal da região da interface entre o ICP e o espectrómetro de massa (adaptada de [60]).	18
Figura 7 Representação esquemática de um dínodo multiplicador de eletrões (adaptada de [59]).	20
Figura 8 Esquema representativos dos vários tipos de interferências em ICP-MS [46,57].	21
Figura 9 Vista da frente do ICP-MS iCAP RQ utilizado no trabalho, com os respetivos componentes do equipamento e amplificação da zona do analisador de massa (adaptada de [59]).	23
Figura 10 Estratégias de calibração: (A) Calibração externa baseada na análise de padrões multielementares com concentrações crescentes para estabelecer uma relação matemática entre as intensidades do sinal e as concentrações dos analitos, e (B) Calibração externa com padronização interna, onde uma quantidade igual do elemento do padrão interno é adicionado a todas as soluções e amostras a serem analisadas [49].	25
Figura 11 Parâmetros de desempenho avaliados na validação do método analítico.	27
Figura 12 Representação gráfica das contagens normalizadas em função do tempo/número de ensaios, para o urânio, ródio, índio e bismuto, em duas matrizes diferentes.	58
Figura 13 Representações gráficas da resposta relativa do padrão interno, bismuto, ao longo de uma série de trabalho e do fator de correção aplicado ao analito, urânio.	60
Figura 14 Representação gráfica da curva de calibração das contagens por segundo (cps) em função da concentração de urânio ($\mu\text{g U/L}$), com os respetivos desvios padrão.	62
Figura 15 Carta de controlo de indivíduos para a monitorização do declive ($\text{cps L } \mu\text{g}^{-1}$) das curvas de calibração.	63
Figura 16 Gráficos de resíduos da curva de calibração do urânio com (A) sinal absoluto do resíduo; (B) sinal do resíduo em percentagem relativa.	64
Figura 17 Gráficos do desempenho da sensibilidade, ao longo do tempo, para os elementos cobalto (^{59}Co), índio (^{115}In), bismuto (^{209}Bi) e urânio (^{238}U).	66

Figura 18 Gráficos da monitorização da formação de óxidos ($^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$), ao longo do tempo.....	66
Figura 19 Carta de aceitação de duplicados (LA – 10 %) para a monitorização do controlo de qualidade do método para determinação de urânio.	81
Figura 20 Carta de controlo de amplitudes para os duplicados de amostra, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método.	82
Figura 21 Cartas de aceitação para o padrão: (A) de menor concentração da curva de calibração (0,10012 µg U/L); (B) intermédio (0,6007 µg U/L) e (C) de maior concentração (5,006 µg U/L) recorrendo ao critério de aceitação de 25, 15 e 10 %, respetivamente.	83
Figura 22 Cartas de controlo de indivíduos para o padrão: (A) de menor concentração da curva de calibração (0,10012 µg U/L); (B) intermédio (0,6007 µg U/L) e (C) de maior concentração (5,006 µg U/L), tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para o urânio.....	85
Figura 23 Diagrama de “causa-efeito” para a identificação de fontes de incerteza da solução padrão de menor concentração (0,10012 µg U/L).	99

Índice de tabelas

Tabela 1 Principais propriedades físicas e químicas do urânio [29,30].....	12
Tabela 2 Propriedades dos isótopos de urânio [29,33].	12
Tabela 3 Estudos realizados utilizando ICP-MS para quantificação de urânio em águas de consumo humano.....	26
Tabela 4 Estudos realizados utilizando outros métodos analíticos, em águas doces subterrâneas, para quantificação de urânio.....	26
Tabela 5 Dados obtidos num ensaio através da ANOVA unifatorial	36
Tabela 6 Características da água obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q® IQ 7000.	46
Tabela 7 Material utilizado na realização do procedimento experimental e respetivas incertezas.....	46
Tabela 8 Equipamento utilizado na realização do trabalho experimental e respetiva marca e modelo.	47
Tabela 9 Reagentes utilizados durante a realização do procedimento experimental.	48
Tabela 10 Concentrações das soluções padrão utilizadas no traçado da curva de calibração e respetivas incertezas, sendo também apresentado os volumes da solução intermédia 2 utilizados para a preparação dos padrões.	49
Tabela 11 Concentrações das soluções padrão controlo e respetivas incertezas, sendo também apresentado os volumes da solução intermédia 2 utilizados para a preparação dos padrões..	50
Tabela 12 Especificações das condições definidas do ICP-MS e do amostrador automático.	50
Tabela 13 Parâmetros avaliados no Performance test e respetivos critérios de aceitação, no que diz respeito à sensibilidade.....	56
Tabela 14 Critérios de aceitação para a estabilidade das leituras.	56
Tabela 15 Critérios de aceitação para o teste de calibração de massas.	56
Tabela 16 Valores de concentração obtidos, para as três leituras efetuadas pelo software, para três níveis de concentração, com os respetivos coeficientes de variação (CV).....	60
Tabela 17 Valores de concentração e contagens por segundo corrigidas utilizados para a construção da curva de calibração, assim como o respetivo desvio padrão.	61
Tabela 18 Intervalos de confiança da ordenada na origem (t_{S_0}) e do declive (t_{S_1}) da curva de calibração, para 95 % de probabilidade, assim como os valores obtidos do desvio padrão do método (S_m) e o coeficiente de variação do método (CV_m).	62
Tabela 19 Resultados obtidos através da análise de dez curvas de calibração, com o intuito de avaliar a linearidade.....	63

Tabela 20 Valores obtidos e utilizados na aplicação do Teste de Mandel, com o intuito de confirmar a linearidade.....	65
Tabela 21 Taxa de recuperação média obtida em dez ensaios de recuperação, em três matrizes diferentes (águas de consumo humano (ACH) e águas doce naturais superficiais (ADNSup) e subterrâneas (ADNSub)).	67
Tabela 22 Valores obtidos para o limite de detecção do método e o limite de detecção instrumental.	68
Tabela 23 Valores obtidos após análise de dez padrões independentes de concentração igual ao limite de quantificação (0,10012 µg U/L), ao longo do tempo, para avaliação do limite de quantificação.....	69
Tabela 24 Parâmetros de avaliação da precisão em condições de repetibilidade.....	70
Tabela 25 Valores obtidos na análise de cinco conjuntos de cinco soluções independentes, para cada nível de concentração (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade), ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o urânio.	71
Tabela 26 Valores obtidos na análise de soluções independentes, para cada nível de concentração (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade), ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o urânio.	72
Tabela 27 Resultados obtidos da precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, para os três níveis de concentração avaliados (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade), para o urânio com auxílio à ANOVA unifatorial.	73
Tabela 28 Valores obtidos na análise de duplicados de amostras, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o urânio.	74
Tabela 29 Resultados obtidos na análise de um MRC, com o intuito de avaliar a justeza do método de determinação do urânio.	75
Tabela 30 Resultados obtidos nos ensaios de recuperação efetuados de amostras reais fortificadas de água de consumo (ACH) e águas doce naturais superficiais e subterrâneas (ADNSup e ADNSub), para avaliação da justeza do método.....	76
Tabela 31 Resultados obtidos experimentalmente para a quantificação da incerteza padrão associada à precisão.....	77
Tabela 32 Resultados obtidos através dos ensaios de recuperação efetuados de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método em três matrizes diferentes (água de consumo humano (ACH) e água doce natural superficial (ADNSup) e subterrânea (ADNSub)).	78
Tabela 33 Valores obtidos da incerteza combinada, incerteza expandida e incerteza expandida percentual, do para três matrizes diferentes (água de consumo humano (ACH) e água doce natural	

superficial (ADNSup) e subterrânea (ADNSub)).....	79
Tabela 34 Resultados obtidos através do MRC da Canada utilizado de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método.	79
Tabela 35 Valores obtidos da incerteza combinada, incerteza expandida e incerteza expandida, em percentagem, do método, para o urânio.	80
Tabela 36 Critérios de aceitação aplicados pelo Laboratório para o controlo de qualidade.	81
Tabela 37 Valores definidos em termos de amplitude (%) para os limites de controlo e aviso, tendo em vista a construção da carta de controlo de amplitudes, dos duplicados de amostra.	82
Tabela 38 Resultados dos parâmetros obtidos a partir da análise dos padrões de controlo , utilizados para a construção da carta de controlo de indivíduos.....	84
Tabela 39 Valores de concentração ($\mu\text{g U/L}$) para os limites de controlo e de aviso tendo em vista a construção da carta de controlo de indivíduos para os padrões de controlo.....	84
Tabela 40 Resultados obtidos no ensaio interlaboratorial da AQUACHECK realizados para dezoito elementos previamente implementados no Laboratório.	87
Tabela 41 Cálculos auxiliares para a determinação das incertezas associadas ao volume da micropipeta, do balão volumétrico e da incerteza combinada e expandida da concentração de uma solução padrão de urânio de 0,10012 $\mu\text{g U/L}$	99
Tabela 42 Análise de dados obtidos pelo software Qtegra.....	105
Tabela 43 Equações das curvas de calibração obtidas, ao longo do tempo, e respetivos intervalos de confiança da ordenada na origem e do declive, para 95 % de probabilidade, assim como os respetivos coeficientes de determinação (R^2).....	106
Tabela 44 Declives das curvas de calibração obtidos, ao longo do tempo, utilizados para construção da carta de controlo de declives.	107
Tabela 45 Declives das curvas de calibração obtidos, ao longo do tempo, utilizados para monitorização da carta de controlo de declives.	107
Tabela 46 Valores de concentração obtidos em amostras reais, através de ensaios de recuperação para o estudo da seletividade.....	108
Tabela 47 Resultados obtidos na leitura de dez brancos, em condições de precisão intermédia...	109
Tabela 48 Avaliação do padrão de menor concentração da curva de calibração, em condições de precisão intermédia, de forma a confirmar o LQ do método de determinação do urânio em estudo. .	109
Tabela 49 Concentrações obtidas da avaliação da precisão do método, em condições de repetibilidade.	110

Tabela 50 Concentrações obtidas da análise de três níveis de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia.....	111
Tabela 51 Concentrações obtidas, para três níveis de concentração, ao longo do tempo, para a construção das cartas de controlo.....	112

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

a	Ordenada na origem
ADN	Água Doce Natural
ACH	Água de Consumo Humano
ADNSub	Água Doce Natural Subterrânea
ANDSup	Água Doce Natural Superficial
b	Declive da reta de calibração
b_i	Desvio relativo à recuperação
b_{rms}	Valor quadrático médio dos desvios relativos dos ensaios de recuperação
C	Concentração
CC	Corrente contínua
cps	Contagens por segundo
CQ	Controlo de qualidade
CQI	Controlo de qualidade interno
CRC	Célula de reação/colisão
CV	Coefficiente de variação
CV_i	Coefficiente de variação de precisão intermédia
CV_m	Coefficiente de variação do método
CV_r	Coefficiente de variação de repetibilidade
DS²	Diferença de variâncias
EIL	Ensaio interlaboratoriais
E_n	Erro normalizado
Er	Erro relativo
ER	Ensaio de recuperação
ERSAR	Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos
ETA	Estação de Tratamento de Águas

ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
EU	União Europeia (do inglês, <i>European Union</i>)
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (do inglês, <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GFAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Câmara de Grafite (do inglês, <i>Graphite Furnance Atomic Absorption Spectrometry</i>)
GL	Graus de liberdade
ICP-AES	Espectrometria de Emissão Atômica Acoplada a Plasma Indutivo (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (do inglês, <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
IEC	Comissão Eletrotécnica Internacional (do inglês, <i>International Electrotechnical Commission</i>)
IPAC	Instituto Português de Acreditação
IPE	Investimentos e Participações do Estado
ISO	Organização Internacional de Padronização (do inglês, <i>International Organization for Standardization</i>)
k	Fator de expansão
KED	Discriminação da energia cinética (do inglês, <i>Kinetic Energy Discrimination</i>)
LA	Limite de aceitação
LAI	Limite de aceitação inferior
LAS	Limite de aceitação superior
LC	Linha central
LIA	Limite inferior de aviso
LIC	Limite inferior de controlo
LSA	Limite superior de aviso
LSC	Limite superior de controlo
LD	Limite de deteção
LQ	Limite de quantificação

MQ_b	Quadrado das médias “entre os grupos”
MQ_w	Quadrado das médias “dentro do grupo”
MRC	Material de referência certificado
MS	Espectrómetro de Massa (do inglês, <i>Mass Spectrometry</i>)
m/z	Razão massa-carga
n	Número de padrões
n_n	número de ensaios de recuperação efetuados
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Número de grupos
PCQA	Programa de Controlo da Qualidade da Água
PG	Razão entre variâncias
R	Taxa de recuperação
r	Coefficiente de Correlação
r	Limite de repetibilidade
Ref.	Referência bibliográfica
R²	Coefficiente de determinação
RF	Radiofrequência (do inglês, <i>radio frequency</i>)
S	Desvio padrão
S_a	Desvio padrão da ordenada na origem
S_b	Desvio padrão do declive
S_{between}	Desvio padrão “entre grupos”
SGQ	Sistema de Gestão da Qualidade
S_i	Desvio padrão de precisão intermédia
S_m	Desvio padrão do método
SQ_b	Quadrado da soma “entre grupos”
SQ_{tot}	Quadrado da soma total

SQ_w	Quadrado da soma “dentro do grupo”
S_r	Desvio padrão de repetibilidade
$S_{y/x}$	Desvio padrão residual
S_{y^2}	Desvio padrão residual da função quadrática
t	Parâmetro t de <i>student</i>
TOC	Carbono orgânico total (do inglês, <i>Total Organic Carbon</i>)
U	Incerteza expandida
u_{add}	Incerteza da concentração de analito adicionada
u_c	Incerteza padrão combinada
u_{conc}	Incerteza da concentração da solução utilizada para a fortificação
U_{lab}	Incerteza obtida pelo laboratório
U_{ref}	Incerteza expandida do material de referência certificado
US-EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (do inglês, <i>United States Environmental Protection Agency</i>)
u_v	Incerteza associada ao volume adicionado
v	Volume
$\bar{x}$	Média
x_{lab}	Valor obtido experimentalmente ou média aritmética dos valores obtidos
x_{ref}	Valor aceite como verdadeiro
x_s	Valor suspeito
y	Resultado instrumental obtido
$\hat{y}_i$	Sinal interpolado na reta de calibração para uma concentração
Z	Fator de desempenho <i>Z-score</i>
Δx	Variação da concentração
Δy	Variação da resposta

1

Capítulo 1

Enquadramento do trabalho

No presente capítulo é feita uma breve apresentação da empresa Águas do Norte, inserida no Grupo Águas de Portugal, empresa onde esta dissertação se desenvolveu. São também apresentados os objetivos pretendidos bem como a organização desta dissertação.

O estágio curricular no âmbito do Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química foi desenvolvido no laboratório da empresa Águas do Norte, do Grupo Águas de Portugal, localizado na ETA de Areias de Vilar, em Barcelos.

1.1. Apresentação da empresa

Em 1993, em resultado da integração de Portugal na Comunidade Económica Europeia, foi possível implementar uma gestão empresarial no abastecimento de água e no saneamento de águas residuais em Portugal. Era assim constituída a Águas de Portugal, integrada no IPE – Investimentos e Partições do Estado, com a responsabilidade do desenvolvimento dos sistemas Multimunicipais de Abastecimento de Água e Saneamento de Águas Residuais [1].

O Grupo Águas de Portugal foi criado para liderar uma gestão empresarial, com o objetivo de melhorar a qualidade da água e o nível de atendimento das populações, colocando Portugal entre os melhores desempenhos ambientais da Europa [2]. Assim, as empresas do Grupo Águas de Portugal (**Figura 1**) prestam serviços, direta ou indiretamente, em todo o território continental nos domínios do abastecimento de água e do saneamento de águas residuais [3].



Figura 1 | Empresas nacionais e internacionais integradas no Grupo Águas de Portugal [3].

A partir do Decreto-Lei n.º 93/2015, de 29 de maio, foi constituída a Águas do Norte, S.A., mediante a fusão das empresas Águas do Douro e Paiva, S.A., Águas do Noroeste, S.A., Águas de Trás-os-Montes e Alto Douro, S.A. e SIMDOURO – Saneamento do Grande Porto, S.A., integradas no Grupo Águas de Portugal. Em sequência, foi-lhe atribuída, pelo Estado Português, a concessão da exploração e da gestão do Sistema Multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento do Norte de Portugal [4,5].

Contudo, com o Decreto-Lei n.º 16/2017, de 1 de fevereiro de 2017, ocorre a criação do sistema multimunicipal de abastecimento de água do sul do Grande Porto e o sistema multimunicipal de saneamento do Grande Porto, ambos por cisão do sistema multimunicipal de abastecimento de água e de saneamento do Norte de Portugal, e as respetivas entidades gestoras, respetivamente, Águas do Douro e Paiva, S.A. e SIMDOURO – Saneamento do Grande Porto, S.A [4,6]. A **Figura 2** mostra os municípios cujo abastecimento de água e o saneamento é efetuado pela Águas do Norte, S.A..

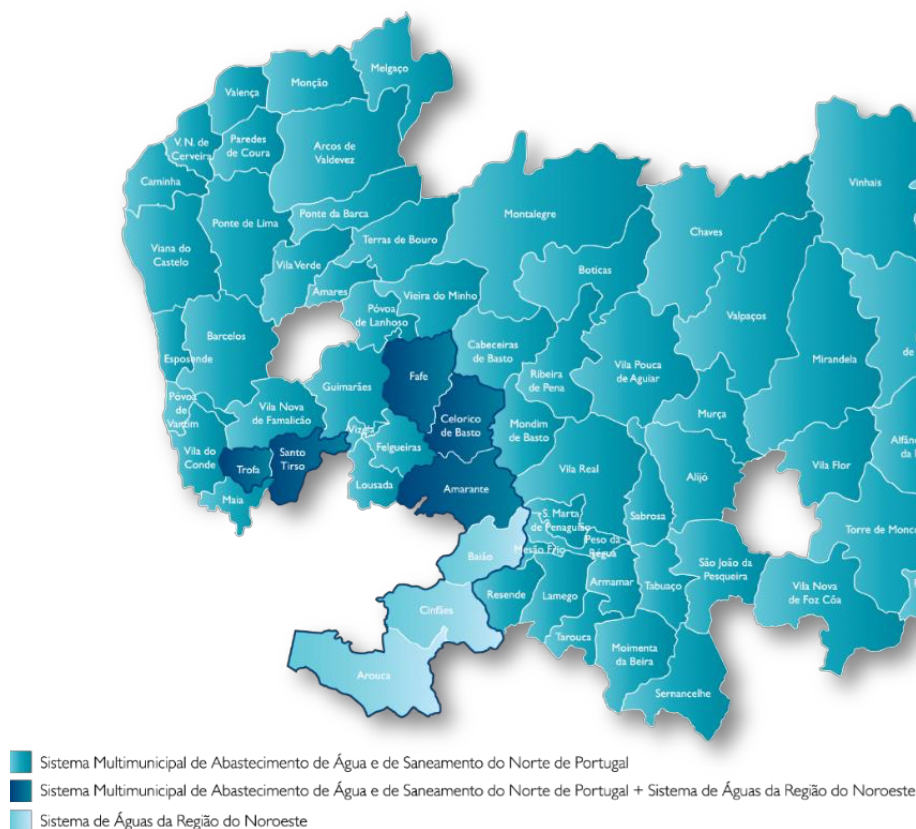


Figura 2 | Mapa do sistema multimunicipal de abastecimento de água e saneamento do norte de Portugal, efetuado pela Águas do Norte, S.A. [4].

Atualmente, a sede da Águas do Norte, S.A. localiza-se em Vila Real e os Polos situam-se em Barcelos e em Guimarães, possuindo algumas instalações dispersas pela região, contando com aproximadamente 600 colaboradores.

A Águas do Norte é a entidade gestora do sistema multimunicipal em “alta” responsável pela captação, tratamento e abastecimento de água para consumo público e também pela recolha, tratamento e rejeição de efluentes domésticos, urbanos e industriais provenientes de fossas sépticas. A empresa tem como funções também a exploração e gestão do sistema de águas da região do Noroeste, que resulta da celebração de uma Parceria entre o Estado (Administração Central) e os Municípios (Administração Local) de Amarante, Arouca, Baião, Celorico de Basto, Cinfães, Fafe, Santo Tirso e Trofa, sendo que esta Parceria concretiza um processo de verticalização que reuniu, numa única entidade gestora, em regime de exclusivo, os serviços de abastecimento de água e de saneamento de águas residuais em “alta” (prestados pelos Municípios) e em “baixa” (prestados aos utilizadores finais, os munícipes), de forma regular, continua e eficiente [4]. Ou seja, a designação “alta” implica a captação, tratamento e venda a outra entidade gestora e, diz respeito aos 63 municípios. Dentro dos 63 municípios existem 8 municípios que dizem respeito à designação “baixa” e implica a venda direta ao consumidor

1.2. Laboratório da Águas do Norte, S.A.

O Laboratório da Águas do Norte, S.A., local onde foi realizado o presente trabalho, é constituído por duas Unidades Laboratoriais, sendo estas na ETA de Areias de Vilar, sita em Barcelos (local onde se realizou o estágio) e na ETAR de Vila Real, sita em Vila Real. Este tem como missão prestar um serviço público de controlo sistemático da qualidade da água, no âmbito do abastecimento e do saneamento transmitindo segurança e fiabilidade aos processos de tratamento de água, de forma a satisfazer as exigências de qualidade e expectativas dos Clientes [7].

O Laboratório da Águas do Norte, S.A. bem como a sua Gestão, de modo a assegurar a total confiança nos serviços prestados aos seus Clientes, compromete-se a cumprir integralmente todos os requisitos da norma NP EN ISO/IEC 17025:2018 “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração” [8] e a melhorar continuamente a eficácia do Sistema de Gestão.

A principal atividade do Laboratório da Águas do Norte consiste na gestão do controlo analítico, quer dos sistemas de abastecimento de água para consumo humano, quer dos sistemas de tratamento de águas residuais. É da sua responsabilidade monitorizar a água para consumo humano, fornecida pelas Águas do Norte, a água natural doce (superficial e subterrânea) das captações, a água proveniente

das diversas etapas de tratamento das ETA e ETAR e a água residual devolvida ao meio hídrico, após tratamento [7].

Com o objetivo de assegurar o controlo da qualidade da água abastecida, no início de cada ano civil, a empresa dispõe de um Programa de Controlo da Qualidade da Água, designado PCQA, dirigida às águas de consumo humano que dá cumprimento aos parâmetros e às frequências apresentadas no Decreto-Lei n.º 69/2023, de 21 de agosto de 2023 [9,10].

As competências são reconhecidas pelo IPAC – Instituto Português de Acreditação no Anexo Técnico de Acreditação nº L0328, acessível no site www.ipac.pt. A acreditação do Laboratório Águas do Norte abrange ainda a colheita, preservação e transporte de amostras de água para consumo humano e águas naturais destinadas à produção de águas de consumo humano [7]. Além de estar presente na lista das empresas do IPAC, o Laboratório de Águas do Norte faz parte, também, da lista emitida pela Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos, ERSAR, de laboratórios aptos no âmbito da legislação acima referida [10].

O Laboratório da Águas do Norte em complemento à sua principal atividade, anteriormente referida, presta ainda apoio ao Cliente em outros serviços fora do âmbito de Acreditação, nomeadamente, a verificação interna de equipamentos analíticos, preparação de soluções químicas, formação, consultoria e auditorias a laboratórios.

1.3. Objetivos

Este trabalho tem como finalidade adquirir competências no âmbito da implementação e validação do método de determinação do urânio por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS) em matrizes de águas de consumo humano e águas doce natural. Concretamente, este trabalho teve as seguintes atividades:

- Estudo de interferências espectrais e não espectrais;
- Seleção do padrão interno;
- Escolha da gama de trabalho;
- Estudo da linearidade;
- Determinação dos limites analíticos para verificar o cumprimento da atual Legislação;
- Estudo da seletividade/especificidade;
- Determinação da precisão em diversas condições;
- Avaliação da exatidão recorrendo a diversas metodologias;

- Estimativa da incerteza do método.

Neste contexto, os objetivos consistiram em adquirir conhecimentos e experiência prática sobre análises por ICP-MS e elaborar os processos de implementação e de validação do método, com vista à acreditação deste. Como tal foi imprescindível a pesquisa bibliográfica, incluindo documentos internos do Laboratório.

1.4. Organização da dissertação

O presente trabalho encontra-se organizado em seis capítulos. No primeiro capítulo é feito o enquadramento do trabalho, onde é apresentada a empresa onde decorreu o estágio e são especificados os objetivos do trabalho.

No segundo capítulo são apresentados os conteúdos necessários para o desenvolvimento e compreensão do trabalho realizado, nomeadamente aspetos relacionados sobre a água (água superficial e água subterrânea) e sobre o urânio, funcionamento da técnica ICP-MS e a importância da validação de métodos analíticos como forma de garantir a qualidade dos resultados obtidos.

No capítulo três é abordada a metodologia experimental utilizada ao longo do trabalho. Já no capítulo quatro são apresentados os resultados obtidos e a sua discussão.

No quinto capítulo encontram-se resumidas as principais conclusões deste trabalho e por último é apresentada a listagem da bibliografia consultada durante a realização deste trabalho.

Em anexo é sucintamente apresentado alguns resultados complementares obtidos durante a validação do método avaliado durante o período de estágio.

2

Capítulo 2

Introdução

Neste capítulo apresenta-se uma análise sobre a relevância das águas, assim como uma revisão bibliográfica sobre o analito estudado nesta dissertação, o urânio. São também abordadas várias técnicas espectrométricas para a determinação de urânio, dando destaque à Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS), técnica utilizada para as análises realizadas.

Este capítulo conta ainda uma secção sobre validação de métodos analíticos.

2.1. Água

A água constitui um bem essencial à vida, apresentando-se como um recurso indispensável à sobrevivência da biosfera, e, portanto, do Homem e de todas as outras espécies a ele associadas, com as quais, de uma forma ou de outra, ele convive [11].

Sem água, o planeta que conhecemos seria bastante diferente, e seria incomportável haver vida na Terra. A água faz parte do corpo humano, sendo que tem um volume de cerca de 70 % da nossa constituição, e a redução desse volume leva a graves problemas de equilíbrio fisiológico, sendo até possível a morte [12,13].

Tem propriedades que lhe são únicas, é incolor, inodora, pode ser encontrada na Natureza em três estados físicos, sólido, líquido e gasoso, é um bom solvente, entre outras, que a diferenciam da maioria dos outros líquidos. A disponibilidade de água é fundamental para o bem-estar do Mundo, sendo o ciclo da água o motor de toda a vida na Terra [13].

Cerca de 70 % da superfície terrestre esta coberta de água no estado líquido encontrando-se sobretudo nos oceanos e apenas uma pequena parte nos continentes e na atmosfera. Cerca de 97,5 % da água é salgada e, por isso, imprópria para consumo e dos 2,5 % de água doce a grande maioria encontra-se no estado sólido, nos glaciares e calotes polares do Ártico e Antártico e em águas subterrâneas [14], como mostra a **Figura 3**.

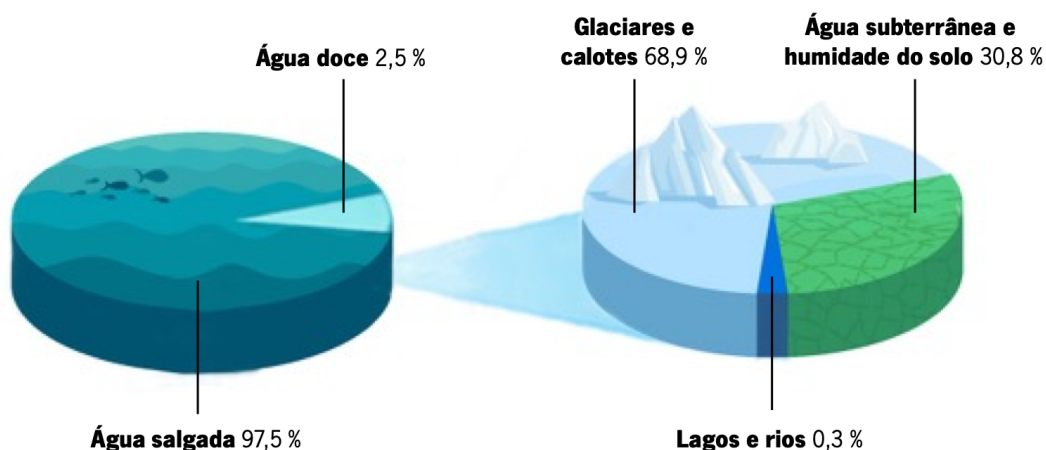


Figura 3 | Distribuição global da água no planeta Terra.

Relativamente à água doce, como já referido, esta encontra-se sob a forma de glaciares e calotes (68,9 %), águas subterrâneas (29,9 %), umidade do solo e atmosfera (0,9 %) e em lagos e rios (0,3 %) [14].

Atendendo que cerca de 70 % da água doce encontra-se num estado em que não é possível a

sua utilização, pelo menos a curto e médio prazo, as águas utilizáveis constituem um ínfima parte da água doce, aumentando assim a necessidade de conservação destas [15].

A gestão cuidada e rigorosa da interferência humana no ciclo hidrológico é fulcral para assegurar o futuro da própria humanidade. A quantidade de água disponível, desde que bem monitorizada, é globalmente suficiente para qualquer cenário de crescimento demográfico, mas para que a água não seja um fator limitante do desenvolvimento, e mesmo, de sobrevivência em vastas zonas do mundo, é essencial que seja bem gerida, certamente melhor do que o momento atual, e num contexto adverso de alterações climáticas [16,17].

A água destinada ao consumo humano encontra-se definida como: “Toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos, à higiene pessoal ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser fornecida a partir de uma rede de distribuição, de um camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais; Toda a água utilizada numa empresa da indústria alimentar para fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinados ao consumo humano, assim como a utilizada na limpeza de superfícies, objetos e materiais que podem estar em contacto com os alimentos, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada” [9,18].

De acordo com o Relatório do Estado do Ambiente de 2020/21, 69,41 % da água que os portugueses consomem teve origem superficial (69,25 % em 2019 e 72,65 % em 2017) e 30,59 % teve origem subterrânea (30,75 % em 2019 e 27,35 % em 2017) [19].

O controlo de qualidade da água é essencial tendo em vista dois objetivos principais, comprovar o nível de qualidade da água aliado ao cumprimento da legislação em vigor através da manutenção de um controlo operacional que permita detetar possíveis anomalias na qualidade da água, ocasionais ou de carácter sistemático, de modo a permitir que sejam postas em prática medidas preventivas/corretivas eficazes [9,18].

Tendo em vista um controlo de qualidade da água mais eficiente e rigoroso, é efetuada a avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, através de análises específicas e sucessiva avaliação dos respetivos valores paramétricos. A água para consumo humano exige uma contínua monitorização do controlo de qualidade, com base nas análises que garantam conformidade entre o tratamento/distribuição e os objetivos/regulamentos previstos, sendo que esta é caracterizada pelo conjunto de valores de parâmetros microbiológicos e físico-químicos fixados nas partes A, B e C do anexo I do Decreto-Lei n.º 69/2023. Estas análises devem ser realizadas periodicamente em laboratórios

acreditados e especializados [9,12].

A água pode ser classificada tendo em conta a sua origem de captação, sendo assim, classificam-se em águas superficiais ou águas subterrâneas.

2.1.1. Águas superficiais

As águas superficiais são, por exemplo, as águas que se encontram nos rios, albufeiras e lagos que apresentam características normais de águas à superfície como turvação, por ter materiais em suspensão, carga orgânica, baixo teor de sais dissolvidos [9].

Estas águas não penetram no solo e ao acumularem-se na superfície da Terra, são escoadas pelas chuvas ou pela ressurgência/reaparecimento das águas subterrâneas formando rios, lagos, lagoas, pântanos, entre outros. O oceano apesar de ser composto por água salgada, também é considerado água de superfície [20].

A monitorização da água superficial do planeta pode ser realizada utilizando medições de superfície, isto é, as taxas de fluxo dos riachos são medidas calculando a descarga (a quantidade de água que se move pelo riacho por unidade de tempo) em vários pontos ao longo do mesmo. Este tipo de monitorização é importante, uma vez que ajuda na determinação do impacto das atividades humanas e das mudanças climáticas na disponibilidade de águas superficiais. Outro tipo de monitorização é o recurso a imagens por satélite. Por outro lado, é essencial manter o controlo da vegetação ao redor dos corpos de água de superfície. A perda da vegetação, quer por fatores naturais, como incêndios, quer pela atividade humana, como desflorestação, pode ter um impacto negativo nas águas superficiais. Além disso, pode levar ao aumento de escoamento superficial e à erosão contribuindo assim para o risco de inundações [21].

As águas superficiais participam do ciclo hidrológico, sustentam os sistemas ecológicos, fornecem habitat para muitas espécies de plantas e animais e são consideradas umas das principais fontes de abastecimento de água potável do planeta [20]. Também são utilizadas para irrigação, tratamento de águas residuais, fins industriais, atividades pecuárias e produção de energia hidrelétrica [22].

2.1.2. Águas subterrâneas

No caso das águas subterrâneas como lençóis subterrâneos, fissuras em terrenos e furos, apresentam características distintas como a dureza (que as classificam como duras em solos calcários

ou macias em solos graníticos). Além disso são límpidas, uma vez que são filtradas pelas camadas terrestres, podendo possuir elementos químicos dissolvidos com diferentes graus de nocividade.

As águas subterrâneas podem ainda ser classificadas de acordo com o tipo de solos pelos quais passam. As águas originárias de solos calcários, típicos da região Sul de Portugal e também de Leiria apresentam dureza média/alta, alcalinidade e mineralização. Já as águas provenientes de solos graníticos, típicos do Norte do país apresentam baixa mineralização (sendo consideradas águas macias), baixa condutividade e elevada acidez, podendo também conter alguns materiais dissolvidos como o ferro, (frequentemente nos solos xistosos), manganês, nitrato, entre outros [23].

É do conhecimento público que as águas subterrâneas fornecem uma maior qualidade a nível microbiológico comparadas com as águas superficiais [24].

A água subterrânea é um recurso natural imprescindível para a vida e para a integridade dos ecossistemas que estão delas dependentes, representando as massas de águas doce mais sensíveis e importantes da União Europeia [23,25]. Assim, a mesma revela-se como uma fonte crucial de abastecimento público da água potável em diversas regiões, devendo ser protegida de modo a evitar a deterioração da qualidade, a fim de reduzir o nível do tratamento de purificação necessário à produção de água potável [25].

2.2. Urânio

Em 1789, Martin Klaproth descobriu um elemento químico perto de Freiberg, na Alemanha, que mudaria para sempre a história da humanidade. No momento da descoberta, o elemento estava na forma de óxido de urânio, contudo acreditou-se que o metal estava na sua forma isolada e foi dado o nome de urânio [26].

O urânio é um elemento químico muito importante do ponto de vista comercial e tecnológico. Este metal pertence à série dos actínídeos e está situado no sétimo período da tabela periódica, sendo o último elemento natural da classificação periódica [26,27].

O urânio é largamente difundido na crosta terrestre, sendo mais abundante que o ouro, a prata, o mercúrio, o antimónio ou o cádmio. Encontra-se presente em diversos tipos de rochas, solos, sedimentos, águas superficiais e subterrâneas [28]. No entanto, geralmente ocorre em concentrações baixas.

2.2.1. Propriedades físicas, químicas e radiológicas

O urânio é representado pelo símbolo U, apresenta número atômico 92 e dentro dos elementos de ocorrência natural é o que apresenta maior massa atômica [29]. As principais propriedades do urânio estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1 | Principais propriedades físicas e químicas do urânio [29,30].

Propriedades	
Símbolo	U
Número atômico	92
Massa atômica (u)	238,029
Configuração eletrônica	[Rn], 5f ³ , 6d ¹ , 7s ²
Ponto de fusão (°C)	1135
Ponto de ebulição (°C)	4131
Densidade (g.mL⁻¹)	18,9
1ª energia de ionização (kJ.mol⁻¹)	597,6

O urânio pode ser encontrado em seis estados de oxidação. Quando está no estado tetravalente, o urânio é relativamente estável e está geralmente associado a hidróxidos, fosfatos e fluoretos. No estado hexavalente, o urânio apresenta um comportamento mais estável e, em geral, encontra-se dissolvido em água [28,29].

No meio ambiente, o urânio ocorre naturalmente como três isótopos radioativos, o ²³⁴U, ²³⁵U e ²³⁸U [29,31]. No entanto, outros isótopos podem ser sintetizados pelo homem em laboratório, reatores de pesquisa e aceleradores de partículas [32]. Os isótopos naturais do urânio com as respectivas massas atômicas, abundâncias isotópicas e meias vidas estão apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 | Propriedades dos isótopos de urânio [29,33].

Isótopo	Massa atômica (u)	Abundância (%)	Meia vida (anos)
²³⁴ U	234,0410	0,005	2,45 × 10 ⁵
²³⁵ U	235,0439	0,711	7,04 × 10 ⁸
²³⁸ U	238,0289	99,283	4,47 × 10 ⁹

Todos os isótopos de urânio sofrem as mesmas reações químicas e apresentam propriedades físicas quase idênticas. Contudo, as propriedades radioativas como tempo de meia vida, atividade específica e modo de decaimento, são diferentes. O processo de decaimento destes isótopos conduz isótopos estáveis (não radioativos) tais como o ^{206}Pb , no caso do ^{234}U e do ^{238}U e ^{207}Pb para o ^{235}U [34].

2.2.2. Toxicidade

A exposição humana ao urânio tem sido há muito considerada um risco radiológico para a saúde, embora existam poucos estudos epidemiológicos capazes de demonstrar os danos resultantes, mesmo em contextos ocupacionais [28]. Contudo, acredita-se que o maior problema esta relacionado com a toxicidade química e, por isso, tem havido uma preocupação crescente de que os efeitos químicos do urânio representem um risco à saúde das populações expostas, assim como acontece com outros metais [35]. Quanto mais solúvel for o composto de urânio, mais tóxico ele se torna. Nos compostos insolúveis os efeitos radiológicos prevalecem [28,36].

A água potável é considerada a responsável por cerca de 70 % da absorção de urânio em uma dieta humana padrão. No corpo humano, o urânio tende a concentrar-se em locais específicos e, devido à sua radioatividade, pode aumentar os riscos de doenças no sangue e rins, e o desenvolvimento de cancro nos ossos [28,37].

Os rins são considerados os principais alvos da toxicidade química do urânio em seres humanos, o que pode levar ao aumento da probabilidade de danos na estrutura destes órgãos, podendo conduzir a insuficiência renal aguda. Estudos mais recentes mostraram uma forte relação entre o urânio presente na urina e o urânio presente na água potável proveniente de poços [28,38]. Não há evidências de que urânio seja essencial para os seres humanos [28].

Estudos em animais mostraram que a ingestão de água contaminada com urânio afeta o metabolismo dos ossos. Além disso, o urânio substitui o cálcio e o fosfato dos ossos aumentando a excreção urinária destes elementos, que são importantes componentes na estrutura dos ossos. A fácil incorporação do urânio nos ossos ocorre devido à distribuição deste elemento no esqueleto ser similar à do cálcio [28,39].

Os radionuclídeos, como o urânio, representam uma importante classe de poluentes inorgânicos, cuja quantificação é necessária tanto no presente como no futuro. As amostras ambientais (água, solos, sedimentos), bem como fertilizantes e resíduos industriais são exemplos onde a contaminação por urânio pode causar sérios problemas para o homem e para o meio ambiente [40].

2.2.3. Legislação

Devido à elevada toxicidade química e radiológica do urânio, tornou-se importante estabelecer leis para controlar as emissões deste metal no ambiente, assim como o teor de urânio em diversas matrizes, como alimentos e sistemas aquáticos.

Muitos órgãos reguladores e agências de saúde estão preocupados com a quantidade de urânio presente em águas destinadas ao consumo humano e em diversos tipos de alimentos. Por esse motivo, solicitam a determinação desse elemento em várias matrizes, resultando em uma ampla variação nos limites e diretrizes impostas para o urânio na água potável, desde 2 µg/L no Japão até 1700 µg/L na Rússia [41]. As diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS, 1993) para a qualidade da água potável reconheceram o urânio como um potencial perigo químico, mas concluíram que estudos insuficientes estavam disponíveis na época para derivar um valor de referência realista. As edições seguintes das diretrizes produziram valores provisórios que foram revisados após o aumento das evidências toxicológicas. A quarta edição, incorporando o primeiro adendo (2017) recomendou um valor de referência provisório de 30 µg/L [42]. Tanto a Diretiva (UE) 2020/2184 para urânio nas águas de consumo humano [18] quanto o nível máximo de contaminante da US-EPA para urânio em águas potáveis [43] estão atualmente definidos em 30 µg/L, embora a Diretiva da UE só tenha entrado em vigor em 2021, com dois anos para os Estados-Membros transporem para a legislação nacional.

No dia 21 de agosto de 2023 foi publicado no Diário da República o Decreto-Lei n.º 69/2023, onde estabelece-se o regime jurídico da qualidade da água destinada ao consumo humano, que já inclui o urânio na lista dos parâmetros químicos, no Anexo I – Parte B [44].

Relativamente à legislação relacionada com o controlo da qualidade para águas de consumo humano, o Laboratório onde este trabalho foi realizado, para o caso do urânio regeu-se pela Diretiva (EU) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, datada de 16 de dezembro de 2020, e pelo Decreto-Lei n.º 69/2023, de 21 de agosto de 2023, em que ambos estabelecem um valor paramétrico para o urânio de 30 µg U/L [9,18].

2.3. Técnicas espectrométricas para determinação de urânio

A determinação de metais em diferentes matrizes de águas pode ser efetuada com recurso a várias técnicas, como a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS) [45,46], com Câmara de Grafite (GFAAS) [46,47], Espectrometria de Emissão Atômica Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-AES) [46,48] e Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS) [46,49,50].

Quando se pretende escolher a técnica mais indicada a uma determinada análise, a escolha deve ter em atenção fatores como a capacidade de deteção, facilidade do uso, velocidade de análise e o custo da mesma [51,52].

2.3.1. Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo

Os primeiros equipamentos de Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS) foram comercializados em 1983, sendo que, atualmente, o ICP-MS é uma das técnicas analíticas mais sensíveis e vantajosas na análise elementar numa ampla gama de matrizes [53,54].

Esta técnica, para além de conseguir determinar concentrações na gama dos ppt, permite também analisar simultaneamente, aproximadamente, 70 elementos, bem como os isótopos individuais destes elementos que estejam presentes na amostra em análise [53]. Além de apresentar baixos limites de deteção para uma grande parte dos elementos, destaca-se por possuir um elevado grau de seletividade que permite obter uma resposta única para o elemento em estudo bem como uma excelente precisão e justeza [55].

Esta técnica possui aplicações em diversas áreas, incluindo análise de águas e efluentes, materiais geológicos, indústrias alimentar e farmacêutica, além de ser utilizada na área da medicina, em análises clínicas e biológicas como sangue e urina, e também em medicina forense. Entre as aplicações mais relevantes desta técnica, destacam-se os campos da geologia e aplicações nucleares, onde é fundamental para o cálculo de razões isotópicas, permitindo a determinação simultânea dos diferentes isótopos de um elemento [49,53,54].

O ICP-MS pode, teoricamente, ser dividido em seis partes, sendo elas: o sistema de introdução das amostras, a região da formação do plasma (tocha), a zona da interface, o sistema de lentes, o analisador de massa e o detetor [46,49]. Na **Figura 4** mostra um diagrama simples do equipamento.

O método consiste na introdução da amostra a analisar, por ação de uma bomba peristáltica, formando-se um aerossol e, em seguida, este é transferido para um plasma de argón. Os processos de transferência de energia causam a dissolução, a atomização e a ionização dos elementos presentes na amostra. A extração dos iões do plasma é feita através de uma interface em vácuo com um sistema lentes integrado e, em seguida, os iões são separados com base na razão massa-carga (m/z) por um espectrómetro de massa, e por fim os iões são medidos pelo detetor [56].

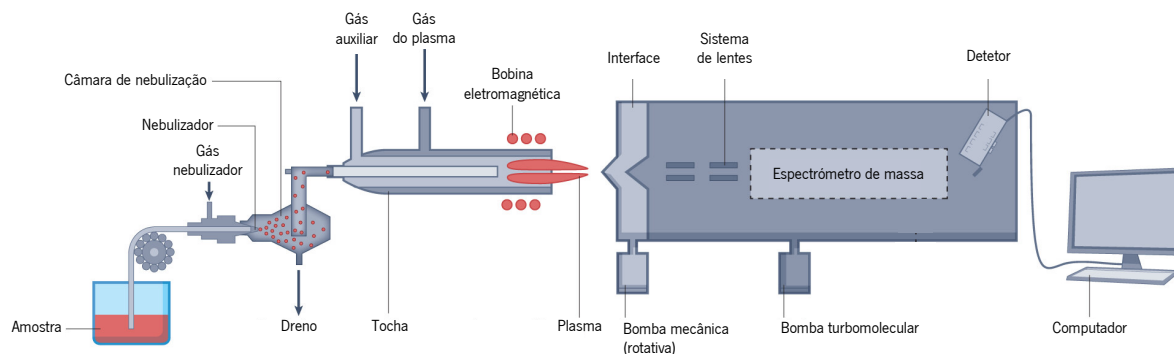


Figura 4 | Representação esquemática do sistema de um ICP-MS (adaptada de [49]).

2.3.2. Princípio de funcionamento da técnica

Sistema de introdução da amostra

O sistema de introdução da amostra de um ICP-MS é constituído pelo amostrador automático, uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de nebulização. Assim, a bomba peristáltica bombeia a solução em direção ao sistema de introdução da amostra, permitindo também o controlo do fluxo da solução. Seguidamente, a solução da amostra passa no nebulizador, neste caso um nebulizador concêntrico, onde é convertida num aerossol com recurso a um fluxo de árgon, denominado gás nebulizador, ou também conhecido por gás de arraste [46,56].

O aerossol aqui formado passa através de uma câmara de nebulização, onde as gotículas são separadas de acordo com as suas dimensões, sendo as maiores removidas através da colisão com as paredes da câmara de nebulização. O excesso de solução que se forma na câmara de nebulização é removido pelo dreno, evitando que esta fique cheia [46,57].

Nesta fase do processo é também utilizado um refrigerador, que permite arrefecer a câmara de nebulização, levando a um controlo preciso da temperatura dentro da mesma, e consequentemente à obtenção de sinal mais estável. Ao resfriar a câmara de nebulização, o vapor de água formado vai condensar, reduzindo assim a quantidade de água no plasma. Isso resulta em uma redução na formação de iões poliatômicos (óxidos) [58].

Formação do plasma

O sistema de formação do plasma possui dois componentes, a tocha e a bobina eletromagnética, geradora de radiofrequências [59].

A tocha é composta por três tubos concêntricos de quartzo, o tubo externo, o tubo intermédio e o tubo injetor, através dos quais fluem um gás, o árgon, mas com funções e fluxos distintos [46,59].

O gás utilizado para a formação do plasma circula dentro do tubo externo, a um fluxo de 12 – 17 L.min⁻¹. O gás auxiliar passa no tubo intermédio a aproximadamente 1 L.min⁻¹, tem como funções a redução da temperatura do tubo injetor e o aumento da separação entre a tocha e plasma. Por último, o gás nebulizador transporta a amostra em forma de aerossol num fluxo de aproximadamente 1 L.min⁻¹ [59].

O árgon é o gás de eleição para este processo devido à sua resistência elétrica para dissipação de energia, condutividade térmica adequada para transmitir calor da região exterior do plasma para o interior, alta densidade eletrónica ($1,3 \times 10^{15} \text{ e.cm}^{-3}$), robustez do plasma e custo aceitável. A alta energia disponível de árgon (aproximadamente, 1520,6 kJ.mol⁻¹) permite ionizar a maior parte dos elementos da tabela periódica, uma vez que a maioria possui energias de ionização de 385,0 a 1156,0 kJ.mol⁻¹ [60].

A bobina eletromagnética produz uma radiofrequência alternada, entre 27 e 56 MHz que promove a criação de um campo eletromagnético intenso no “topo” da tocha. Enquanto o gás que forma o plasma flui através da tocha, aplica-se uma faísca de alta voltagem, o que causa a dissociação de alguns eletrões dos átomos de árgon. Estes são acelerados pelo campo magnético colidindo com outros átomos de árgon, numa reação em cadeia que provoca a ionização do gás, formando um plasma de altas temperaturas (6000 a 10000 K). O plasma é mantido pela contínua transferência de energia por parte da bobina [46].

O aerossol previamente gerado na câmara de nebulização, sai do tubo injetor com grande velocidade, atravessando o centro da descarga do plasma, de seguida, atravessa várias zonas de aquecimento, ilustradas na **Figura 5**, onde sofre algumas alterações físicas.

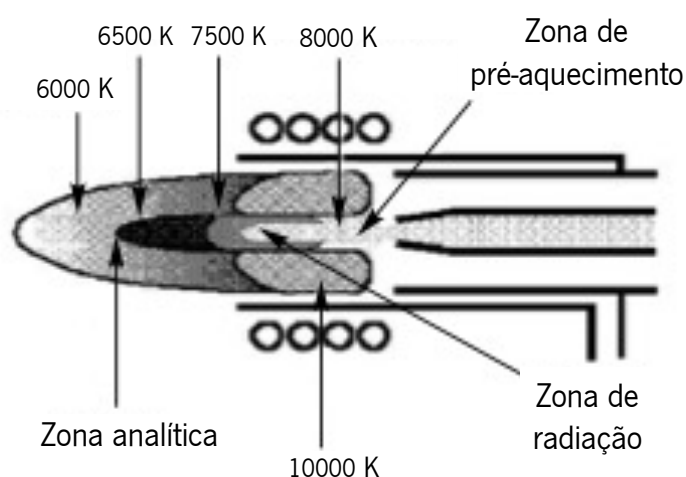


Figura 5 | Representação esquemática das diferentes zonas de temperatura no plasma (adaptada de [61]).

Na zona de pré-aquecimento sofre dessolvatação e vaporização, na zona de radiação ocorre a atomização e, finalmente, na zona analítica a ionização através da colisão com os elétrons do gás. Os íons da amostra são depois dirigidos em feixe para a região da interface [46,56].

Região da interface entre o ICP e espectrômetro de massa e sistema de lentes

Os íons formados na tocha devem ser transportados de forma eficiente e mantendo a sua integridade elétrica, desde o plasma, que se encontra à pressão atmosférica (760 Torr), até à região analítica do espectrômetro de massa, no vácuo (10^{-8} Torr) [56].

A região da interface contém dois cones, geralmente de níquel, o *sampler cone* e o *skimmer cone*. O vácuo é mantido com o auxílio de uma bomba mecânica e uma bomba turbomolecular. Cada um dos cones possui um pequeno orifício que permite a passagem dos íons para um sistema de lentes eletrostáticas [56]. A região da interface é arrefecida por água e constituída por um material que dissipa o calor facilmente, como o cobre ou o alumínio [46].

Dado que os processos de atomização/ionização ocorrem à pressão atmosférica, a interface torna-se crucial no processo de criação de um ambiente de vácuo para o espectrômetro de massa.

A **Figura 6** mostra um esquema representativo da zona da interface de um ICP-MS.

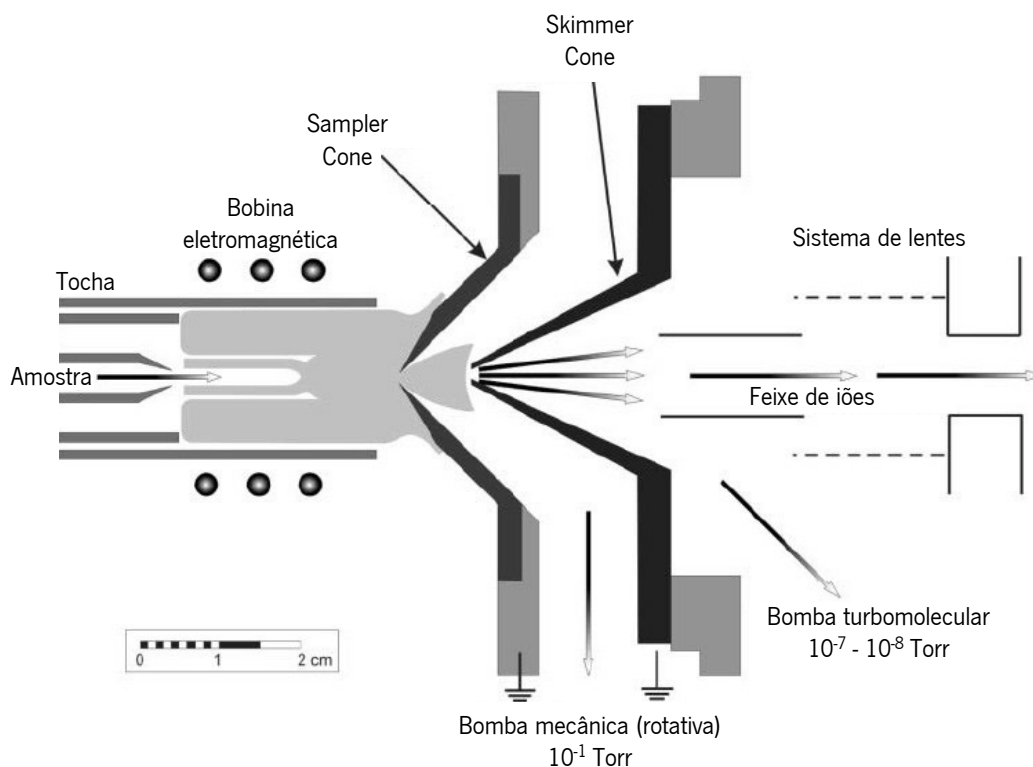


Figura 6 | Representação esquemática da seção transversal da região da interface entre o ICP e o espectrômetro de massa (adaptada de [60]).

Os iões formados são direcionados para a zona da interface, onde atravessam o *sampler cone*. Uma bomba mecânica é usada para manter uma pressão entre cones, de aproximadamente, 10^{-1} Torr. À medida que os iões entram nesta região da interface, a redução de pressão causa uma expansão do feixe de iões. Os iões são, posteriormente, extraídos através do *skimmer cone* e na câmara de vácuo principal que é mantida sob alto vácuo (10^{-8} Torr) por uma bomba turbomolecular. A essa pressão os iões podem ser guiados para o sistema de lentes, sendo que o principal objetivo dessas lentes é guiar o feixe de iões em direção ao analisador de massa e impedir que fotões e outras espécies neutras, como espécies de matriz não ionizada, cheguem ao detetor [46,56,57].

Análise de massa (Espectrómetro de massa (MS))

Existem vários tipos de dispositivos de separação de massa, sendo o mais comum e o utilizado pelo ICP-MS neste trabalho, o quadrupolo. Este tipo de dispositivo consiste em quatro hastes cilíndricas de metal, paralelas, de aço inoxidável ou molibdénio, um par com um determinado potencial de radiofrequência (RF) e o outro com uma corrente contínua (CC) [46,62]. O quadrupolo atua como um filtro de massa de iões, em que apenas aqueles que possuem um valor de m/z dentro de uma certa gama poderão atravessar o quadrupolo em direção ao detetor. Os restantes, com valores inferiores ou superiores, ficam com a trajetória alterada e atingem as hastes, sendo neutralizados. Durante uma análise multielementar este processo repete-se sucessivamente para cada analito com o respetivo ajuste RF/CC consoante a razão m/z que se deseja separar [46,56].

Detetor

O sistema de deteção consiste num elétrodo (dínodo de conversão), num multiplicador de eletrões e num pré-amplificador. Os iões são submetidos à uma voltagem negativa, colidindo com o primeiro dínodo e libertando eletrões. Estes, por sua vez, colidem com os dínodos do multiplicador, duplicando sucessivamente a sua quantidade. Por fim, obtém-se uma corrente de eletrões, que corresponde aproximadamente 10^8 eletrões por cada ião (**Figura 7**). Desta forma, um multiplicador de eletrões pode gerar um sinal mensurável a partir do impacto de um único ião no detetor, conferindo um sensibilidade muito elevada [46,54].

A corrente de eletrões formada é depois processada e convertida em contagens de sinal elétrico ou concentração por um software próprio, usando padrões de calibração como referência para a sua quantificação. Deve ter-se em conta o sinal de ruído, normalmente causado por fotões que atingem o detetor apesar das medidas tomadas [57].

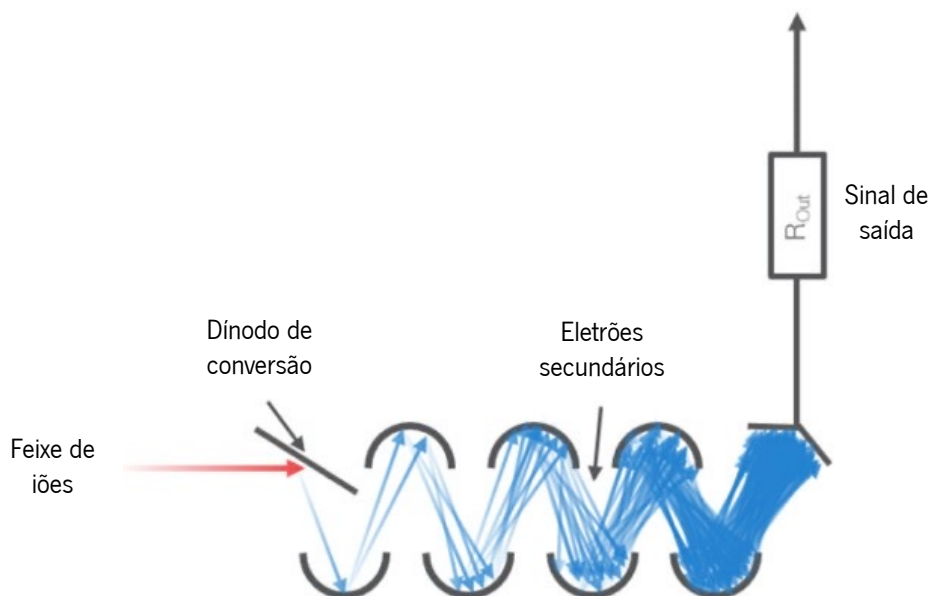


Figura 7 | Representação esquemática de um dinodo multiplicador de elétrons (adaptada de [59]).

O sistema de detecção efetua contagens de dois modos distintos, o analógico e o *pulse-counting*. Normalmente, o modo *pulse-counting* (contagens digital) é utilizado porque permite uma detecção de alta sensibilidade para elementos em baixa quantidade. No entanto, quando o sinal é demasiado intenso, o modo analógico é automaticamente preterido em relação ao modo de *pulse-counting*, de forma a evitar danos no detetor. O modo analógico consiste na diminuição do fator de multiplicação dos elétrons, que se pode alcançar diminuindo o potencial do detetor ou recolher apenas parte dos elétrons gerados [46]. Uma vez, que a técnica ICP-MS é uma técnica multielementar, a utilização dos dois modos permite a medição de concentrações baixas e altas na mesma amostra.

O tempo de vida de um detetor corresponde a um ou dois anos, sendo que, durante este período a sensibilidade do detetor diminui lentamente e a voltagem tem de ser aumentada periodicamente de forma a recuperar a sensibilidade original [56].

2.3.3. Interferências

Subjacente à técnica de ICP-MS existem várias causas de interferências, que se não forem corrigidas induzem em erro a análise dos metais. As interferências podem ser espectrais ou não espectrais, sendo que dentro destes dois grupos existem interferências específicas [46,53], como mostra a **Figura 8**.

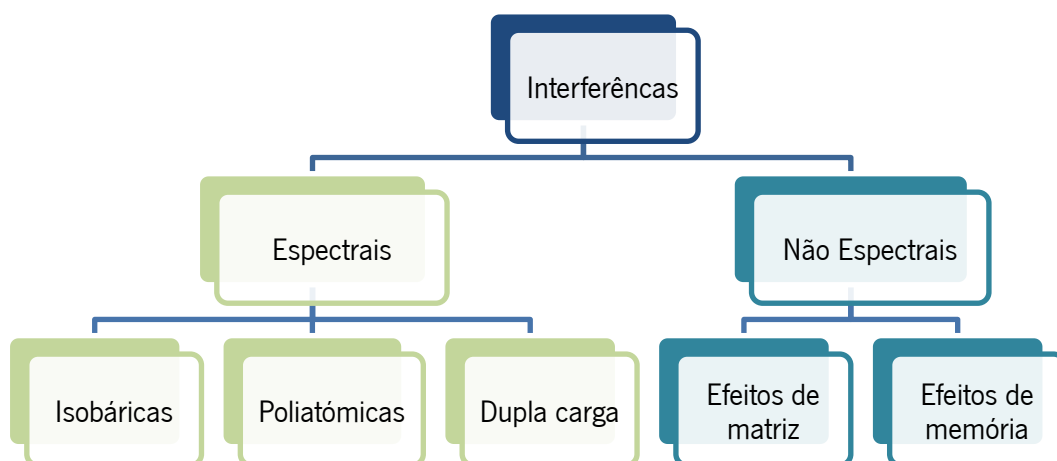


Figura 8 | Esquema representativos dos vários tipos de interferências em ICP-MS [46,57].

2.3.3.1. Interferências espectrais

As interferências espectrais podem ser classificadas em três tipos: isobáricas, poliatômicas ou resultantes de duplas cargas.

Quando elementos diferentes possuem isótopos com a mesma razão m/z , ocorrem interferências espectrais isobáricas. Por exemplo, o vanádio possui isótopos com massas 50 e 51 u. Entretanto, devido a outro tipo de interferência só deve ser considerada a massa 51, que não coincide com os isótopos de titânio e crômio. Quando tal não é possível, pode-se utilizar uma correção matemática com base na relação entre a abundância relativa dos interferentes e a abundância relativa do analito. Contudo os equipamentos mais modernos já fazem essa correção automaticamente [33,49].

As interferências espectrais poliatômicas são resultantes da combinação de dois ou mais íons e ocorrem principalmente na região de formação do plasma ou na região de interface, através da recombinação de espécies devido à diminuição de pressão e temperatura. Muitas dessas interferências são causadas pela combinação de íons do gás do plasma com íons de outras espécies. Por exemplo, a espécie poliatômica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, normalmente formada quando o argônio é o gás de plasma e/ou gás nebulizador, interfere com o $^{75}\text{As}^+$. Outra fonte igualmente comum de interferências poliatômicas consiste na combinação de elementos presentes nas amostras com ^1H , ^{16}O ou ^{16}OH , provenientes do ar ou da água, formando hidretos e óxidos em zonas de menor temperatura do plasma. Por exemplo a espécie poliatômica $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ interfere na leitura do $^{51}\text{V}^+$ [46,57]. A correção deste tipo de interferências é conseguida através de equações matemáticas representadas por funções lineares cujo declive representa o fator de correção que tem em consideração a cinética de formação da espécie poliatômica e a relação entre os isótopos presentes na mesma ou em equipamentos mais modernos recorre-se ao uso da célula de colisão

[46,59]. Uma forma de monitorizar a formação de óxidos consiste na análise da razão $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$, que permite verificar se o equipamento está a formar uma quantidade de óxidos significativa para as análises. Esta razão deve apresentar um valor baixo, sendo definido como critério de aceitação o valor de 0,015 [57].

As interferências de dupla carga ocorrem quando um ião com dupla carga positiva é formado, resultante num pico com metade da intensidade, uma vez que a razão m/z diminui para metade. Estas interferências são influenciadas pelas condições de ionização no plasma e podem ser diminuídas através da otimização do fluxo do gás nebulizador, do potencial de radiofrequência (RF) e do posicionamento da tocha [33]. Em geral, estas interferências são bastante raras e não representam uma preocupação significativa [46].

2.3.3.1.1. Célula de colisão/reacção

O método mais eficiente para reduzir as interferências espectrais, nomeadamente as poliatómicas, é através do uso de uma célula de colisão/reacção (CRC), posicionada imediatamente antes do quadrupolo [49].

Consiste em um quadrupolo encerrado em uma célula que pode ser pressurizada com gás. Assim, são introduzidos gases inertes ou reativos na célula para induzir colisões com iões gerados no ICP-MS. Essas colisões podem reduzir as interferências espectrais por um processo de reacção química ou pela redução da energia cinética de iões poliatómicos [46,63].

Uma das abordagens mais comum desta técnica consiste na utilização de hélio na CRC, e os iões gerados no ICP-MS sofrem colisões com as moléculas de hélio causando uma redução na energia cinética. Os iões do analito também são afetados, embora em menor extensão do que os iões poliatómicos. Isso ocorre porque os iões poliatómicos possuem uma área de secção transversal maior e, portanto, sofrem mais colisões. Os iões poliatómicos de energia mais baixa, assim como possíveis precursores de interferências, podem ser prontamente filtrados aplicando uma diferença de potencial apropriada entre a CRC e o quadrupolo do analisador, estabelecendo uma barreira de energia potencial em que apenas os iões com uma determinada energia cinética podem superar, e em seguida, entrarem no quadrupolo do analisador de massa. Este processo é chamado de discriminação de energia cinética, *Kinetic Energy Discrimination* (KED). Infelizmente, KED é eficaz apenas para iões poliatómicos, não sendo eficaz para elementos isobáricos e elementos duplamente carregados [46,64].

A maioria dos ICP-MS modernos são equipados com uma CRC, embora o *design* varie um pouco entre os fabricantes, assim na **Figura 9** é apresentado o equipamento ICP-MS utilizado neste trabalho com uma amplificação da zona do analisador de massa com a exemplificação do que ocorre no seu interior para o exemplo do Arsênio.

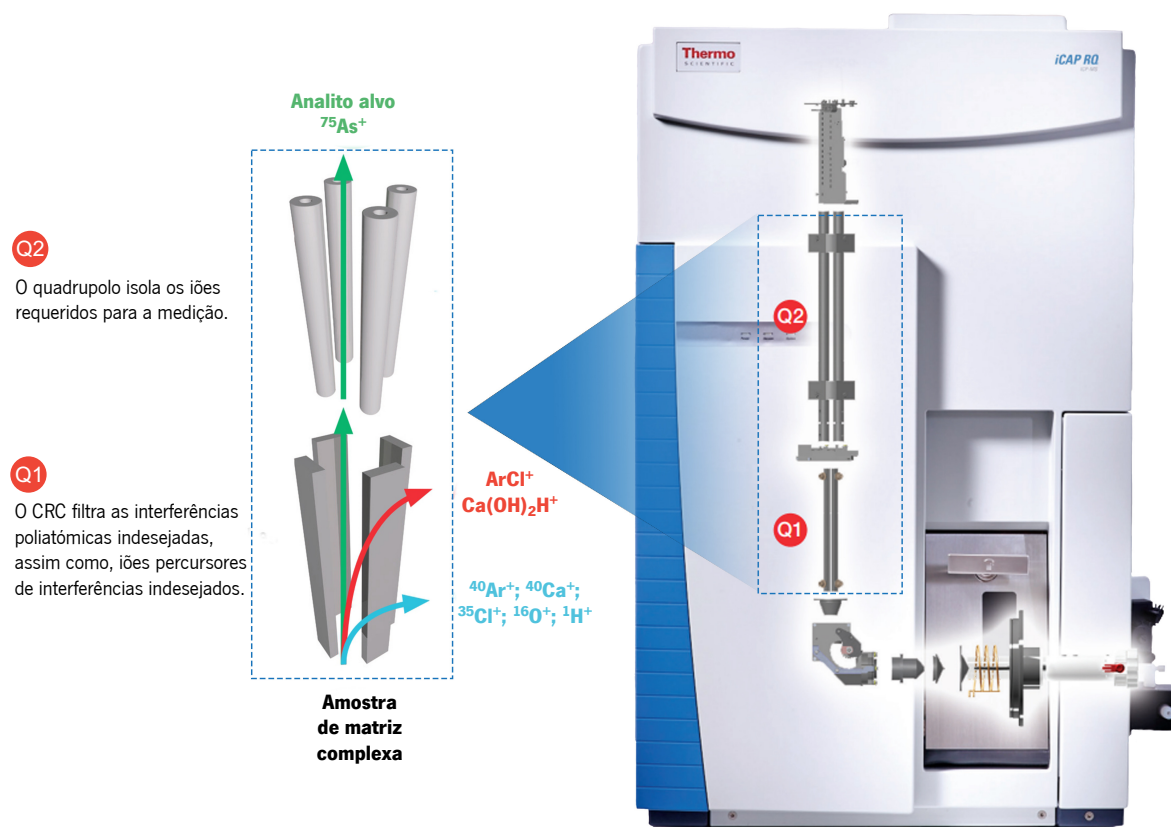


Figura 9 | Vista da frente do ICP-MS iCAP RQ utilizado no trabalho, com os respectivos componentes do equipamento e amplificação da zona do analisador de massa (adaptada de [59]).

2.3.3.2. Interferências não espectrais

As interferências não espectrais, geralmente chamadas de efeitos de matriz, podem ter várias origens, tais como, no processo de nebulização, no plasma, na região de interface ou no sistema de lentes. Estas interferências vão provocar uma perda de sensibilidade em alguns analitos, isto é, supressão do sinal do analito. Além disso, estas interferências também incluem o bloqueio do nebulizador, do tubo injetor da tocha e do *sampler cone*, causado pela concentração elevada de matéria dissolvida ou a nebulização de compostos orgânicos [56].

No caso da origem se dever ao processo de nebulização, as diferenças de viscosidade, de tensão superficial e de densidade entre as amostras e as soluções de calibração, causadas por diferenças na quantidade e tipo de matéria dissolvida, podem produzir alterações na velocidade de introdução da

amostra, na eficiência da nebulização e na distribuição das partículas por tamanho do aerossol [56,57]. O uso de uma bomba peristáltica pode reduzir os efeitos causados por diferenças na velocidade de distribuição das soluções, como já referido anteriormente.

Caso as interferências sejam devidas ao plasma, este pode provocar uma alteração no grau da ionização de alguns elementos (Cd, Zn, Hg, etc), que possuem um elevado potencial de primeira ionização e que não são completamente ionizados no plasma. Já os elementos com primeira energia de ionização mais baixa, são completamente ionizados e vão, por isso, sofrer menos efeitos de matriz [46,56].

Se as interferências forem na área da interface/lentes, ocorre a separação de iões com cargas positivas e negativas. Os iões positivos são focados pelo sistema de lentes, mas repelem-se entre si e alguns deles vão sofrer desvios da trajetória normal e não atingir o detetor. Os iões mais leves na presença de um elevado número de iões de elementos mais pesados vão ser mais repelidos do que a situação inversa, sofrendo deste modo mais efeito matriz [46,56].

Nas interferências não espectrais inclui-se também o efeito de memória. Os efeitos de memória ocorrem quando o sinal de um analito de uma amostra analisada previamente afeta o sinal da amostra seguinte. Deve ser sempre usada uma solução de lavagem entre amostra para evitar este efeito. Um exemplo, de um elemento com um forte efeito de memória é o mercúrio [65].

2.3.3.2.1. Padrão interno

Os efeitos de matriz e os desvios de sinal instrumentais prejudicam potencialmente a quantificação rigorosa dos analitos e, por isso, devem ser levados em consideração. Consequentemente, a calibração externa normalmente integra um ou mais elementos, que funcionam como padrão interno [49], conforme ilustrado na **Figura 10**.

Esta é uma maneira de compensar os efeitos da matriz e o desvio do instrumento, combinando a calibração externa com padrão interno, sendo que este é o método de calibração mais utilizado em ICP-MS [59]. A mesma concentração de um ou vários padrões é adicionada a todas as soluções de medição, incluindo o branco, padrões de calibração e amostras. Assim, o respetivo sinal normalizado para o padrão interno é usado para avaliação de dados [49].

Espera-se que a resposta desse elemento seja a mesma durante todo o ensaio, de modo que qualquer variação seja derivada de efeitos de matriz ou desvios do instrumento [59].

Como pré-requisito, o padrão interno deve apresentar propriedades físicas e químicas semelhante ao analito, por exemplo, com massa atômica e semelhantes energias de primeira ionização, e deve estar ausente das amostras (pelo menos em quantidades apreciáveis) [46,66]. Isto deve-se ao facto, de que se o padrão interno se encontrar na amostra a analisar podem ser reportadas concentrações de analito falsamente baixas. Problemas como estes podem ser detetados comparando cuidadosamente a intensidade do padrão interno nas amostras, padrões e brancos. A variação normal devido a efeitos de matriz é geralmente $\pm 20\%$ [46].

Os protocolos de rotina usam elementos raros, como índio, ródio, germânio ou bismuto, como padrões internos [49].

(A) Calibração externa



(B) Calibração externa + Padrão interno

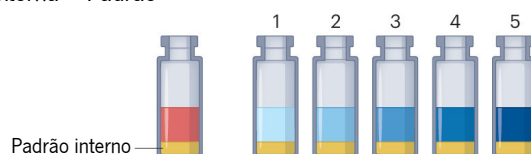


Figura 10 | Estratégias de calibração: **(A)** Calibração externa baseada na análise de padrões multielementares com concentrações crescentes para estabelecer uma relação matemática entre as intensidades do sinal e as concentrações dos analitos, e **(B)** Calibração externa com padronização interna, onde uma quantidade igual do elemento do padrão interno é adicionado a todas as soluções e amostras a serem analisadas [49].

2.3.4. Outras técnicas

Como referido anteriormente, a determinação de metais, mais concretamente o urânio, em diferentes matrizes de águas pode ser efetuada com recurso a várias técnicas espectrométricas, desde a espectrometria de Absorção Atômica com Câmara de Grafite (GFAAS), Espectrometria de Emissão Atômica Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-AES) e Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS). Porém, existem outras técnicas para quantificar o urânio, exemplos disso são as Espectroscopias de Raman e de Fluorescência [28].

Nas **Tabelas 3 e 4** apresentam-se os métodos analíticos mais utilizados para a determinação do urânio em águas de consumo e águas doces naturais, assim como alguns parâmetros de validação para cada metodologia analítica.

Tabela 3 | Estudos realizados utilizando ICP-MS para quantificação de urânio em águas de consumo humano.

Método analítico	Padrão interno	GT (µg/L)	LD (ng/L)	R ²	Precisão (%)	Justeza (%)	Ref.
ICP-MS	¹⁰³ Rh	0,05 – 10	2,0	0,99995	3,0	TR: 91- 106	[67]
	²⁰⁹ Bi	0,001– 200	0,4	0,9999	1,6	-	[68]
	²⁰⁹ Bi	0,5 – 5	20	0,9999	3,90	Er: 0,67	[69]

GT: gama de trabalho; LD: limite de detecção; R²: coeficiente de determinação; TR: taxa de recuperação; Er: erro relativo

Tabela 4 | Estudos realizados utilizando outros métodos analíticos, em águas doces subterrâneas, para quantificação de urânio.

Método analítico	GT (µg/L)	LD (µg/L)	Taxa de recuperação (%)	Ref.
ICP-AES	5 - 200	2,0	90	[70]
Espectroscopia de fluorescência	1 – 30	0,2	-	[71]
Espectroscopia Raman	100 – 10000	1,0	-	[72]

GT: gama de trabalho; LD: limite de detecção

Posto isto, observando as **Tabelas 3 e 4** a vantagem mais evidente da utilização da técnica ICP-MS é a capacidade de atingir limites de detecção muito baixos, na gama dos ppt, enquanto as técnicas apresentadas na **Tabela 4** os limites de detecção encontram-se na gama dos ppb. Porém, essa não é a única vantagem que o ICP-MS apresenta, destacam-se ainda, o facto de ser uma técnica multielementar, o volume de amostra ser muito baixo, o tempo de análise ser bastante reduzido e ser possível fazer análise de isótopos diferentes. Contudo, como todas as técnicas esta apresenta as suas desvantagens, sendo estas sobretudo devido ao elevado custo do equipamento e os técnicos responsáveis requerem um elevado nível de especialização [46,52].

2.4. Validação de métodos analíticos

Sempre que um método analítico é implementado e antes de ser executado como método de rotina, é necessário proceder à sua validação. Este é um estudo experimental que tem como objetivo demonstrar que o procedimento analítico avaliado é adequado ao fim a que se destina, de modo a assegurar a confiabilidade dos resultados obtidos [73]. Assim, neste subcapítulo, aborda-se a validação de um método analítico quantitativo quando ponderada pelo estudo e conhecimento dos parâmetros de validação: seletividade/especificidade, gama de trabalho, linearidade, limiares analíticos, sensibilidade, precisão, em termos de repetibilidade e precisão intermédia, e justeza (**Figura 11**).

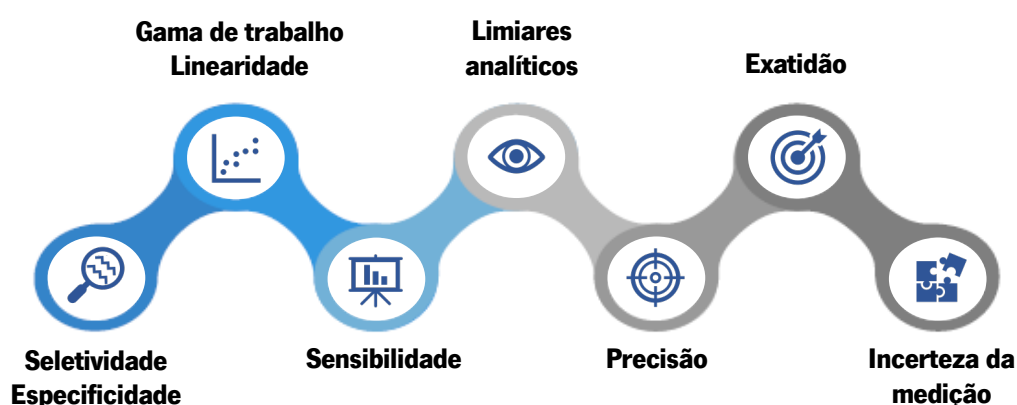


Figura 11 | Parâmetros de desempenho avaliados na validação do método analítico.

Os laboratórios procedem à validação de métodos sempre que utilizam métodos não normalizados, métodos desenvolvidos pelo próprio laboratório e métodos normalizados utilizados fora do âmbito de utilização previsto, ou de outra forma modificados. A validação não é exigida para métodos normalizados, ainda assim o laboratório necessita verificar o seu desempenho, de forma a aferir a sua capacidade de reproduzir o método no seu meio [8,74,75].

A implementação de um método analítico ou a validação do mesmo, é um processo lento e que não deve ser de alguma forma apressado, pois as consequências de erros a longo prazo, traduzem-se na perda de recursos, tempo e dinheiro. Assim, para além dos parâmetros de desempenho avaliados de forma direta e indireta, é também, segundo a norma ISO 11352:2012, estimada a incerteza do método [76,77].

2.4.1. Curva de calibração

A calibração, em análises quantitativas, permite estabelecer uma relação entre o sinal obtido pelo equipamento e a concentração, ou quantidade de uma substância conhecida [75,78].

Assim, antes de se proceder à determinação de qualquer parâmetro de desempenho deve-se fazer a seleção do melhor modelo para ajustar os resultados obtidos e, portanto, o critério de escolha do modelo de regressão que melhor se ajusta aos pontos é baseado no método dos mínimos quadrados.

No caso do modelo de regressão linear, observa-se a existência de uma relação linear entre os valores de y (resposta instrumental) e de x (concentrações dos padrões), o que visualmente se traduz numa reta [73,75,76]. A partir da reta de calibração deste modelo, é possível obter uma equação da reta de calibração dada pela **Equação 1**.

$$y = bx + a \quad \text{Equação 1}$$

Em que, b corresponde ao declive e a à ordenada na origem.

Os valores destas grandezas devem ser acompanhados da respetiva incerteza associada. Para tal, numa primeira fase é necessário calcular os desvios padrão associados à ordenada na origem (S_a) e ao declive (S_b). Estes são calculados a partir das **Equações 2 e 3**.

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

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Equação 3}$$

Em que, n corresponde ao número de padrões utilizados para a construção da curva de calibração e $S_{y/x}$ é o desvio padrão residual do modelo de regressão linear e, pode ser calculado recorrendo à **Equação 4**.

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Equação 4}$$

Em que, $\hat{y}_i$ representa o sinal obtido, y_i , quando se interpola o valor de uma determinada concentração, x_i [73,79].

Seguidamente, os intervalos de confiança, tanto do declive como da ordenada na origem podem

ser calculados a partir das **Equações 5 e 6**.

$$b \pm tS_b \quad \text{Equação 5}$$

$$a \pm tS_a \quad \text{Equação 6}$$

Assim, a equação da reta de calibração contendo as incertezas do declive e da ordenada na origem, com um intervalo de confiança de 95 %, n-2 graus de liberdade [73,76], encontra-se abaixo representada pela **Equação 7**.

$$y = (b \pm tS_b)x + (a \pm tS_a) \quad \text{Equação 7}$$

2.4.2. Gama de trabalho

A gama de trabalho define-se como o intervalo de concentrações em que o sistema analítico avaliado produz resultados com uma incerteza aceitável, isto é, nesta gama o analito deve apresentar uma precisão e justeza aceitáveis [73]. A extremidade inferior da gama de trabalho é o limite de quantificação e a extremidade superior é o limite de aplicabilidade. Para a determinação da gama de trabalho seja possível, é necessário considerar o procedimento de calibração proposto e a linearidade do método [75,76].

No laboratório da empresa Águas do Norte, S.A., a gama de trabalho é selecionada tendo em conta a legislação em vigor e as gamas de concentração comuns nas amostras de rotina do laboratório [66].

2.4.3. Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de analito. Existe diversas formas de avaliar a linearidade, entre elas o Laboratório recorre à visualização da representação gráfica da curva de calibração, juntamente com a avaliação do coeficiente de determinação (R^2), sendo que este tem de ser superior a 0,9990, para o modelo de regressão se considerar bem ajustado [66].

Contudo, o Guia RELACRE 13 considera um modelo de regressão linear se encontra bem, ajustado se o valor do coeficiente de correlação (r) for superior a 0,995 [73].

Para além deste método, a linearidade é fundamentalmente avaliada com recurso a gráficos de análise de resíduos. Um gráfico de resíduos mostra a dispersão que exibem os resíduos $(y_i - \hat{y}_i)$ no eixo das ordenadas e $\hat{y}_i$ no eixo das abcissas [76]. Este tipo de gráfico ajuda a determinar se o modelo linear é apropriado para apresentar os dados fornecidos. Quando os resíduos apresentam-se espalhados aleatoriamente em torno do resíduo igual a zero, significa que o modelo linear encontra-se bem ajustado, e, assim, o modelo linear é apropriado [80].

Adicionalmente, este parâmetro também pode ser avaliado com recurso a um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1 [79], designado teste de *Mandel*, que faz a comparação entre o ajuste dos valores experimentais para a função linear, $S_{y/x}$, (**Equação 4**), e o ajuste dos mesmos para a função quadrática, S_{y^2} (**Equação 8**).

$$S_{y^2} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-3}} \quad \text{Equação 8}$$

Em que, n designa o número de padrões utilizados para a construção da curva de calibração, e $\hat{y}_i$ representa o sinal obtido, y_i , quando se interpola, na função quadrática, o valor de uma determinada concentração, x_i [73,79].

Seguidamente, procede-se ao cálculo da diferença de variâncias, DS^2 , de acordo com a **Equação 9**, abaixo representada.

$$DS^2 = (n-2) \times S_{y/x}^2 - (n-3) \times S_{y^2}^2 \quad \text{Equação 9}$$

Em que, n designa o número de padrões utilizados para a construção da curva de calibração, $S_{y/x}$ designa o desvio padrão residual da função de calibração linear e S_{y^2} o desvio padrão residual da função de calibração quadrática [73,79].

Finalmente, calcula-se o valor de teste PG , de acordo com a **Equação 10**, com o intuito de verificar a existência de diferenças significativas, por comparação com o valor tabelado da distribuição de F de *Snedecor / Fisher* bicaudal ($F_{\text{crítico}}$), para um grau de liberdade, no que diz respeito à diferença de variâncias e $n-3$ graus de liberdade, para o desvio padrão residual da função de calibração quadrática.

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2} \quad \text{Equação 10}$$

Assim, se o valor do teste PG for inferior ou igual ao valor tabelado de F, a função de calibração

é linear, ou seja, a função quadrática não permite um melhor ajuste. No entanto, se o valor do teste *PG* for superior ao valor tabelado de *F*, a gama de trabalho deverá ser reduzida de forma a garantir uma calibração linear ou por sua vez, proceder à verificação se, os dados de análise de amostras deverão ser avaliados através de uma função de calibração ponderada [73,76,79].

2.4.4. Sensibilidade

A sensibilidade é a capacidade de um método, ou equipamento, distinguir pequenas diferenças de concentração de analito. Assim, por norma, este parâmetro pode ser definido como a razão entre a variação da resposta (Δy), que corresponde a uma variação na concentração de analito correspondente (Δx) [73,75,76], representada pela **Equação 11**.

$$Sensibilidade = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad \textbf{Equação 11}$$

Na prática, se a função for linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e a sensibilidade corresponde ao declive da reta de calibração [73].

Porém, para o ICP-MS, o Laboratório onde o presente trabalho foi realizado, avalia a sensibilidade não pelos declives das curvas de calibração mas pelo número mínimo de contagens obtidas na realização do teste de sensibilidade (*Performance test*), sendo que, este teste é realizado sempre que o equipamento é utilizado antes de iniciar qualquer sessão de trabalho [66].

2.4.5. Seletividade e especificidade

A seletividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular numa mistura complexa sem interferência dos outros componentes, que são suscetíveis de causar um desvio na quantificação do analito e assim provocar desvios sistemáticos [73,75].

A especificidade de um método analítico corresponde à capacidade de o método avaliar inequivocamente o analito em relação a outras substâncias eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. Assim, será necessário averiguar a possibilidade de existir interferência de outras substâncias eventualmente presentes na amostra, utilizando para efeito uma amostra complexa [66].

Em geral, estes parâmetros são objeto de estudo na fase inicial do processo de validação, pois

sem o conhecimento de que estes parâmetros são aceitáveis, a verificação dos outros parâmetros de desempenho apresentam escasso valor prático [66].

Usualmente, a seletividade é avaliada através de ensaios de recuperação, estudando-se, assim, as possíveis interferências existentes na matriz [73]. Assim, é feita a análise da amostra com e sem fortificação e é analisado o desvio dos resultados obtidos, em comparação com os esperados. Através da **Equação 12**, calcula-se então, a taxa de recuperação do analito (R (%)).

$$R (\%) = \left(\frac{C_{af} \times V_f - C_a \times V_a}{C_p \times V_p} \right) \times 100 \quad \text{Equação 12}$$

Em que, C_{af} designa a concentração do analito da amostra fortificada, V_f é o volume final, C_a refere-se à concentração de analito na amostra sem fortificação, V_a é o volume de amostra, C_p designa a concentração do analito da solução padrão adicionada, e V_p o volume da solução padrão adicionada [66].

Posto isto, um método para ser considerado seletivo e específico deverá apresentar uma taxa de recuperação próxima de 100 %, dependendo das metodologias aplicadas, pois o critério para a aceitação de alguns métodos admite intervalos de recuperação mais ou menos alargados [73].

2.4.6. Limiares analíticos

Os limiares analíticos podem ser calculados de diferentes formas, de acordo com as metodologias utilizadas em rotina num laboratório. Sempre que os laboratórios utilizem métodos em que as medições são feitas em baixas concentrações, existem alguns aspetos a considerar, sendo a metodologia relacionada com todos estes conceitos é muito diversa e variável entre setores [75,76].

Assim, é importante conhecer a concentração mais baixa de analito que pode ser detetada e/ou quantificada pelo método a um nível de confiança especificado, em que o desempenho se torne aceitável para a aplicação típica. Estes conceitos são usualmente denominados, limite de deteção (LD) e limite de quantificação (LQ) [75,81].

2.4.6.1. Limite de deteção

O limite de deteção corresponde à concentração mínima de analito que um determinado método é capaz de detetar e distinguir, com uma certeza estatística razoável, normalmente 95 % [73,75,76].

Assim, quando aplicável, o Laboratório define o LD dos seus métodos de duas formas.

Primeiramente, pode avaliar através dos resultados da análise de uma série de brancos [66]. Em termos quantitativos o LD pode ser obtido pela **Equação 13**.

$$LD = 3,3 \times S \quad \text{Equação 13}$$

Em que, S refere-se ao desvio padrão dos resultados obtidos a partir das leituras dos brancos.

Outra forma de se avaliar o LD é no caso da calibração for do tipo linear, pode-se recorrer à **Equação 14**.

$$LD = \frac{3,3 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 14}$$

Em que, $S_{y/x}$ designa o desvio padrão residual da função de calibração linear, e b corresponde ao declive da reta de calibração [73].

2.4.6.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação corresponde à concentração mais baixa que um determinado método é capaz de quantificar, com um determinado nível de confiança, em que se verifica que o desempenho do método é aceitável para uma determinada aplicação, com uma determinada justeza e precisão [73,75,76].

A gama entre o LD e o LQ deve ser entendida como uma zona de deteção qualitativa, e portanto não quantitativa, pelo que não se deve reportar valores numéricos nesta gama. Na prática, o LQ corresponde ao padrão de concentração mais baixa usado para traçar a curva de calibração, excluindo o branco [75].

Assim, o LQ deve ser testado para averiguar se a justeza e precisão conseguidas são satisfatórias. Para isso, são feitas leituras de padrões de concentração referente ao LQ e é avaliado o coeficiente de variação (CV) e o erro relativo (Er), ambos expressos em percentagem (%), representados pelas **Equações 15 e 16**.

$$CV (\%) = \left(\frac{S}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 15}$$

$$Er (\%) = \left(\frac{|\bar{x} - x_{ref}|}{x_{ref}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 16}$$

Em que, S refere-se ao desvio padrão dos resultados obtidos, $\bar{x}$ é a média dos resultados obtidos, e x_{ref} o valor aceite como verdadeiro [66,76].

O coeficiente de variação, segundo os critérios definidos pelo Laboratório, não deve exceder os 10 %, e o erro relativo deve também, preferencialmente, ser menor ou igual a 10 % [66].

Tal como o LD, outra forma de se avaliar o LQ é a partir dos dados da reta de calibração, em que se recorre à **Equação 17**.

$$LQ = \frac{10 \times S_{y/x}}{b} \quad \text{Equação 17}$$

2.4.7. Precisão

A precisão define-se como o parâmetro que permite a avaliação da dispersão de resultados, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições específicas, sendo elas, a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade. A precisão pode variar com a gama de concentração, sendo recomendado o estudo em três níveis de concentração. Este parâmetro permite avaliar a qualidade dos resultados tendo em consideração possíveis erros aleatórios [73,82,83].

2.4.7.1. Repetibilidade

A repetibilidade representa a precisão de um método de ensaio efetuado em condições idênticas, isto é, refere-se aos ensaios efetuados sobre a mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, como por exemplo, o mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento, o mesmo tipo de reagentes e/ou os mesmos intervalos de tempo [73,75,76].

A forma de avaliar a precisão, em condições de repetibilidade, é através do desvio padrão de repetibilidade (S_r), associado aos resultados considerados ou na forma de coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) para uma determinada gama de concentração. O CV_r é dado pela **Equação 18**.

$$CV_r = \left(\frac{S_r}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 18}$$

A partir do s_r pode-se determinar o limite de repetibilidade (r_r). Este é o valor abaixo do qual se deve situar, para uma dada probabilidade (normalmente 95 %), a diferença entre dois ensaios obtidos, em condições de repetibilidade. O valor de r_r é dado pela **Equação 19**.

$$r_r = 2,8 \times S_r$$

Equação 19

Na prática, aceitam-se os resultados de duas determinações efetuadas em condições de repetibilidade se $|x_i - x_{i-1}| \leq r_r$. Caso tal não se verifique, deve repetir-se o ensaio em questão [73,75].

2.4.7.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia exprime a precisão avaliada sobre os padrões de três níveis de concentrações, mas também em amostras reais, utilizando o mesmo método e o mesmo laboratório, mas fazendo variar uma ou mais condições, tais como, realizar as análises em dias diferentes ou analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Este parâmetro permite avaliar o impacto das alterações que poderão ocorrer no dia-a-dia do laboratório e é o parâmetro mais representativo da variabilidade dos resultados num laboratório [66,73,75,76].

A forma de avaliar a precisão, em condições de precisão intermédia baseia-se no desvio padrão de precisão intermédia (S_I) associado aos resultados considerados ou na forma de coeficiente de variação de precisão intermédia (CV_I) para um determinado nível de concentração ou para duplicados de amostra.

Assim, o S_I pode ser obtido pela **Equação 20**, para os três níveis de concentração selecionados, e a **Equação 21**, para amostras, caso o número de replicados seja igual a dois.

$$S_I = \sqrt{\frac{1}{n-1} \times \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

Equação 20

$$S_I = \sqrt{\frac{1}{2 \times t} \times \sum_{k=1}^n (y_{j1} - y_{j2})^2}$$

Equação 21

Em que, n designa o números de padrões analisados, y_k é o resultado individual obtido, $\bar{y}$ refere-se à média aritmética dos resultados individuais obtidos, t é o número de amostras analisadas em duplicado, e por último, $(y_{j1} - y_{j2})$ representa a diferença entre os duplicados das amostras [66].

Para além do S_I , também é possível determinar o limite de precisão intermédia (r_I) e o coeficiente de variação de precisão intermédia (CV_I), recorrendo às **Equações 22** e **23**, respetivamente.

$$r_I = 2,8 \times S_I \quad \text{Equação 22}$$

$$CV_I = \left(\frac{S_I}{\bar{x}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 23}$$

Além disso, a determinação simultânea da repetibilidade e da precisão intermédia para uma mesma amostra através de uma análise de variâncias (ANOVA) de fator único, pode ser um procedimento alternativo quando se pretende otimizar o tempo dispensado na validação de métodos analíticos. Assim, são realizados vários ensaios em condições de precisão intermédia, ou seja, em dias diferentes, sendo que, a análise de replicados de uma mesma amostra também é efetuada em cada ensaio, em condições de repetibilidade. Deste modo, é possível avaliar a repetibilidade do método através da comparação dos resultados obtidos dentro do grupo, ou seja, pela comparação dos replicados obtidos para o mesmo ensaio. Pelo contrário, a avaliação da precisão intermédia pode ser alcançada através da comparação entre grupos, isto é, os valores obtidos entre diferentes ensaios [12,76].

A informação que se obtém a partir da ANOVA unifatorial, considerando p grupos, com n replicados com um total de N análises ($N = p \times n$) para GL, graus de liberdade [76], encontra-se esquematizada na **Tabela 5**, abaixo representada.

Tabela 5 | Dados obtidos num ensaio através da ANOVA unifatorial

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

Cada linha da **Tabela 5** está relacionada com uma diferente fonte de variação. A primeira linha descreve a variação entre os grupos (**Equação 24 e 25**), a segunda linha indica a variação dentro dos grupos (**Equação 26 e 27**) e a terceira linha refere-se à variação do conjunto de dados como um todo (**Equação 28**).

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

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

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

Seguidamente, procede-se ao cálculo do desvio padrão “entre grupos”, $S_{between}$, segundo a **Equação 30**.

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

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

Por fim, o desvio padrão “entre grupos” é combinado com o desvio de repetibilidade, de modo a calcular o desvio padrão de precisão intermédia, S_I , (**Equação 31**).

$$S_I = \sqrt{S_r^2 + S_{between}^2} \quad \text{Equação 31}$$

2.4.8. Justeza

A justeza ou veracidade é o termo que designa o grau de concordância entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência, assim, por esta definição, a justeza não é uma grandeza, pois não é possível atribuir-lhe um valor numérico, e, portanto, não pode ser medida [75,76].

No entanto, a justeza pode ser expressa quantitativamente como uma estimativa do erro sistemático, designado *bias* ou erro relativo. Na prática, a justeza é determinada como a diferença entre a média obtida a partir de n medições repetidas e um determinado valor de referência, e assim sendo, é possível avaliar a componente dos efeitos sistemáticos [75,76].

Assim, o parâmetro justeza pode ser avaliado quantitativamente através de Materiais de Referência Certificados (MRC), Ensaio Interlaboratoriais (EIL) ou Ensaio de Recuperação (ER) [75].

2.4.8.1. Materiais de Referência Certificados

Os materiais de referência certificados são recursos essenciais no controlo de qualidade, e, portanto, devem fazer parte do processo de validação de um determinado método [73,84]. Este é, essencialmente, um material ou solução em que um determinado parâmetro ou propriedade foi caracterizada de modo a poder servir como referência metrológica. Além disso, a propriedade de interesse é estável, apresenta um elevado grau de homogeneidade, com um elevado grau de

caracterização, rastreabilidade e documentação, e onde se encontra apresentada a respetiva incerteza [85,86].

A utilização correta de MRC assegura a veracidade de um método, além de permitir ao laboratório a verificação do desempenho do equipamento, procedimentos, sistemas e analistas, o que garante a possibilidade do laboratório concluir se os dados gerados pelo seu procedimento são corretos. O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e a justeza da análise. Conforme o rigor exigido para os seus resultados, o laboratório pode adotar diferentes critérios para aceitação dos resultados dos MRC [87].

Existem vários parâmetros para a avaliação dos resultados obtidos da análise de um MRC, tais como, o erro relativo, avaliação do desvio sistemático pelo teste t, fator de desempenho Z (*Z-score*) e o erro normalizado (E_n) [73,88].

Erro relativo

A determinação do erro relativo permite avaliar a justeza de um determinado método e a expressão dos erros sistemáticos associados. O erro relativo é calculado através da análise de réplicas independentes ($n \geq 10$) de MRC, sendo posteriormente determinado o valor médio das réplicas e comparado com o valor de referência [66,73,78]. O erro relativo é expresso segundo a **Equação 16**, anteriormente apresentada.

Cada laboratório define o seu grau de exigência em termos de justeza do método, isto é, o desvio permitido, devendo assegurar a confirmação pelos dados bibliográficos relativos ao método, sendo que no caso do laboratório da empresa onde se realizou o presente trabalho, é considerado satisfatório o método quando erro relativo seja inferior a 15 % [66].

Avaliação da significância dos desvios sistemáticos

Através do teste t (**Equação 32**) é possível avaliar se a recuperação média do método (R_m) é significativamente diferente de 1, tendo em consideração a respetiva incerteza padrão associada à justeza do método, além de possibilitar averiguar a existência de erros sistemáticos associados à metodologia praticada [88].

$$t = \frac{|1 - R_m|}{u(R_m)} \quad \text{Equação 32}$$

O valor de t em módulo, $|t|$, é comparado com o valor t tabelado para $n-1$ graus de liberdade.

Assim, se $|t| \leq t_{tabelado}$ significa que a recuperação do método não é significativamente diferente de 1, não sendo estatisticamente evidenciada a existência de desvios (erros sistemáticos). No entanto, se $|t| > t_{tabelado}$, a recuperação do método é significativamente diferente de 1, com evidência estatística da existência de erros sistemáticos [88].

Fator de desempenho Z (Z-score)

O fator de desempenho é outro parâmetro utilizado para a avaliação do desempenho do laboratório na análise de um MRC [88]. O seu cálculo é efetuado de acordo com a expressão, abaixo representada, pela **Equação 33**.

$$Z = \frac{x_{lab} - x_{ref}}{S} \quad \text{Equação 33}$$

Em que, x_{lab} é o valor obtido pelo laboratório, x_{ref} designa o valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC, e S define a unidade de desvio admissível (variação máxima permitida no ensaio), podendo ser a incerteza do MRC [78,89].

Segundo a norma ISO 17043:2010, o desempenho do laboratório é classificado de acordo com o valor de Z , em módulo. Assim, quando $|Z|$ for inferior ou igual a 2, o desempenho é considerado satisfatório, quando $|Z|$ fica contido no intervalo entre 2 e 3, o desempenho é questionável e nas situações em que $|Z|$ é maior que 3, o desempenho é não satisfatório [90].

Erro normalizado

Tal como os outros parâmetros apresentados, o erro normalizado permite a avaliação do desempenho do laboratório na análise de um MRC [88]. Caso o laboratório calcule a incerteza expandida do seu resultado (U_{lab}), o valor verdadeiro (x_{ref}) deve estar dentro do intervalo de incerteza de x_{lab} . Quando tal não acontece, este intervalo poderá estar subestimado. Nestes casos, e tal como acontece na análise de um MRC, é usualmente calculado o erro normalizado, E_n , (**Equação 34**), para efetuar a avaliação do desempenho.

$$E_n = \frac{x_{lab} - x_{ref}}{\sqrt{U_{lab}^2 + U_{ref}^2}} \quad \text{Equação 34}$$

Em que, U_{ref} representa a incerteza expandida do MRC.

Com base no valor de E_n é possível concluir que sempre que $|E_n| \leq 1$, o resultado é satisfatório, ou seja, a incerteza expandida obtida pelo laboratório encontra-se bem estimada [73,88].

2.4.8.2. Ensaios Interlaboratoriais

Segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025:2018, os laboratórios devem monitorizar o seu desempenho através da comparação dos seus resultados com os de outros laboratórios, quando disponível e apropriado, nomeadamente em ensaios de aptidão [8].

Assim, os ensaios interlaboratoriais (EIL) permitem a avaliação de desempenho de ensaios na mesma condição ou condições relacionadas por dois ou mais laboratórios de acordo com condições pré-determinadas, o que evidencia a exatidão dos resultados obtidos através de um método de ensaio [78].

A monitorização do desempenho do laboratório e dos seus analistas é conseguida através da participação por parte dos laboratórios em ensaios de aptidão, considerados os ensaios interlaboratoriais mais comuns. Cada laboratório é classificado tendo em conta o seu índice de desempenho, pela avaliação dos resultados obtidos aliado a indicadores estatísticos (**Equação 33**) [78,89].

Por este motivo, a participação em ensaios interlaboratoriais, permite ao laboratório detetar erros sistemáticos nas suas medições e, deste modo, adotar medidas corretivas quando o nível de aceitação requerido não é atingido.

2.4.8.3. Ensaios de Recuperação

Os ensaios de recuperação são extremamente importantes na avaliação da resposta instrumental analítica obtida em várias matrizes, sendo necessária a elaboração de um ensaio de recuperação em cada série de trabalho, ao longo de toda a gama de trabalho, em diferentes matrizes e em duplicado [57].

O objetivo principal dos ensaios de recuperação passa por verificar se existem efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas como o efeito de matriz. Estes ensaios têm por base a adição de uma quantidade conhecida de padrão a uma amostra ou branco de amostra, para verificar a quantidade de analito que se obtém através do cálculo da taxa de recuperação (**Equação 12**), variando com a concentração de analito presente [66,73,76].

2.4.9. Incerteza de medição

A incerteza de uma medição é definida como um parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores atribuídos a uma mensuranda, com base nas informações disponíveis utilizadas e, quanto maior for a incerteza, menor será a confiabilidade do resultado [91]. A avaliação da incerteza

de medição é essencial e imprescindível, de forma a ser demonstrável a credibilidade de um determinado laboratório e a adequação do método analítico implementado ao fim que se destina, e, portanto, um resultado de uma medição não tem significado se não estiver associado a uma incerteza [92].

Existe várias abordagens para determinar a incerteza da medição, distinguindo-se duas abordagens principais, a abordagem “passo a passo” e metodologia baseada nos dados de validação e/ou controlo de qualidade do método. Em ambos os casos, o objetivo principal passa pela determinação das incertezas combinada (u_c) e expandida (U) [77,91,92].

A determinação da incerteza de medição, pela metodologia “passo a passo” consiste em identificar todas as características do sistema analítico que podem contribuir para a incerteza do resultado, estimar as contribuições de cada uma, atribuindo-lhe um valor numérico, e combinar estas de forma a obter um valor final [91].

De modo geral, esta metodologia pode ser dividida em três etapas essenciais de forma a obter-se o valor mais correto possível da incerteza. Inicialmente, é necessário especificar a mensuranda, de seguida identificar e quantificar todas as fontes de incerteza e por fim calcular as incertezas combinada e expandida. Após a especificação da mensuranda, procede-se à identificação das fontes de incerteza a partir da construção de diagramas de “causa efeito”, também denominados de diagramas de “espinha de peixe”. Estes diagramas são feitos de forma a facilitar o processo de identificação e agrupamento das diversas fontes de incerteza [84,91].

Em seguida, segue-se a quantificação da incerteza resultante dessas fontes. É de realçar que as incertezas calculadas devem ser incertezas padrão, e para tal deve-se admitir uma distribuição retangular se todos os valores de grandeza apresentarem igual probabilidade de ocorrerem, ou uma distribuição triangular se não há razão para esperar obter os extremos da grandeza [84,91].

Por fim, as contribuições para a incerteza global são combinadas em conformidade obtendo-se a incerteza padrão combinada (u_c). Esta é um desvio padrão que é estimado usando a propagação das incertezas. A incerteza expandida (U) é dada pela **Equação 35**.

$$U = k \times u_c \quad \textbf{Equação 35}$$

Onde o fator de expansão, k , é definido como sendo dois, caso os resultados sigam uma distribuição normal, para um nível de confiança de 95 % [84,91].

Já a segunda abordagem, visa simplificar a estimativa da incerteza, reduzindo a quantidade de cálculos necessários, através do agrupamento de alguns termos de incerteza, num termo único. A incerteza de medição é estimada combinando as incertezas associadas à precisão e à veracidade,

considerando-se a componente dos erros aleatórios e sistemáticos, respetivamente [77,91].

Assim sendo, o primeiro passo desta abordagem passa pela determinação dos componentes da $u_{\text{precisão relativa}}$ e da $u_{\text{justeza relativa}}$, separadamente.

Para o cálculo da $u_{\text{precisão relativa}}$, o Laboratório definiu que esta deve ser calculada a partir da combinação da incerteza associada à precisão intermédia dos duplicados de amostras ($u_{p,amostra}$) com a incerteza associada à precisão intermédia do padrão de menor concentração ($u_{p,CQ}$), referente ao limite de quantificação, segundo a **Equação 36**. Assim, em ambos os casos, a incerteza associada à precisão intermédia é o valor equivalente ao S_I . De seguida, deve-se considerar a incerteza associada à precisão intermédia na forma relativa, que é equivalente ao CV_I [66,91].

$$u_{\text{precisão relativa}} = \sqrt{u_{p,amostra}^2 + u_{p,CQ}^2} \quad \text{Equação 36}$$

Para a componente da $u_{\text{justeza relativa}}$, o Laboratório usa os resultados obtidos nos ensaios de recuperação. Assim, a avaliação da incerteza associada aos erros sistemáticos a partir de ensaios de recuperação baseia-se na conjugação de duas componentes, a diferença entre a recuperação observada e a recuperação completa (100 %) (**Equação 37**) e a incerteza relativa da concentração de analito adicionada (u'_{add}) (**Equação 38**) [91].

$$b_{rms} = \sqrt{\frac{\sum (b'_i)^2}{n_n}} \quad \text{Equação 37}$$

Em que, b_{rms} é o valor quadrático médio dos desvios relativos dos ensaios de recuperação, b'_i refere-se ao desvio relativo à recuperação completa e n_n designa o número de ensaios de recuperação efetuados.

$$u'_{add} = \sqrt{(u'_V)^2 + (u'_{conc})^2} \quad \text{Equação 38}$$

Em que, u'_V define a incerteza relativa associada ao volume adicionado e u'_{conc} designa a incerteza relativa da concentração da solução utilizada para a fortificação [91].

Assim, a componente da incerteza associada à justeza do método, $u_{\text{justeza relativa}}$, através de ensaios de recuperação é dada pela **Equação 39**.

$$u_{justeza\ relativa} = \sqrt{b_{rms}^2 + (u'_{add})^2} \quad \text{Equação 39}$$

Posto isto, a próxima etapa consiste em calcular a incerteza padrão combinada. O cálculo da incerteza padrão combinada (u_c) baseia-se na Lei de Propagação das Incertezas. Através das componentes da incerteza padrão estimadas a partir dos dados de validação e/ou do controlo de qualidade, nomeadamente, a combinação da componente da incerteza associada à precisão ($u_{precisão\ relativa}$) e a componente associada à justeza ($u_{justeza\ relativa}$), permite o cálculo da incerteza padrão combinada, de acordo com a **Equação 40** [91].

$$u_c = \sqrt{u_{precisão\ relativa}^2 + u_{justeza\ relativa}^2} \quad \text{Equação 40}$$

Por fim, a etapa final, tal como na abordagem “passo a passo”, consiste em multiplicar a incerteza padrão combinada pelo fator de expansão, a fim de obter a incerteza expandida (**Equação 35**).

2.4.10. Garantia de Controlo de Qualidade

Os erros são uma parte integrante do trabalho em rotina e, como tal, é essencial, por um lado, minimizá-los e, por outro lado, controlar a ocorrência destes, Controlo de Qualidade (CQ), de forma a otimizar a eficácia do Sistema de Gestão da Qualidade (SGQ) adotado. Assim, após a fase inicial de estudo do equipamento e da técnica analítica, e aprovação do método de análise, os laboratórios devem exercer um controlo da sua execução, garantindo que as condições de validade do método se mantenham [78].

Posto isto, o CQ deve ser planeado e implementado para permitir a monitorização contínua do desempenho analítico em rotina, de modo a que seja possível detetar tendências através da aplicação de técnicas estatísticas de análise de resultados. Tendo em conta estes aspetos, é importante realizar avaliações periódicas da veracidade e precisão dos resultados, através do Controlo da Qualidade tanto intralaboratorial (interno) como interlaboratorial (externo) [78,93].

2.4.10.1. Controlo de qualidade interno

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste nas ações de CQ cuja implementação depende

apenas da vontade e meios do laboratório, e não de um fator externo. Estas ações visam a monitorização e controlo da precisão e veracidade dos resultados produzidos pelo laboratório [78].

Assim, as cartas de aceitação constituem a ferramenta mais usada pelo Laboratório, no que diz respeito ao ICP-MS. Estas cartas apresentam limites definidos tendo em conta os objetivos do ensaio e são definidos, internamente, pelo laboratório. A principal vantagem das cartas de aceitação é que são mais fáceis de construir em relação a outras [66].

Outra ferramenta muito utilizada para monitorizar os resultados é a utilização de cartas de controlo, que substitui os limites definidos, usados nas cartas de aceitação, por limites estatísticos.

A construção de cartas de controlo requer a realização de um estudo prévio de modo a definir o valor alvo e os limites de aviso e de controlo. Deste modo, é feito um estudo preliminar onde são efetuadas análises de uma série de amostras ou padrões, em dias diferentes. De seguida, determina-se a média, $\bar{x}$, sendo este o valor da carta de controlo e, o respetivo S obtido em condições de precisão intermédia [84,94,95]. Os limites superiores de aviso (LSA) e inferiores de aviso (LIA) são dados com 95 % de confiança pelas **Equações 41 e 42**.

$$LSA = \bar{x} + 2S \quad \textbf{Equação 41}$$

$$LIA = \bar{x} - 2S \quad \textbf{Equação 42}$$

Os limites superiores de controlo (LSC) e inferiores de controlo (LIC) são obtidos com 99,7 % de confiança, recorrendo às **Equações 43 e 44**.

$$LSC = \bar{x} + 3S \quad \textbf{Equação 43}$$

$$LIC = \bar{x} - 3S \quad \textbf{Equação 44}$$

Posteriormente, todos os valores obtidos diariamente para esta grandeza devem ser introduzidos na carta de controlo. Deste modo, é possível verificar a deteção de desvios obtidos [93].

Em ambos os casos, as cartas correspondem a representações gráficas onde são registados os valores medidos pelo laboratório em função do tempo, o que permite aferir visualmente as flutuações ou tendências nos resultados obtidos. Podem também ser registados os resultados obtidos por repetições de amostras ou desvios entre replicados, entre outros parâmetros [93,94].

3

Capítulo 3

Metodologia experimental

Neste capítulo, apresenta-se de forma detalhada, os equipamentos, reagentes e materiais utilizados, assim como os procedimentos experimentais utilizados na determinação do urânio por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo e na preparação das soluções utilizadas.

O método implementado neste trabalho foi utilizado na análise de amostras de águas de consumo e águas naturais. Foi utilizada água ultrapura para a preparação das soluções padrão obtida através de um sistema de purificação Milli-Q® IQ 7000, cujas características se encontram apresentadas na **Tabela 6**, especificamente, a temperatura, a condutividade e o carbono orgânico total (TOC).

Tabela 6 | Características da água obtida a partir do sistema de purificação Milli-Q® IQ 7000.

Temperatura (°C)	Condutividade (µS/cm)	TOC (ppb)
25	0,055	1,2

3.1. Materiais e Equipamentos

Na **Tabela 7** encontra-se apresentado o material volumétrico utilizado e a respetiva incerteza associada. Todo o material usado em ICP-MS é feito de um fluropolímero inerte, o perfluoroalcoxi alciano, PFA, específico para a análise de elementos traço, um polímero com boa estabilidade térmica e química.

Tabela 7 | Material utilizado na realização do procedimento experimental e respetivas incertezas.

Material	Capacidade (mL)	± Incerteza (mL)
Balões volumétricos	100	0,1
	500	0,25
Micropipetas	0,1	0,0014
	10	0,015
Tubos de Falcon	50	-

Todo o material utilizado ao longo do trabalho deve estar livre de contaminantes. Por esse motivo, o material afeto à área analítica do ICP-MS é lavado num programa adequado às características do material, sendo que este encontra-se no **Anexo 1**. Após a lavagem deve-se descontaminar o material, enchendo os balões volumétricos e tubos de Falcon com ácido nítrico a 10 %, durante pelo menos 24 horas. Passado esse tempo, esvazia-se e passa-se por água ultrapura.

Na **Tabela 8** apresenta os equipamentos utilizados ao longo do procedimento experimental, bem como a sua marca e modelo.

Tabela 8 | Equipamento utilizado na realização do trabalho experimental e respetiva marca e modelo.

Equipamento	Marca	Modelo
ICP-MS	Thermo Fisher Scientific	Thermo Scientific iCAP RQ
Amostrador automático	Teledyne Cetac	ASX-560

No ICP-MS utilizado, existem diferentes componentes, nomeadamente, um espectrómetro de massa do tipo quadrupolo, detetor do tipo multiplicador de iões, bomba peristáltica com doze cilindros, câmara de nebulização de quartzo (*baffled cyclonic*), nebulizador concêntrico de borossilicato da marca *Glass Expansion*, tocha de quartzo da *Glass Expansion* e *sampler* e *skimmer cones* de níquel da *Thermo Scientific*. Além disso, este tem equipado a si um amostrador automático, com capacidade para cento e vinte amostras e dez posições padrão para tubos de Falcon de 50 mL, assim como uma campânula com ventilação, *Teledyne Cetac* ENC-560C.

No *Thermo Scientific* iCAP RQ ICP-MS é possível fazer análises em dois modos, em modo *standard* (STD) e em modo célula de colisão (KED). O modo *standard* considera que não há sobreposição isobárica, nem formação de duplas cargas, sendo necessário o uso de equações de correção, assim como a correção do padrão interno no efeito matriz. Já em relação ao modo KED, utiliza-se o gás hélio como célula de colisão, tendo como função minimizar a formação de interferências poliatômicas, diminuindo a energia cinética destas.

3.2. Reagentes e gases

Os reagentes e soluções padrão comerciais utilizados ao longo do procedimento experimental, bem como as suas respetivas características encontram-se enumerados na **Tabela 9**.

O ácido nítrico 65 % p.a., foi destilado recorrendo a um destilador DST-1000, com o objetivo de se obter uma qualidade superior deste.

Para a realização deste trabalho experimental utilizaram-se dois gases, o árgon como gás nebulizador, gás auxiliar e gás do plasma, com uma pureza superior a 99,999%, e o gás hélio para a célula de colisão, também de pureza superior a 99,999%.

Tabela 9 | Reagentes utilizados durante a realização do procedimento experimental.

Reagente	Pureza (%)	Matriz	Marca	Lote	C ± U (mg/L)
Ácido nítrico	65	-	Merck	K542656	-
Padrão comercial de urânio	99,96	2 % HNO ₃	CPA chem	862620 902036	1001,2 ± 2,9 1001,2 ± 2,9
Solução de padrão interno de bismuto	99,95	5 % HNO ₃	CPA chem	733624	10,009 ± 0,040
Solução tune	99,99	2,5 % HNO ₃ 0,5 % HCl	CPA chem	864720	Bário (Ba) 0,00099 ± 0,00001
					Bismuto (Bi) 0,00101 ± 0,00001
					Célsio (Ce) 0,00101 ± 0,00001
					Cobalto (Co) 0,00098 ± 0,00001
					Índio (In) 0,00100 ± 0,00001
					Lítio (Li) 0,00098 ± 0,00001
					Urânio (U) 0,00099 ± 0,00001
Material de referência de urânio	-	0,2 % HNO ₃	Canada	0622	0,00182 ± 0,00014

3.3. Preparação de soluções

3.3.1. Preparação da solução de padrão interno de bismuto (5 µg Bi/L)

Retirar para um balão volumétrico de 500 mL, 5 mL de ácido nítrico destilado e 250 µL da solução comercial padrão interno de bismuto e perfazer o volume com água ultrapura.

3.3.2. Preparação da solução de lavagem (2 % HNO₃ v/v)

Diluir 10 mL de ácido nítrico destilado, num balão volumétrico de 500 mL e perfazer com água ultrapura.

3.3.3. Preparação do branco de trabalho (1 % HNO₃ v/v)

Diluir 5 mL de ácido nítrico destilado, num balão volumétrico de 500 mL e perfazer com água ultrapura. O branco de trabalho é comumente chamado de branco de reagente.

3.3.4. Preparação de soluções e padrões utilizados para a curva de calibração

a) Solução intermédia 1 (2000 µg U/L)

Medir para um balão volumétrico de 500 mL, 1 mL de solução padrão comercial de urânio e 5 mL de ácido nítrico destilado (1 % v/v) e, por fim, perfazer o volume com água ultrapura. Solução com validade de um mês, quando conservada no frigorífico.

b) Solução intermédia 2 (100 µg U/L)

Diluir 25 mL da solução intermédia 1 (2000 µg U/L), num balão volumétrico de 500 mL, com 5 mL de ácido nítrico destilado (1 % v/v) e perfazer o volume com água ultrapura. Solução com validade de um mês, quando conservada no frigorífico.

c) Soluções padrão para a curva de calibração

Em balões volumétricos de 100 mL, medir os volumes indicados na **Tabela 10** da solução intermédia 2 (100 µg U/L), juntamente com 1 mL de ácido nítrico destilado (1 % v/v) e perfazer o volume com água ultrapura, de forma a obter as concentrações estipuladas. Na **Tabela 10** são também apresentadas as concentrações estipuladas para cada padrão com as respetivas incertezas expandidas. Todas as soluções padrão para a curva de calibração foram preparadas diariamente.

As incertezas expandidas foram determinadas recorrendo à metodologia passo-a-passo, como exemplificado para o padrão de menor concentração de urânio no **Anexo 2**.

Tabela 10 | Concentrações das soluções padrão utilizadas no traçado da curva de calibração e respetivas incertezas, sendo também apresentado os volumes da solução intermédia 2 utilizados para a preparação dos padrões.

Padrão	Volume_{sol. intermédia 2} (mL)	C ± U (µg U/L)
1	0,1	0,10012 ± 9,3 × 10 ⁻⁴
2	0,2	0,2002 ± 1,5 × 10 ⁻³
3	0,4	0,4005 ± 2,8 × 10 ⁻³
4	0,8	0,8010 ± 5,4 × 10 ⁻³
5	2,0	2,002 ± 1,5 × 10 ⁻²
6	5,0	5,006 ± 3,5 × 10 ⁻²

3.3.5. Preparação de soluções e padrões utilizados para o controlo de qualidade

a) Solução intermédia 1 (2000 µg U/L)

Medir para um balão volumétrico de 500 mL, 1 mL de solução padrão comercial de urânio e 5 mL de ácido nítrico destilado (1 % v/v) e, por fim, perfazer o volume com água ultrapura. Validade de um mês, quando conservada no frigorífico.

b) Solução intermédia 2 (100 µg U/L)

Diluir 25 mL da solução intermédia 1 (2000 µg U/L), num balão volumétrico de 500 mL, com 5 mL de ácido nítrico destilado (1 % v/v) e perfazer o volume com água ultrapura. Validade de um mês,

quando conservada no frigorífico.

c) Soluções padrão de controlo da curva de calibração

Em balões volumétricos de 100 mL, medir os volumes indicados na **Tabela 11** da solução intermédia 2 (100 µg U/L), juntamente com 1 mL de ácido nítrico destilado (1 % v/v) e perfazer o volume com água ultrapura, de forma a obter as concentrações estipuladas. Na **Tabela 11** são também apresentadas as concentrações estipuladas para cada padrão com as respetivas incertezas expandidas.

Todas as soluções padrão de controlo da curva de calibração foram preparadas diariamente.

Tabela 11 | Concentrações das soluções padrão controlo e respetivas incertezas, sendo também apresentado os volumes da solução intermédia 2 utilizados para a preparação dos padrões..

	V_{sol. intermédia 2} (mL)	C ± U (µg U/L)
Controlo 1	0,1	0,10012 ± 9,3 × 10 ⁻⁴
Controlo 2	0,6	0,6007 ± 4,1 × 10 ⁻³
Controlo 3	5,0	5,006 ± 3,5 × 10 ⁻²

3.4. Condições experimentais

O analito em estudo, o urânio, foi analisado em diferentes matrizes, nomeadamente, em águas de consumo humano (ACH) e em águas doces naturais superficiais (ADNSup) e subterrâneas (ADNSub).

Tabela 12 | Especificações das condições definidas do ICP-MS e do amostrador automático.

Parâmetro	Especificação
<i>Wash time</i>	30 segundos
<i>Uptake time</i>	180 segundos
Leituras por amostra	3
Velocidade da bomba	40 rpm
Fluxo do gás do plasma	14,0 L.min ⁻¹
Fluxo do gás auxiliar	0,80 L.min ⁻¹
Fluxo do gás nebulizador	1,10 L.min ⁻¹
Potência RF	1550,0 W
Modo de trabalho	KED
Temperatura da sala	18 a 21 °C

Como já referido, a análise foi realizada num ICP-MS, tendo em especial atenção as condições experimentais que se encontram definidas na **Tabela 12**. Ter em atenção que o fluxo do gás nebulizador apresentado é um valor médio (1,09 e 1,10 L.min⁻¹) pois este varia consoante os testes realizados no início de cada série de trabalho para se obter o melhor desempenho. As instruções de funcionamento do equipamento encontram-se apresentadas no **Anexo 3**.

3.5. Procedimento experimental

3.5.1. Estudo do padrão interno

O estudo do padrão interno foi realizado com duas amostras fortificadas, em matrizes diferentes (ACH e ADN). As amostras fortificadas foram preparadas em balões volumétricos de 500 mL. Adicionou-se então, 0,5 mL de solução intermédia 2 (100 µg U/L), de forma que a solução preparada apresente uma concentração de urânio equivalente ao padrão referente ao limite de quantificação e 25 mL de cada possível analito interferente e maioritários (Ca, Na, Mg, Cl e K). Em seguida, preparou-se uma solução de padrão interno, como descrito na secção **3.3.1**.

Após a preparação das soluções, faz-se a análise, em separado, para cada uma das amostras. A amostra é colocada em *vials* próprios com capacidade de 10 mL no amostrador automático. Em seguida, adquire-se as contagens por segundo de cada amostra, durante um período de tempo, que represente uma série de trabalho no dia a dia.

Com os resultados obtidos traçou-se um gráfico contagens normalizadas/tempo e pela visualização do gráfico foi possível proceder à escolha do padrão interno que melhor se adequa à determinação do urânio.

3.5.2. Estudo de interferências

O software utilizado pelo ICP-MS, Qtegra ISDS 2.8, corrige as interferências isobáricas conhecidas, no entanto, não atua sobre possíveis interferências poliatómicas que possam existir.

Assim, o Laboratório, por norma, identifica quais os possíveis interferentes poliatómicos de maior relevância e, em seguida, verifica experimentalmente a presença destes. Para isso, o Laboratório, normalmente, prepara várias amostras analíticas com concentrações crescentes de cada interferente que são analisadas em modo STD e em modo KED, com o objetivo de verificar se o analito em estudo possui interferentes poliatómicos e se é necessário usar o modo KED nas análises de rotina.

Contudo, um dos objetivos do Laboratório é começar a analisar todos os elementos já implementados em modo KED, por razões de logística e de economia de recursos e tempo. Por essa razão, o urânio foi analisado em modo de célula de colisão (KED).

Assim, realizou-se 10 ensaios de recuperação, para cada uma das matrizes em estudo, de forma a avaliar a seletividade do método.

3.5.3. Curva de calibração

Para a construção da curva de calibração, utilizou-se as soluções padrão indicadas na **Tabela 10**. A leitura de cada uma das soluções padrão foi feita através da transferência das soluções para tubos de Falcon (50 mL) colocados no amostrador automático, conectado ao ICP-MS, nas condições apresentadas na **Tabela 12**. Além das soluções padrão, realizou-se a leitura do branco de trabalho, uma vez que o software está programado para ajustar a ordenada na origem para interceptar o eixo no valor obtido do branco de trabalho.

3.5.4. Amostras

As amostras foram transferidas para *vials* próprios (≈ 5 mL) e colocadas no amostrador automático, em duplicado. Além disso, também foram feitas leituras das amostra diluídas (1:5), em que se pipetou 4 mL de água acidificada com ácido nítrico (1 % HNO_3) e 1 mL de amostra a diluir, em duplicado.

3.5.5. Ensaios de recuperação

Nos ensaios de recuperação, foi necessário diluir a amostra nos *vials* próprios, para isso, pipetou-se 4 mL de água acidificada com ácido nítrico (1 % HNO_3) e 1 mL de amostra a fortificar. Após a diluição feita, adicionou-se 0,1 $\mu\text{g U/L}$ da solução intermédia 2 (100 $\mu\text{g U/L}$) (**3.3.5 b**). A concentração da fortificação foi de 1,96 $\mu\text{g U/L}$.

3.5.6. Material de colheita, colheita e transporte de amostras

Assim como o material afeto à área analítica do ICP-MS, a lavagem do material de colheita utilizado é lavado na máquina utilizando um programa de temperatura acima de 55 °C.

Após a lavagem, deve-se encher completamente os recipientes com uma solução de ácido nítrico 10 %, sendo que estes devem estar nesta solução pelo menos 24 horas. Em seguida, deve-se esvaziar os recipientes e enxaguar com água ultrapura e rolar.

As amostras foram colhidas em frascos de plástico de 500 mL, devidamente descontaminados. Os frascos foram enxaguados com a amostra e completamente cheios, minimizando a agitação da amostra durante o seu transporte.

Posteriormente, as amostras foram transportadas para o Laboratório e procedeu-se, rapidamente, à sua preservação acidificando as amostras a $1 < \text{pH} < 2$, com ácido nítrico.

3.6. Análise e apresentação de resultados

Todos os resultados foram obtidos com recurso ao software Qtegra ISDS 2.8 SR1 (Revision B, 2017), que forneceu os dados em termos de contagens por segundo (cps) e de concentrações ($\mu\text{g U/L}$), sendo que, posteriormente, procedeu-se ao tratamento de resultados no Microsoft Excel.

Com o objetivo de detetar valores discrepantes, foi realizado o teste de *Grubbs* (**Equação 45**).

$$G = \frac{|x_s - \bar{x}|}{s} \quad \textbf{Equação 45}$$

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

Este teste pressupõe à priori que a distribuição seja normal e que, portanto, devem ser rejeitadas as réplicas que ultrapassem os limites imposto pelo desvio padrão. Além disso, no caso dos valores das contagens por segundo obtidos para os padrões da curva de calibração, também se avaliou os seus valores, sendo que são rejeitados os valores que cumpram o critério $|y_i - \hat{y}_i| > 2S_{y/x}$

4

Capítulo 4

Apresentação e discussão dos resultados

Neste capítulo encontram-se apresentados e discutidos os resultados obtidos, assim como as metodologias implementadas para a validação da determinação de urânio por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma indutivo (ICP-MS).

A determinação de urânio por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo teve por base o método descrito na norma ISO 17294-1: *Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), Part 1: General guidelines* e a ISO 17294-2: *Water quality – Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes*.

4.1. Estabelecimento das condições analíticas

Para iniciar o processo de validação do método de determinação do urânio por ICP-MS foi necessário proceder à realização de estudos que incluem a seleção do isótopo de trabalho para o elemento em análise, a seleção do padrão interno mais adequado e o estudo de possíveis interferentes.

4.1.1. Seleção do isótopo

A massa atômica analítica foi selecionada com base na bibliografia existente para a análise elementar por ICP-MS. De acordo com a norma ISO 17294-2, os isótopos de urânio indicados são o 234, 235 e 238. A massa utilizada para análise quantitativa do urânio escolhida foi a massa 238, tendo como base uma ponderação entre a abundância isotópica e a massa onde a possibilidade de formação de interferentes poliatômicos e isobáricos é menor.

4.1.2. Verificação inicial do equipamento

A otimização instrumental inicial é automaticamente efetuada com uma solução tune (contendo os elementos Ba, Bi, Ce, Co, In, Li, U) e tem como objetivo atingir as melhores condições instrumentais para garantir as condições apropriadas à realização de uma análise.

Na otimização instrumental é efetuada uma verificação da resolução dos picos de massa, indicada pela resolução dos picos do cobalto (^{59}Co), índio (^{115}In), bismuto (^{209}Bi), urânio (^{238}U). Neste teste é verificada a calibração de massas, intensidade do sinal, a estabilidade das leituras e algumas interferências, sendo que os parâmetros avaliados e os critérios de aceitação foram definidos de acordo com as especificações do fabricante.

Depois de finalizada a otimização dos parâmetros mencionados, é gerado um relatório, o *Performance Report* – conhecido como Teste de sensibilidade onde é apresentado o resultado obtido para a otimização dos parâmetros de inicialização do equipamento. Um exemplo deste relatório encontra-

se no **Anexo 4**.

Nas **Tabelas 13, 14 e 15** apresentam-se os parâmetros avaliados e verificações feitas no *Performance test* bem como os critérios de aceitação para estes parâmetros.

Tabela 13 | Parâmetros avaliados no *Performance test* e respectivos critérios de aceitação, no que diz respeito à sensibilidade.

Parâmetro		Critério de aceitação
Background 4,5	<	0,5 cps
Background 220,7	<	2,0 cps
Cobalto (⁵⁹Co)	>	30000,0 cps
Índio (¹¹⁵In)	>	35000,0 cps
Bismuto (²⁰⁹Bi)	>	42500,0 cps
Urânio (²³⁸U)	>	85000,0 cps
⁵⁹ Co/ ³⁵ Cl ¹⁶ O	>	18,0
¹⁴⁰ Ce ¹⁶ O/ ¹⁴⁰ Ce	<	0,015

Tabela 14 | Critérios de aceitação para a estabilidade das leituras.

Analito	Critério de aceitação (%)
Cobalto (⁵⁹Co)	
Índio (¹¹⁵In)	2
Urânio (²³⁸U)	

Tabela 15 | Critérios de aceitação para o teste de calibração de massas.

Analito	Largura mínima do pico (m/z)	Largura máxima do pico (m/z)
Cobalto (⁵⁹Co)		
Índio (¹¹⁵In)	0,600	0,850
Urânio (²³⁸U)		

Após a verificação de todos os parâmetros e a garantia de que estão dentro do critério estabelecido, é possível proceder à realização da análise; caso contrário, será necessário reiniciar todo o processo. Se, mesmo após repetir a otimização, os parâmetros indicados não estiverem dentro dos

critérios estabelecidos, será necessário substituir os tubos utilizados para introduzir a solução teste e do padrão interno. Estes tubos podem não estar em condições adequadas para uso devido ao desgaste. Efetuada a troca dos tubos, será necessário reiniciar todo o processo de otimização desde o início. Caso os valores desejados ainda não sejam obtidos, será necessário lavar os *sampler* e *skimmer cones* e reiniciar novamente o processo de otimização. Nesse caso, é importante referir que pode ser necessário um tempo maior do que o habitual para atingir os valores ideais dos parâmetros em análise.

4.1.3. Seleção do padrão interno

Quando se pretende selecionar um elemento como padrão interno, é necessário garantir que este apresente um comportamento similar ao do analito. Para isso, a escolha é feita de forma que os valores da massa e a primeira energia de ionização sejam próximos dos valores do analito, neste caso o urânio. Ao escolher um padrão interno, é também importante ter em consideração a possível presença deste padrão na amostra, pois os elementos usados para este efeito devem estar presentes na amostra em teores negligenciáveis.

Para a seleção do padrão interno, foram escolhidos seis elementos para teste, que são frequentemente usados pelo Laboratório. Esses elementos incluem o lítio (^6Li), o germânio (^{73}Ge), o ítrio (^{89}Y), o ródio (^{103}Rh), o índio (^{115}In) e o bismuto (^{209}Bi).

Para escolher um padrão interno o Laboratório segue um procedimento que envolve a realização de um estudo experimental para averiguar o padrão interno que melhor se adequa à sua matriz e aos analitos que pretende determinar.

Este estudo consiste em adicionar uma quantidade de analito, que será quantificado juntamente com os elementos maioritários (Ca, Na, Mg, Cl e K) em concentrações semelhantes às encontradas nas amostras típicas. Esse processo é realizado em duas amostras reais com matrizes diferentes: água de consumo humano, ACH, e água doce natural, ADN. Depois, o padrão interno é adicionado conforme descrito no **Capítulo 3**.

A **Figura 12** apresenta a representação gráfica das contagens normalizadas em função do tempo/número de ensaios, para os elementos urânio (^{238}U), ródio (^{103}Rh), índio (^{115}In) e bismuto (^{209}Bi) nas duas matrizes diferentes, nomeadamente ACH e ADN.

A **Figura 12** representa apenas três dos elementos testados como possíveis padrões internos, pois o lítio, o germânio e o ítrio, foram imediatamente rejeitados devido às suas massas serem muito inferiores à do urânio. Assim, após análise gráfica, observa-se que o bismuto apresenta um

comportamento mais semelhante ao do urânio. Ambos apresentam massas semelhantes, 209 e 238 u, respetivamente, assim como energias de ionização similares, 703,0 e 597,8 kJ.mol⁻¹, respetivamente. Assim, o bismuto foi selecionado como o padrão interno para a análise do urânio.

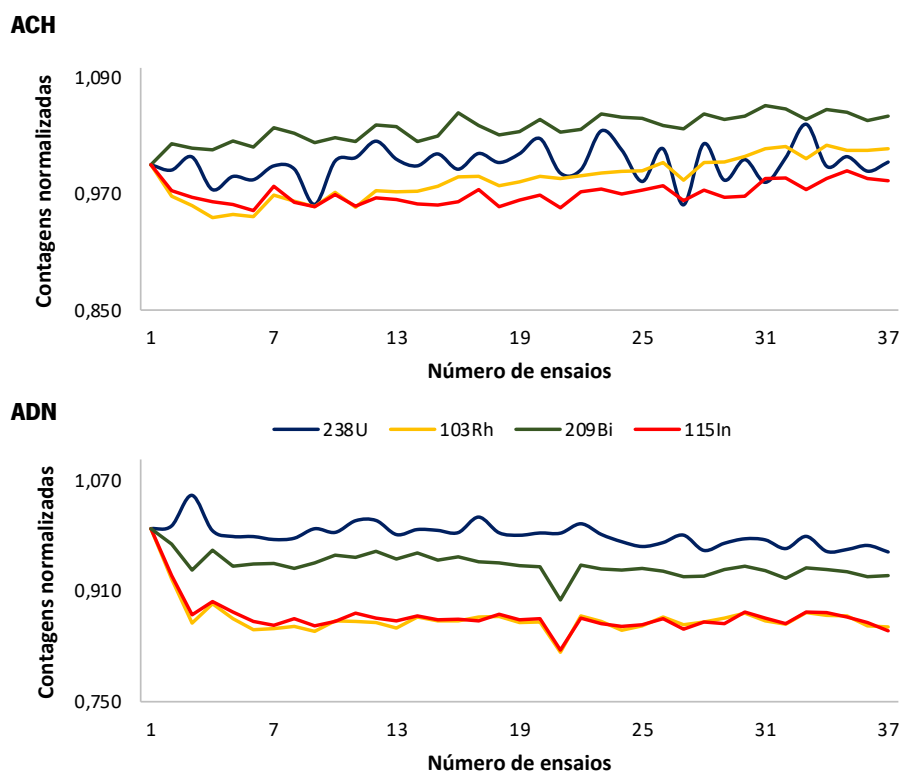


Figura 12 | Representação gráfica das contagens normalizadas em função do tempo/número de ensaios, para o urânio, ródio, índio e bismuto, em duas matrizes diferentes.

4.1.4. Estudo de interferências

Como referido anteriormente, o Laboratório pretendia incluir o urânio na análise utilizando uma análise em modo de célula de colisão (KED). Assim, foram realizados dez ensaios de recuperação nas três matrizes em estudo, de forma a avaliar a seletividade do método, conforme mostrado no ponto **4.2.6**.

4.2. Validação do método de determinação de urânio por ICP-MS

Para implementar e validar o método analítico, foram utilizados como referência, os seguintes guias: RELACRE nº 3, “Validação de Resultados em Laboratórios Químicos”, RELACRE nº 13, “Validação de Métodos Internos de Ensaios em Análise Química”, RELACRE nº31, “Quantificação de incerteza de

medição em ensaios químicos e físico-químicos”, e o guia Eurachem, “The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”, juntamente com o documento “ITL_0002” do Laboratório, que estabelece as regras para a implementação e validação de metais por ICP-MS.

Deste modo, os parâmetros de desempenho foram caracterizados, incluindo a gama de trabalho, linearidade, sensibilidade, seletividade, limiares analíticos (limite de detecção e limite de quantificação), repetibilidade e precisão intermédia, justeza e incerteza de medição. Concluído o processo de validação do método interno, o procedimento do controlo de qualidade foi implementado, utilizando as cartas de aceitação utilizadas pelo Laboratório, e de forma complementar, as cartas de controlo.

4.2.1. Análise de dados ICP-MS e estratégias de calibração

A calibração é o processo de determinação das respostas do equipamento para concentrações conhecidas de analito e, ao fazê-lo, permite que as concentrações da amostra sejam quantificadas.

Existem vários métodos de calibração, sendo um deles, a calibração externa, que utiliza um conjunto de padrões separados de concentração conhecida para gerar uma curva de calibração da resposta do instrumento. No entanto, este método não leva em conta os efeitos induzidos pela matriz.

Posto isto, uma boa maneira de compensar os efeitos de matriz é combinar a calibração externa com a padronização interna. Este é o método de calibração mais utilizado em ICP-MS e envolve a adição de um ou mais elementos a todas as soluções medidas (brancos, padrões de calibração, padrões de controlo de qualidade, amostras desconhecidas, etc.) com a mesma concentração. Espera-se que a resposta desse elemento seja a mesma durante todo o ensaio, de modo que qualquer variação seja considerada derivada do efeito de matriz. Um fator de correção é calculado a partir da resposta relativa do padrão interno, nomeadamente o bismuto, pelo software Qtegra ISDS. Este fator de correção é então aplicado aos analitos, neste caso, o urânio, para corrigir os efeitos de matriz.

Na **Figura 13** é visível as representações gráficas da resposta relativa do bismuto, ao longo de uma série de trabalho, do dia 23 de maio de 2023, bem como o fator de correção aplicado ao urânio.

Atendendo a **Figura 13**, verifica-se claramente que a resposta relativa do bismuto, ao longo de toda a série, encontra-se dentro do critério de aceitação estipulado pelo Laboratório, para aceitação do padrão interno de 80 a 120 %.

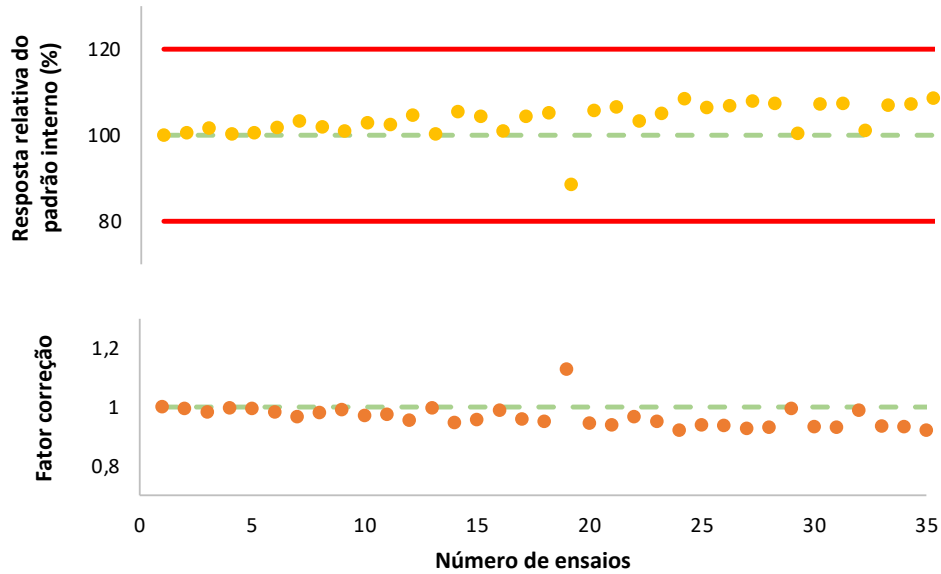


Figura 13 | Representações gráficas da resposta relativa do padrão interno, bismuto, ao longo de uma série de trabalho e do fator de correção aplicado ao analito, urânio.

Além disso, uma vez que o equipamento faz três leituras para cada ensaio, e que o software calcula automaticamente a média desses valores, assim como, o coeficiente de variação (**CV**), o Laboratório estabeleceu um critério de aceitação de 10 %, para o coeficiente de variação.

Na **Tabela 16** apresenta para três soluções de controlo de qualidade, as leituras obtidas pelo software, assim como, os desvios padrão relativos.

Tabela 16 | Valores de concentração obtidos, para as três leituras efetuadas pelo software, para três níveis de concentração, com os respetivos coeficientes de variação (CV).

Padrão ($\mu\text{g U/L}$)	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	CV (%)
0,10012	0,11002	0,10720	0,10680	1,6
0,6007	0,6352	0,5952	0,6056	3,4
5,006	5,044	4,959	4,871	1,7

Posto isto, verifica-se através da **Tabela 16**, que para os três casos apresentados, os CV encontram-se abaixo de 10 %, sendo este o de critério de aceitação definido pelo Laboratório. Caso algum, CV fosse superior a 10 %, o valor mais discrepante entre as três réplicas seria rejeitado.

4.2.2. Curva de calibração

Iniciou-se o processo de validação do método, ao traçar da curva de calibração. Representou-se as contagens por segundo corrigidas (cps) para o urânio em função da concentração de seis soluções padrão dentro da gama de concentrações definidas, juntamente com o branco de trabalho.

A gama de trabalho utilizada neste trabalho, foi selecionada tendo em conta a Diretiva (UE) 2020/2184, o Decreto-Lei n.º 69/2023 e as gamas de concentração comuns nas amostras de rotina do Laboratório, sendo que, assim a gama de trabalho definida para o urânio foi de 0,1 µg U/L a 5,0 µg U/L.

Os resultados foram registados na **Tabela 17** com as concentrações e respetivas incertezas expandidas e desvios padrão (**S**). Na **Tabela 42 (Anexo 5)** estão apresentadas as contagens por segundo obtidas pelo software, assim como os fatores de correção.

Tabela 17 | Valores de concentração e contagens por segundo corrigidas utilizados para a construção da curva de calibração, assim como o respetivo desvio padrão.

C ± U (µg U/L)	Contagens por segundo corrigidas (cps)	S (cps)
0	22,2	8,4
0,10012 ± 9,3 × 10⁻⁴	261,1 × 10 ²	1,2 × 10 ²
0,2002 ± 1,5 × 10⁻³	502,0 × 10 ²	6,4 × 10 ²
0,4005 ± 2,8 × 10⁻³	96,7 × 10 ³	4,5 × 10 ³
0,8010 ± 5,4 × 10⁻³	192,4 × 10 ³	7,2 × 10 ³
2,002 ± 1,5 × 10⁻²	481,0 × 10 ³	7,9 × 10 ³
5,006 ± 3,5 × 10⁻²	120,6 × 10 ⁴	3,8 × 10 ⁴

As incertezas expandidas, como já referido anteriormente, foram determinadas recorrendo à metodologia passo-a-passo, como demonstrado no **Anexo 2**.

A **Figura 14** apresenta um exemplo da curva de calibração obtida no dia 23 de maio de 2023, utilizando um modelo linear, em que a ordenada na origem é forçada a intercepar o valor obtido na leitura do branco de trabalho. Na **Figura 14** também são apresentadas as barras de erro dadas pelos respetivos desvios padrão (**S**).

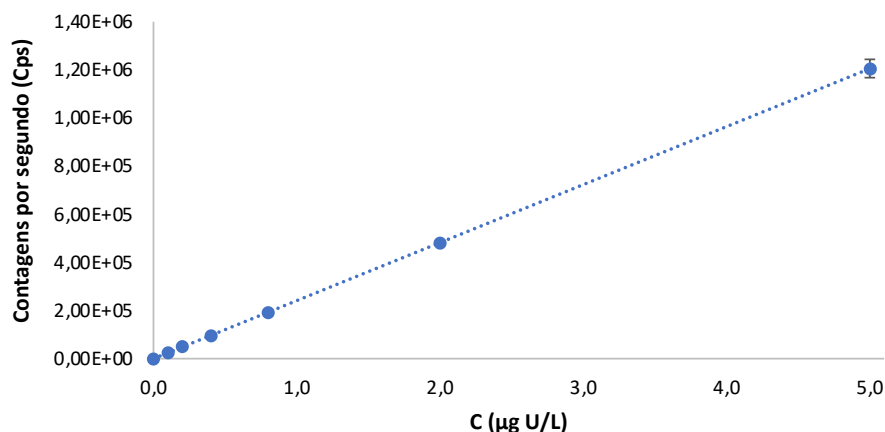


Figura 14 | Representação gráfica da curva de calibração das contagens por segundo (cps) em função da concentração de urânio ($\mu\text{g U/L}$), com os respectivos desvios padrão.

A curva de calibração representada na **Figura 14**, apresenta como equação, $I \text{ (cps)} = 241039,8 \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + 22,2$ e coeficiente de determinação (R^2), 0,999997, ou seja, é possível aferir um elevado ajuste, isto porque o Laboratório considera satisfatório sempre que, $R^2 \geq 0,9990$.

A partir do traçado da curva de calibração foi também possível estimar o valor da incerteza associada ao declive e à ordenada na origem, bem como o valor do desvio padrão e coeficiente de variação do método, exposto na **Tabela 18**.

Tabela 18 | Intervalos de confiança da ordenada na origem (tS_0) e do declive (tS_b) da curva de calibração, para 95 % de probabilidade, assim como os valores obtidos do desvio padrão do método (S_m) e o coeficiente de variação do método (CV_m).

$a \pm tS_a \text{ (cps)}$	$b \pm tS_b \text{ (cps L } \mu\text{g}^{-1})$	$S_m \text{ (}\mu\text{g U/L)}$	$CV_m \text{ (%)}$
$(0,2 \pm 7,0) \times 10^2$	$(241,0 \pm 1,4) \times 10^3$	0,0050	0,41

Atendendo aos valores obtidos na **Tabela 18**, é possível verificar que a origem está contida no intervalo de confiança da ordenada na origem, verificando-se também que, o coeficiente de variação do método encontra-se bastante abaixo dos 10 % definidos pelo Laboratório, o permite verificar a qualidade dos resultados e demonstrando a baixa dispersão destes.

No **Anexo 6** é apresentado as equações das curvas de calibração obtidas, ao longo do tempo, com os respetivos intervalos de confiança na origem e do declive, e os respetivos coeficientes de determinação.

Para complementar e verificar a estabilidade das curvas de calibração ao longo do tempo, foi construída uma carta de controlo de indivíduos com o objetivo de monitorizar os declives das curvas obtidas ao longo do trabalho.

Na **Tabela 44 (Anexo 7)** são apresentados os valores utilizados para a construção da carta de controlo exibida na **Figura 15**.

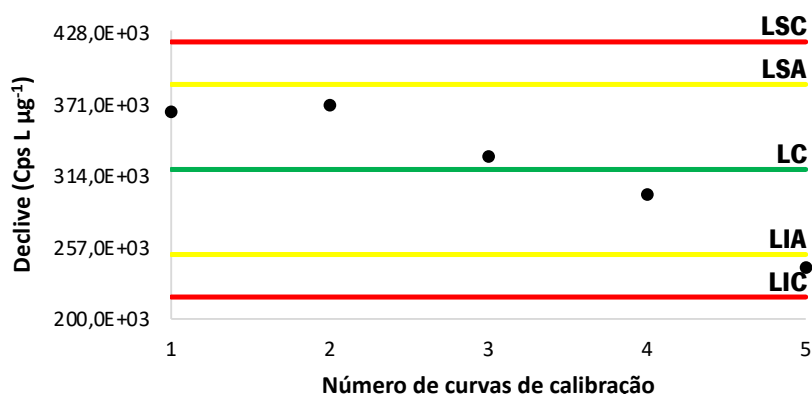


Figura 15 | Carta de controlo de indivíduos para a monitorização do declive (cps L µg⁻¹) das curvas de calibração.

A partir da análise da **Figura 15**, verifica-se que todos os pontos experimentais encontram-se dentro dos limites de controlo. Assim, é possível concluir que os declives encontram-se sob controlo e que a estabilidade esta assegurada, uma vez que os pontos experimentais se encontram distribuídos aleatoriamente, dentro dos limites de controlo.

4.2.3. Linearidade

A linearidade assume uma relevância sustentada após o traçado da curva de calibração, pois permite a verificação da capacidade de o método fornecer resultados proporcionais às concentrações do analito. Assim, o Laboratório avalia a linearidade pelo coeficiente de determinação, sendo que o Laboratório deverá avaliar pelo menos cinco curvas de calibração com um coeficiente de determinação ($R^2 \geq 0,9990$).

Posto isto, avaliou-se a linearidade de dez curvas de calibração, onde foi possível a obtenção de parâmetros, tais como, o coeficiente de determinação (R^2), coeficiente de correlação (r) e o valor do teste t , apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19 | Resultados obtidos através da análise de dez curvas de calibração, com o intuito de avaliar a linearidade.

Coeficiente de determinação (R^2)	Coeficiente de correlação (r)	t
0,99997	0,99998	382,539

Tendo em conta os parâmetros obtidos na **Tabela 19** e a análise visual da **Figura 14**, é possível concluir que existe uma elevada linearidade. Esta conclusão é sustentada pela média dos coeficiente de determinação obtido, que é igual a 0,99997, sendo este superior ao definido pelo Laboratório ($R^2 \geq 0,9990$). Através do coeficiente de correlação obtido (0,99998), também é comprovado que existe linearidade, pois atendendo os critérios de linearidade estabelecidos pelo Guia REACRE 13, as curvas de calibração, geralmente, devem apresentar valores de coeficientes de correlação superiores a 0,995. Para corroborar estas avaliações, realizou-se um teste de significância para a correlação, em que se conclui que existe correlação entre as abscissas e as ordenadas, uma vez que o valor de t obtido, apresenta-se superior ao valor tabelado (2,571).

A análise dos gráficos de resíduos é uma outra forma de verificar a linearidade da curva de calibração, pois estes informam acerca do desvio da curva de calibração ao padrão e podem também revelar alguma tendência.

A **Figura 16 (A)** representa os valores do sinal de resíduos em função do valor do sinal estimado ($\hat{y}_i$) e na **Figura 16 (B)** é apresentado o mesmo, mas os resíduos são apresentados em percentagem relativa.

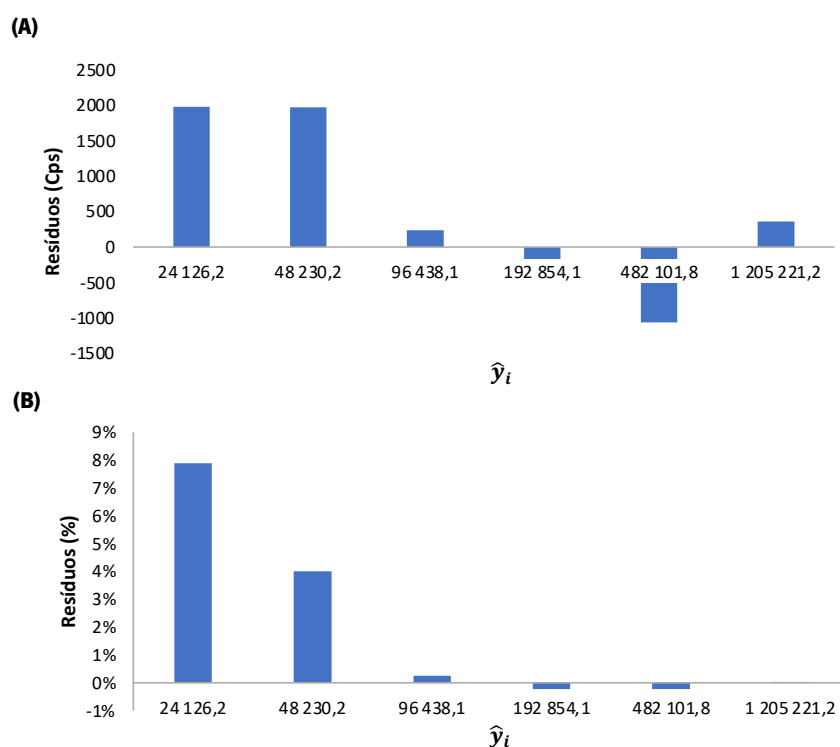


Figura 16 | Gráficos de resíduos da curva de calibração do urânio com **(A)** sinal absoluto do resíduo; **(B)** sinal do resíduo em percentagem relativa.

Ao analisar as representações gráficas da **Figura 16 (A)** e **(B)**, observa-se que nenhum dos padrões apresenta um desvio à curva de calibração superior a 10 %, valor geralmente tido como

referência. Não foram verificadas tendências de variação, ou seja, não foi detectada a existência de um erro sistematicamente superior ou inferior.

Além das formas apresentadas, o Teste de *Mandel* também pode ser utilizado para avaliar a linearidade de um método, em que faz a comparação entre o ajuste dos valores experimentais tendo em consideração uma regressão linear e uma função quadrática.

Na **Tabela 20** encontram-se os parâmetros utilizados para a aplicação do Teste de *Mandel*, calculados a partir das **Equações 4, 8, 9 e 10**.

Tabela 20 | Valores obtidos e utilizados na aplicação do Teste de Mandel, com o intuito de confirmar a linearidade.

$S_{y/x}$	S_{y^2}	DS^2	PG
1205,652	978,264	3,440	3,595

Tendo em conta os parâmetros apresentados na **Tabela 20**, é possível concluir que a função de calibração de melhor ajuste é a linear, ou seja, a função polinomial não traduz um melhor ajuste dos pontos experimentais, uma vez que o valor do teste PG é inferior ao valor de F tabelado da distribuição de *Fisher-Snedecor* (7,709).

4.2.4. Sensibilidade

A sensibilidade de um método relaciona-se com a menor variação mínima necessária na grandeza a medir, ou seja, a concentração, para se obter uma variação significativa do resultado da medição, isto é, no sinal.

No caso do ICP-MS, o Laboratório avalia a sensibilidade pelo número mínimo de contagens obtidas na realização do teste de sensibilidade (*Performance Test*) e não pela primeira derivada da curva de calibração (declive).

A **Figura 17** demonstra o desempenho do equipamento durante o processo de validação, tendo em conta as contagens mínimas definidas pelo fabricante para os elementos cobalto (^{59}Co), índio (^{115}In), bismuto (^{209}Bi), urânio (^{238}U), como apresentado na **Tabela 13**, do **Capítulo 4**. O Laboratório estabeleceu a realização de pelo menos dez determinações de sensibilidade.

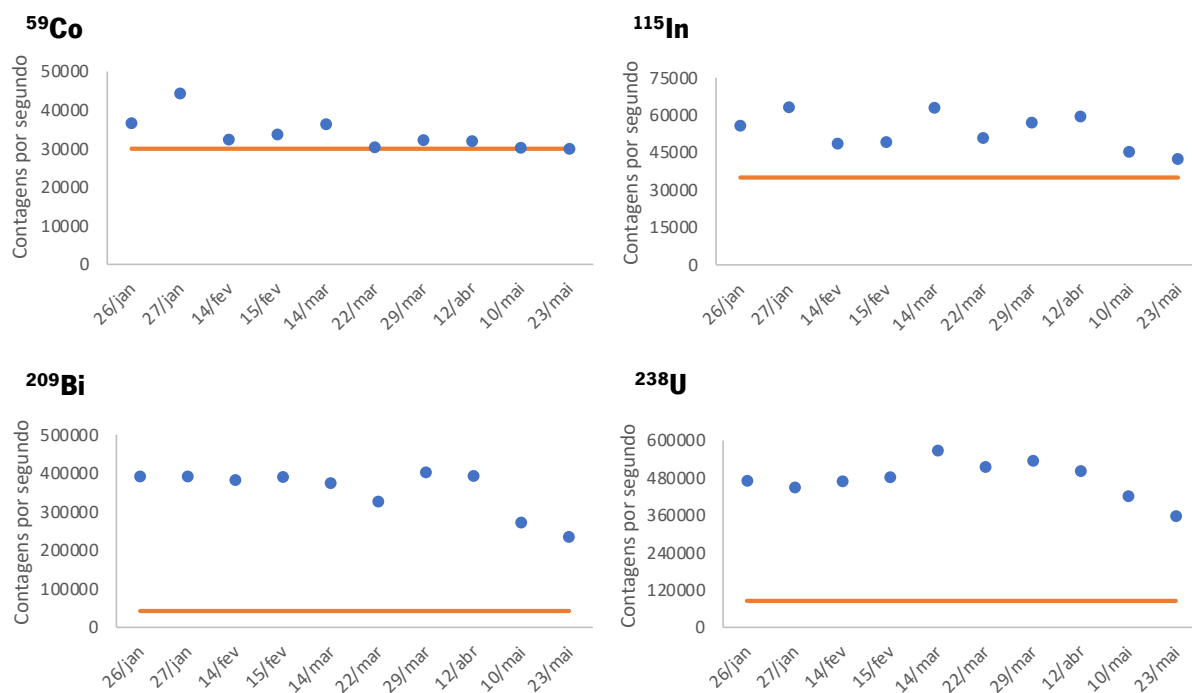


Figura 17 | Gráficos do desempenho da sensibilidade, ao longo do tempo, para os elementos cobalto (^{59}Co), índio (^{115}In), bismuto (^{209}Bi) e urânio (^{238}U).

Pela observação da **Figura 17** verifica-se que em toda a gama de massas analisadas o *Performance test* atende aos critérios estabelecidos, uma vez que as contagens obtidas para todos os elementos estão acima do estabelecido.

No ICP-MS, uma das limitações mais significativas é a formação de óxidos, sendo por esse motivo também importante monitorizar a relação $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ nos *Performance tests*, como já referido anteriormente. A **Figura 18** demonstra o desempenho do equipamento, quanto à formação de óxidos durante o processo de validação.

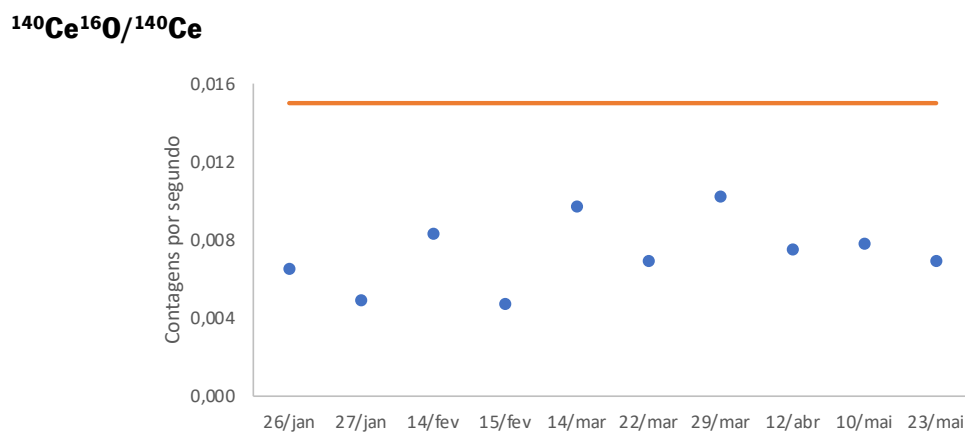


Figura 18 | Gráficos da monitorização da formação de óxidos ($^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$), ao longo do tempo.

Atendendo os resultados obtidos da monitorização da formação de óxidos (**Figura 18**) é visível que os valores obtidos encontram-se abaixo dos critérios estabelecidos. Isto indica que a formação de óxidos é residual e dentro dos limites aceitáveis.

4.2.5. Seletividade

Depois de verificadas as possíveis interferências e selecionado o padrão interno, como é demonstrado no **subcapítulo 4.1.3**, o Laboratório tem como procedimento avaliar a seletividade. Este parâmetro é avaliado recorrendo a ensaios de recuperação, nos quais quantidades conhecidas de analito (amostra fortificada) são adicionadas a amostras reais que abrangeram toda a gama de trabalho, com diferentes matrizes, ao longo do tempo, de forma a ser o mais representativo possível da rotina do Laboratório.

Os resultados desses ensaios de recuperação realizados em amostras reais de três matrizes diferentes, como águas de consumo humano (ACH) e águas doce naturais superficiais (ADNSup) e subterrâneas (ADNSub) estão apresentados na **Tabela 46 (Anexo 8)**.

A partir dos resultados obtidos na **Tabela 46 (Anexo 8)** foram calculados os valores de recuperação média e os respetivos desvios padrão (**S**), apresentados na **Tabela 21**.

Tabela 21 | Taxa de recuperação média obtida em dez ensaios de recuperação, em três matrizes diferentes (águas de consumo humano (ACH) e águas doce naturais superficiais (ADNSup) e subterrâneas (ADNSub)).

	Taxa de recuperação (%)	S (%)
Água de consumo humano	100,4	3,6
Água doce natural superficial	105,8	4,0
Água doce natural subterrânea	103,7	1,4

Com base na análise dos resultados expostos na **Tabela 21**, é possível observar que as taxas de recuperação média obtidas, para as três matrizes analisadas estão compreendidas dentro do intervalo de aceitação estabelecido pelo Laboratório (80 a 120 %). Assim, dado que as taxas de recuperação se encontram dentro do intervalo de aceitação e próximas de 100 % conclui-se que o método é seletivo nas matrizes estudadas, ou seja, tanto para águas de consumo humano quanto para águas doces naturais superficiais e subterrâneas, permitindo a determinação seletiva do urânio nessas amostras.

4.2.6. Limiares analíticos

Na etapa seguinte da validação do método, foi realizada a determinação dos limiares analíticos, o que permitiu avaliar as concentrações mais baixas de urânio possíveis que podem ser detetadas (LD) e quantificadas (LQ).

4.2.6.1. Limite de detecção

O Laboratório considera irrelevante a avaliação deste parâmetro para o ICP-MS, porém, este pode ser avaliado segundo é mostrado no **Capítulo 2**.

Na **Tabela 47 (Anexo 9)** estão apresentados os dados de concentração obtidos da análise feita em condições de precisão intermédia, ou seja, análises em dias diferentes, de uma série de dez brancos de trabalho. Através dos resultados obtidos na **Tabela 47 (Anexo 9)** foi possível determinar a média e o desvio padrão (**S**), sendo este de 0,00068 µg U/L, e assim calcular o limite de detecção do método, apresentado na **Tabela 22**. Na **Tabela 22**, além de apresentado o limite de detecção do método, é também apresentado o limite de detecção instrumental, uma vez que estamos perante uma calibração linear.

Tabela 22 | Valores obtidos para o limite de detecção do método e o limite de detecção instrumental.

Limite de detecção do método (ng U/L)	2,3
Limite de detecção instrumental (µg U/L)	0,017

De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 22**, pode-se afirmar que o método de determinação de urânio é capaz de detetar concentrações extremamente baixas, sendo estas, 2,3 ng U/L e 0,017 µg U/L, respetivamente, para o limite de detecção do método e o limite de detecção instrumental.

Se compararmos o limite de detecção do método obtido com os limites de detecção apresentados nos estudos da **Tabela 3** do **Capítulo 2**, verifica-se que o limite de detecção obtido esta dentro do esperado.

4.2.6.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método, normalmente corresponde ao padrão de calibração de

menor concentração (excluindo o branco). Assim, o limite de quantificação do método é de 0,1 µg U/L.

Na **Tabela 48 (Anexo 9)** são apresentados os dados de concentração obtidos da análise feita em condições de precisão intermédia, ou seja, análises em dias diferentes, de uma série de dez padrões de concentração igual ao limite de quantificação. Em seguida, com base nos resultados obtidos na **Tabela 48 (Anexo 9)** foi possível determinar o coeficiente de variação (**CV**) e o erro relativo (**Er**), apresentados na **Tabela 23**.

Tabela 23 | Valores obtidos após análise de dez padrões independentes de concentração igual ao limite de quantificação (0,10012 µg U/L), ao longo do tempo, para avaliação do limite de quantificação.

Coeficiente de variação (%)	3,0
Erro relativo (%)	1,4

A partir da análise dos resultados apresentados na **Tabela 23**, verifica-se que tanto o erro relativo (**Er**), como o coeficiente de variação (**CV**) obtidos, encontram-se abaixo do critério estabelecido de 10 % cumprindo os critérios especificados pelo Laboratório. Assim, conclui-se que o padrão de menor concentração utilizado para o traçado da curva de calibração é um limite de quantificação exequível para o método de determinação de urânio.

Além disso, assim como no limite de detecção, foi possível quantificar o limite de quantificação instrumental, uma vez que se trata de uma calibração linear, sendo este de 0,050 µg U/L.

Assim, atendendo os resultados obtidos é demonstrada a conformidade com o requisito estabelecido na Diretiva (EU) 2020/2184 e no Decreto-Lei n.º 69/2023, uma vez que esta Diretiva e este Decreto-Lei enunciam que o método de análise utilizado deve permitir, no mínimo, medir concentrações iguais ao valor paramétrico com um limite de quantificação, igual ou inferior a 30 % do valor paramétrico, ou seja, igual ou inferior a 9 µg U/L.

4.2.7. Precisão

Na validação de um método analítico, o Laboratório avalia a precisão sob uma condição específica, a precisão intermédia de forma a aferir o grau de concordância entre os valores obtidos. Além disso, foi possível avaliar a precisão em condições de repetibilidade, na forma de estudo complementar. A avaliação da precisão em condições de reprodutibilidade não foi realizada pois envolve a realização de ensaios em laboratórios distintos.

4.2.7.1. Repetibilidade

A avaliação da precisão em condições de repetibilidade foi efetuada para o urânio, através da análise de seis soluções independentes em três pontos da curva de calibração (limite de quantificação, padrão intermédio e padrão mais elevado) no mesmo dia. Os resultados obtidos com o intuito de avaliar a repetibilidade do método encontram-se apresentados na **Tabela 49 (Anexo 10)**.

Assim, com base na análise dos resultados expostos na **Tabela 49 (Anexo 10)**, foi possível calcular os parâmetros que determinam a repetibilidade do método, nomeadamente, o limite de repetibilidade (**r**), o desvio padrão (**S**), o coeficiente de variação (**CV**), bem como o erro relativo (**Er**), apresentados na **Tabela 24**.

Tabela 24 | Parâmetros de avaliação da precisão em condições de repetibilidade.

Padrão	0,10012 (µg U/L)	0,6007 (µg U/L)	5,006 (µg U/L)
C_{média} (µg U/L)	0,10161	0,6089	4,985
S (µg U/L)	0,0013	0,0064	0,050
r (µg U/L)	0,0037	0,018	0,14
CV (%)	1,3	1,1	1,0
Er (%)	1,8	1,5	0,81

Através da análise dos resultados na **Tabela 24**, verifica-se que o método apresenta um erro relativo (**Er**) e um coeficiente de variação (**CV**) para o urânio bastante reduzidos nos padrões analisados, cumprindo de forma muito satisfatória o critério de aceitação de 10 %. Além disso, é evidente que o coeficiente de variação diminui à medida que a concentração dos padrões aumenta, indicando que há uma maior variabilidade em concentrações menores, estando de acordo com o previsto.

Em relação ao limite de repetibilidade, este parâmetro indica o limite, com uma probabilidade de 95 %, abaixo do qual a diferença entre dois resultados obtidos em condições de repetibilidade, em ensaios independentes deve situar-se. Assim, em medições efetuadas no mesmo dia, a diferença entre dois duplicados deverá ser inferior a 0,0037, 0,018 e 0,14 µg U/L, para os padrões de concentração 0,10012, 0,6007 e 5,006 µg U/L, respetivamente.

4.2.7.2. Precisão Intermédia

A avaliação da precisão em condições de precisão intermédia foi realizada recorrendo à análise

de soluções independentes em diferentes dias, para três níveis de concentração. Esses níveis correspondentes ao padrão no limite de quantificação, a um padrão de concentração intermédia e ao padrão de concentração mais elevada da curva de calibração.

Com base nos resultados obtidos em termos de concentração, foram determinados a média, o desvio padrão (**S**), o limite de repetibilidade (**r**), o coeficiente de variação (**CV**) e o erro relativo (**Er**) para o urânio, com o intuito de avaliar o desempenho do método em termos de precisão, em condições de precisão intermédia. Os valores obtidos destes parâmetros encontram-se apresentados na **Tabela 25**.

Tabela 25 | Valores obtidos na análise de cinco conjuntos de cinco soluções independentes, para cada nível de concentração (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade), ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o urânio.

Padrão ($\mu\text{g U/L}$)		14/mar	22/mar	29/mar	12/abr	10/mai	Média
0,10012	C_{média} ($\mu\text{g U/L}$)	0,10553	0,10145	0,10283	0,10636	0,10586	0,10441
	S ($\mu\text{g U/L}$)	0,0016	0,0013	0,0020	0,0029	0,0015	0,0019
	r ($\mu\text{g U/L}$)	0,0046	0,0036	0,0055	0,0081	0,0043	0,0052
	CV (%)	1,6	1,3	1,9	2,7	1,4	1,8
	Er (%)	5,5	1,7	2,8	6,4	5,9	4,5
0,6007	C_{média} ($\mu\text{g U/L}$)	0,6099	0,5862	0,5990	0,6170	0,5993	0,6023
	S ($\mu\text{g U/L}$)	0,0067	0,0044	0,0073	0,0086	0,0049	0,0064
	r ($\mu\text{g U/L}$)	0,019	0,012	0,020	0,024	0,014	0,018
	CV (%)	1,1	0,75	1,2	1,4	0,81	1,1
	Er (%)	1,6	2,3	0,87	2,8	0,70	1,7
5,006	C_{média} ($\mu\text{g U/L}$)	5,022	4,914	4,967	5,106	4,981	4,998
	S ($\mu\text{g U/L}$)	0,026	0,035	0,048	0,11	0,056	0,054
	r ($\mu\text{g U/L}$)	0,073	0,099	0,13	0,29	0,16	0,15
	CV (%)	0,52	0,72	0,96	2,1	1,1	1,1
	Er (%)	0,44	1,7	0,86	2,2	0,96	1,2

Atendendo aos valores apresentados na **Tabela 25**, é possível aferir, para todos os níveis de concentração avaliados, o cumprimento de forma muito satisfatória do critério especificado pelo Laboratório para a precisão, uma vez que os valores obtidos de coeficiente de variação e erro relativo encontram-se abaixo dos 10 % requeridos.

O Laboratório recorre a um método simplificado para a determinação do valor da precisão intermédia. Os valores de concentrações obtidos ao longo do tempo para análises independentes, em cada uma das três concentrações da curva de calibração, encontram-se apresentados na **Tabela 50 (Anexo 11)**.

Assim, foi possível determinar diversos parâmetros, especificamente, o desvio padrão de precisão intermédia (**S_i**), o limite de precisão intermédia (**r_i**), o coeficiente de variação de precisão intermédia (**CV_i**) e o erro relativo (**Er**), através das **Equações 20, 22, 23 e 16**, respetivamente. Os valores obtidos encontram-se na **Tabela 26**, para as três concentrações estudadas.

Tabela 26 | Valores obtidos na análise de soluções independentes, para cada nível de concentração (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade), ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o urânio.

	0,10012 (µg U/L)	0,6007 (µg U/L)	5,006 (µg U/L)
S_i (µg U/L)	0,0028	0,012	0,086
r_i (µg U/L)	0,0078	0,034	0,24
CV_i (%)	2,7	2,0	1,7
Er (%)	4,5	1,7	1,2

Mediante a análise dos resultados obtidos na **Tabela 26**, verifica-se que os valores de precisão intermédia obtidos para os três níveis de concentração (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade) foram de 0,0028, 0,012 e 0,086 µg U/L.

Com o objetivo de estabelecer o valor máximo permitido de diferença entre duas réplicas dos padrões nos três níveis de concentrações estudados, independentemente do tempo decorrido entre leituras, foi necessário determinar o valor do limite de precisão intermédia. Deste modo, a diferença entre dois valores obtidos, para os três níveis de concentração avaliados (limite de quantificação, padrão intermédio e padrão de concentração mais elevada), deve ser inferior a 0,0078, 0,034 e 0,24 µg U/L, respetivamente.

Em relação ao coeficiente de variação, os valores obtidos, para os três níveis de concentração foram de 2,7, 2,0 e 1,7 %, respetivamente. Quanto ao erro relativo, os valores obtidos para as concentrações estudadas foram de 4,5, 1,7 e 1,2 %, respetivamente. Desta forma, com base na análise dos valores obtidos, conclui-se que o método em estudo demonstra precisão em condições de precisão intermédia para os três níveis de concentração avaliados, visto que estes parâmetros se revelaram consideravelmente inferiores 10 %, tal como definindo pelo Laboratório

O estudo efetuado permitiu verificar, quer na avaliação individual da repetibilidade, quer na avaliação da precisão intermédia, a tendência de diminuição do coeficiente de variação à medida que a concentração dos padrões aumenta, o que era esperado. Assim, o padrão de maior concentração apresenta o menor valor do coeficiente de variação, o padrão de menor concentração apresenta o maior valor de coeficiente de variação e o padrão de concentração intermédia apresenta um valor intermédio entre os dois anteriores.

Um procedimento alternativo para a determinação do valor da precisão intermédia, e de modo a complementar o estudo, é recorrer à ferramenta estatística da análise de variâncias (ANOVA) de fator único. Cada um dos cinco grupos de cinco soluções independentes foi avaliado em condições de repetibilidade dentro do grupo, no mesmo dia e em condições de precisão intermédia entre grupos, realizados em dias diferentes, para o urânio.

Assim, após a realização da ANOVA de fator único, foi possível determinar diversos parâmetros, especificamente, o desvio padrão de repetibilidade (S_r), o desvio padrão “entre grupos” (S_{between}) e o desvio padrão de precisão intermédia (S_i), através das **Equações 29, 30 e 31**, respetivamente. O limite de precisão intermédia (r) e o coeficiente de variação de repetibilidade (CV_r) e de precisão intermédia (CV_i), também foram determinados com base na análise da ANOVA de fator único. Os valores obtidos encontram-se na **Tabela 27**.

Tabela 27 | Resultados obtidos da precisão em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, para os três níveis de concentração avaliados (limite de quantificação, padrão intermédio e limite de aplicabilidade), para o urânio com auxílio à ANOVA unifatorial.

Padrão ($\mu\text{g U/L}$)	MQ_w ($\mu\text{g U/L}$)	S_r ($\mu\text{g U/L}$)	MQ_b ($\mu\text{g U/L}$)	S_{between} ($\mu\text{g U/L}$)	S_i ($\mu\text{g U/L}$)	r ($\mu\text{g U/L}$)	CV_r (%)	CV_i (%)
0,10012	$4,7 \times 10^{-6}$	0,0022	$2,3 \times 10^{-5}$	0,0019	0,0029	0,0081	2,1	2,8
0,6007	$4,3 \times 10^{-5}$	0,0066	$6,9 \times 10^{-4}$	0,011	0,013	0,037	1,1	2,2
5,006	$3,7 \times 10^{-3}$	0,061	$2,6 \times 10^{-2}$	0,066	0,090	0,25	1,2	1,8

Mediante a análise dos resultados obtidos na **Tabela 27**, verifica-se numa primeira fase, que os valores de precisão intermédia obtidos para os três níveis de concentração foram 0,0029, 0,013 e 0,090 $\mu\text{g U/L}$, respetivamente.

Foi também possível a obtenção dos valores de precisão em condições de repetibilidade, 0,0022, 0,0066 e 0,061 $\mu\text{g U/L}$, para os três níveis de concentração avaliados, respetivamente por ordem crescente de concentração, sendo que, estes valores demonstram a concordância entre os valores do

desvio padrão de repetibilidade apresentados na **Tabela 25** e os obtidos na análise estatística efetuada.

Com o objetivo de aferir o valor máximo permitido de diferença entre duas réplicas dos padrões dos três níveis de concentrações estudados, entre si, independentemente do tempo que decorra entre leituras, foi necessário determinar o valor do limite de precisão intermédia. Deste modo, a diferença entre dois valores obtidos, para os três níveis de concentração avaliados, deverá ser inferior a 0,0081, 0,037 e 0,25 µg U/L, respetivamente.

Os valores de coeficiente de variação de repetibilidade encontram-se também em conformidade com os resultados obtidos na avaliação individual da repetibilidade (**Tabela 25**). A caracterização da precisão em condições de repetibilidade a partir do coeficiente de variação deve ser efetuada, para cada um dos três níveis de concentração avaliados, segundo o maior valor obtido para esse parâmetro. Assim sendo, o CV, considerado para o padrão relativo ao limite de quantificação, padrão intermédio e ao padrão relativo ao limite de aplicabilidade é 2,1, 1,1 e 1,2 %, respetivamente. Desta forma, com base na análise dos valores obtidos para os coeficientes de variação de repetibilidade e precisão intermédia, é possível concluir que o método em estudo, é preciso em condições de precisão intermédia, para os três níveis de concentração avaliados, isto é, o padrão relativo ao limite de quantificação, padrão intermédio e o padrão relativo ao limite de aplicabilidade, visto que estes parâmetros se revelaram inferiores 10 %, tal como definindo pelo Laboratório.

Posto isto, através das duas formas de avaliar a precisão intermédia acima apresentadas, para os três níveis de concentração, verifica-se que os resultados são concordantes.

Além disso, o Laboratório também avalia a precisão intermédia através de duplicados de amostras. Na **Tabela 28** é apresentado o valor do desvio padrão de precisão intermédia (**S_i**), em duplicados de amostras, calculado através da **Equação 21**.

Tabela 28 | Valores obtidos na análise de duplicados de amostras, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia do método para o urânio.

S_i (µg U/L)	r (µg U/L)	CV (%)
0,018	0,050	1,8

Mediante a análise dos resultados obtidos na **Tabela 28**, verifica-se que os valores de precisão intermédia obtido para os duplicados de amostra foi de 0,018 µg U/L. Retira-se ainda que o coeficiente de variação obtido é de 1,8 %. Sendo assim é possível concluir que o método é preciso em condições de precisão intermédia, para duplicados de amostras, uma vez que este parâmetro se encontra abaixo de 10 %.

4.2.8. Justeza

A justeza é um parâmetro de desempenho que pode ser avaliado de diversas formas, tal como referido anteriormente, no **Capítulo 2**, nomeadamente, a realização de ensaios de recuperação, a utilização de materiais de referência certificados, MRC, e ainda a participação em ensaios interlaboratoriais, EIL.

Neste trabalho, para avaliar a justeza, recorreu-se a duas das três formas distintas de análise acima referidas, nomeadamente, a utilização de um material de referência certificados, MRC, e a realização de ensaios de recuperação. A participação de ensaios interlaboratoriais, EIL, é também uma ferramenta importante na validação de um método utilizado pelo Laboratório, mas por questões alheias ao Laboratório, não foi possível a realização destes.

A avaliação da justeza pela utilização de um MRC foi efetuada através da análise do MRC *TM-9.3 Environmental Matrix Reference Material* da marca *Canada* (Lote: 0622). Foi realizada uma diluição de 1:5 (1,00 mL do MRC num volume de 5,00 mL), diretamente nos tubos de ensaio do amostrador automático. Para a validação do método analítico, o Laboratório definiu um número mínimo de dez análises de um MRC, por esse motivo, foram efetuadas 10 análises independentes do MRC ao longo do tempo. A **Tabela 29** exibe os valores dos parâmetros determinados através da avaliação da justeza pelo MRC, nomeadamente, a média ($C_{média}$), o desvio padrão (S), o erro relativo (Er), o Z -score, o erro normalizado (E_n) e o valor do teste t .

Tabela 29 | Resultados obtidos na análise de um MRC, com o intuito de avaliar a justeza do método de determinação do urânio.

$C_{MRC} \pm U_{MRC}$ (μg U/L)	$C_{média}$ (μg U/L)	S (μg U/L)	Er (%)	Z -score	E_n	t
1,82 $\pm$ 0,14	1,75	0,043	3,8	- 0,49	- 0,30	0,82

O Laboratório avalia essencialmente os resultados obtidos da análise de um MRC através do erro relativo. Verifica-se pela análise dos resultados expostos na **Tabela 29** que o valor obtido do erro relativo é reduzido, cumprindo o critério de aceitação do Laboratório que não deve exceder os 15 %.

Em relação ao resultado do Z -score é possível aferir o desempenho satisfatório do método, uma vez que o valor obtido em módulo encontra-se abaixo do valor 2. O erro normalizado é inferior a 1 em módulo, o que corrobora mais uma vez o desempenho aceitável do método em termos de justeza, para o urânio.

Por último, de forma a avaliar se os resultados produzidos são afetados por erros sistemáticos

relevantes que necessitem de correção, recorre-se a um teste *t-student*. Como o valor do teste *t* obtido apresenta-se abaixo do valor tabelado (2,201), é possível inferir que os resultados produzidos não são afetados por erros sistemáticos relevantes que necessitem de correção. Assim, conclui-se que o método apresenta um ótimo desempenho, em termos de justeza.

A determinação da justeza do método para o urânio foi também efetuada através da realização de ensaios de recuperação, a partir da fortificação de amostras reais de água de consumo humano e água doce natural (superficial e subterrânea), pela adição de 0,1 mL da solução intermédia 2 (100,12 µg U/L) a 5 mL da amostra real diluída numa proporção de 1:5, sendo que foram realizadas vinte réplicas. Na **Tabela 30** encontram-se os resultados dos parâmetros obtidos através dos ensaios de recuperação realizados para cada uma das matrizes de água utilizada, destacando-se a taxa de recuperação, o desvio padrão (**S**) e ainda o erro relativo (**Er**).

Tabela 30 | Resultados obtidos nos ensaios de recuperação efetuados de amostras reais fortificadas de água de consumo (ACH) e águas doce naturais superficiais e subterrâneas (ADNSup e ADNSub), para avaliação da justeza do método.

	ACH	ADNSup	ADNSub
Taxa de recuperação (%)	104,3	107,0	105,7
S (%)	3,6	3,1	2,6
Er (%)	4,3	7,0	5,7

Atendendo aos resultados expostos na **Tabela 30**, é possível afirmar que os valores das taxas de recuperação encontram-se dentro do critério de aceitação (100 ± 20 %) estabelecido pelo Laboratório para este nível de concentração, isto é, entre 80 e 120 %. Além do critério de aceitação ser cumprido de forma satisfatória, o valor do erro relativo situa-se abaixo do valor estipulado de 15 % definido pelo Laboratório, permitindo concluir que o método é justo.

Em suma, conclui-se que o método demonstra uma boa justeza, uma vez que os resultados obtidos nos ensaios com o material de referência certificado, bem como nos ensaios de recuperação, revelaram um desempenho satisfatório do método na avaliação deste parâmetro.

4.2.9. Incerteza de medição

A estimativa da incerteza de medição associada ao método de determinação foi efetuada recorrendo à metodologia utilizada pelo Laboratório como rotina, com base no definido na norma ISO 11352:2012 "Water Quality - Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality

control based" e o Guia RELACRE nº 31 "Quantificação de incerteza de medição em ensaios químicos e físico-químicos".

A abordagem adotada consistiu na recolha de dados de validação e controlo do método em ambiente intralaboratorial. Deste modo, a incerteza de medição foi estimada combinando a componente dos erros aleatórios e a componente dos erros sistemáticos, ou seja, as incertezas associadas à precisão, em condições de precisão intermédia, e as incertezas associadas à justeza, quantificada pelo erro relativo, respetivamente e de forma independente.

Em relação à quantificação da incerteza associada à precisão ($u_{\text{precisão relativa}}$), esta foi avaliada a partir da combinação da incerteza padrão de duplicados de amostras reais de diferentes matrizes, realizadas ao longo do tempo ($u_{p, \text{amostra}}$), e a incerteza padrão de controlo de qualidade correspondente ao limite de quantificação ($u_{p, CQ}$).

A incerteza padrão de duplicados de amostras reais ($u_{p, \text{amostra}}$), foi calculada diretamente a partir do desvio padrão da precisão dos duplicados de amostras, calculado pela **Equação 21**. Já a incerteza padrão de controlo de qualidade de menor concentração ($u_{p, CQ}$), foi obtida a partir do desvio padrão da precisão intermédia do controlo de qualidade, calculado pela **Equação 20**.

Dessa forma, os resultados das incertezas padrão, a serem combinados para obter a incerteza associada à precisão encontram-se na **Tabela 31**, assim como o valor da incerteza padrão da precisão, associada à combinação dos duplicados de amostra e controlo de qualidade, calculado pela **Equação 36**.

Tabela 31 | Resultados obtidos experimentalmente para a quantificação da incerteza padrão associada à precisão.

	u relativa
$u_{p, \text{amostra}}$	0,018
$u_{p, CQ}$	0,0029
$u_{\text{precisão relativa}}$	0,018

A partir da análise da **Tabela 31** verifica-se que a incerteza padrão associada à precisão do método para o urânio é de 1,8 %.

No Laboratório, a quantificação da incerteza associada à justeza é avaliada a partir dos ensaios de recuperação, para três matrizes diferentes. Neste caso, a incerteza associada à justeza do método ($u_{\text{justeza relativa}}$) tem duas componentes de incerteza, nomeadamente a diferença entre os valores

observados e a completa recuperação, ou seja, o desvio da recuperação completa (100 %) (b_{rms}), calculada pela **Equação 37**. A segunda componente é a incerteza da concentração do padrão adicionado (u'_{add}), calculada segundo a **Equação 38**.

Na **Tabela 32** encontram-se representados os resultados obtidos nos ensaios de recuperação efetuados, especificamente, o somatório do quadrado dos desvios relativos relativamente à recuperação completa ($\sum(b'_i)^2$), o valor quadrático médio dos desvios relativos dos ensaios de recuperação (b_{rms}), a incerteza relativa do volume adicionado (u'_v), a incerteza relativa da concentração da solução utilizada para fazer a fortificação (u'_{conc}), a incerteza relativa da concentração de analito adicionada (u'_{add}) e a componente da incerteza associada à justeza do método ($u_{justeza\ relativa}$), calculada a partir da **Equação 39**. De salientar que os ensaios de recuperação foram realizados em três matrizes diferentes.

Tabela 32 | Resultados obtidos através dos ensaios de recuperação efetuados de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método em três matrizes diferentes (água de consumo humano (ACH) e água doce natural superficial (ADNSup) e subterrânea (ADNSub)).

	$\sum(b'_i)^2$	b_{rms}	u'_v	u'_{conc}	u'_{add}	$u_{justeza\ relativa}$
ACH	0,105	0,056				0,056
ADNSup	0,156	0,076	0,0034	0,0031	0,0046	0,076
ADNSub	0,142	0,062				0,082

A partir da análise da **Tabela 32**, verifica-se que os valores obtidos para a componente da incerteza associada aos erros sistemáticos foi de 5,6, 7,6 e 8,2 %, para a água de consumo, água doce natural superficial e água doce natural subterrânea, respetivamente.

Uma vez que para o urânio não existem critérios estabelecidos em Decreto-Lei para máximos dos resultados das componentes da incerteza associadas aos erros aleatórios e aos erros sistemáticos, o Laboratório estabeleceu, por bem, um limite de 10 % para ambos. Verifica-se que tanto os resultados associados aos erros aleatórios quanto os resultados associados aos erros sistemáticos encontram-se abaixo de 10 %, mostrando que a metodologia utilizada é adequada para a estimativa da incerteza.

A partir das incertezas relativas para as componentes associadas aos erros aleatórios e sistemáticos, foi calculada a incerteza combinada relativa (u_c), a partir da **Equação 40**, para cada uma das matrizes.

Tabela 33 | Valores obtidos da incerteza combinada, incerteza expandida e incerteza expandida percentual, do para três matrizes diferentes (água de consumo humano (ACH) e água doce natural superficial (ADNSup) e subterrânea (ADNSub)).

	u_c	U	U (%)
ACH	0,059	0,117	11,7
ADNSup	0,078	0,157	15,7
ADNSub	0,065	0,130	13,0

Posteriormente, as incertezas combinadas relativas foram convertidas em incertezas expandidas (U), multiplicando-as pelo fator de expansão, $k = 2$ (**Equação 35**), para um nível de confiança aproximadamente 95 %, de acordo com o descrito no Guia Relacre nº31. Esses valores estão apresentados na **Tabela 33**.

Com base na análise da **Tabela 33**, é possível verificar que a incerteza final do método para o urânio, nas amostras de água de consumo humano, água doce natural superficial e água doce natural subterrânea, foi de 12, 16 e 13 %, respetivamente. Assim, atendendo aos resultados obtidos é demonstrada a conformidade com o requisito estabelecido na Diretiva (EU) 2020/2184, no Decreto-Lei n.º 69/2023 e com os critérios de aceitação do Laboratório, uma vez que o valor do critério de aceitação é 30 %, independentemente da matriz estudada.

Outra metodologia de quantificação da incerteza associada à justeza utilizada é avaliar a partir de um material de referência. Assim, e de forma complementar para efeitos de comparação, avaliou-se também a incerteza associada à justeza a partir de um material de referência certificado. A **Tabela 34**, apresenta os valores obtidos do tratamento de resultados efetuado, nomeadamente o *bias* relativo ($bias'$), o desvio padrão relativo associado aos resultados estimados do MRC (S'_{bias}), e a incerteza padrão relativa associada ao valor do MRC (u'_{Cref}), a componente da incerteza associada à justeza do método ($u_{justeza\ relativa}$).

Tabela 34 | Resultados obtidos através do MRC da Canada utilizado de forma a calcular a componente associada aos erros sistemáticos do método.

$bias'$	S'_{bias}	u'_{Cref}	$u_{justeza\ relativa}$
- 0,038	0,025	0,077	0,086

De acordo com a **Tabela 34** é possível verificar que o valor obtido da componente associada aos erros sistemáticos foi de 8,6 %.

Assim, a partir das incertezas relativas para as componentes associadas aos erros aleatórios e sistemáticos, foi calculada a incerteza combinada relativa (u_c), a partir da **Equação 40**, para o MRC analisado. Posteriormente, essa incertezas foi convertida em incerteza expandida (**U**), multiplicando as incertezas combinadas relativas pelo fator de expansão, $k = 2$ (**Equação 35**), para um nível de confiança aproximadamente 95 %, de acordo com o descrito no Guia Relacre nº31. Esse valor final da incerteza do método está apresentado na **Tabela 35**.

Tabela 35 | Valores obtidos da incerteza combinada, incerteza expandida e incerteza expandida, em percentagem, do método, para o urânio.

u_c	U	U (%)
0,088	0,176	17,6

Com base na análise da **Tabela 35**, verifica-se que a incerteza final do método para o urânio, quando a incerteza associada à justeza do método sido avaliada através de um MRC, foi de 18 %. Assim, atendendo aos resultados obtidos observa-se que a incerteza do método é ligeiramente superior quando se utiliza um MRC em comparação com os ensaios de recuperação. Contudo, é demonstrada, ainda assim, a conformidade com o requisito estabelecido na Diretiva (EU) 2020/2184, no Decreto-Lei n.º 69/2023 e com os critérios de aceitação do Laboratório, uma vez que o valor do critério de aceitação é 30 %.

Importa salientar que o Laboratório utiliza os ensaios de recuperação para o cálculo da incerteza do método, uma vez que desta forma consegue-se obter uma incerteza do método para cada tipo de matriz analisada pelo Laboratório.

Posto isto, conclui-se que o método foi validado com sucesso e demonstrou-se a adequabilidade deste, uma vez que os parâmetros de desempenho foram caracterizados e cumpriram com os critérios impostos pelo Laboratório e em consonância com os da Diretiva (EU) 2020/2184, assim como do Decreto-Lei n.º 69/2023.

4.2.10. Controlo de qualidade do método

Após a conclusão do processo de validação do método, procedeu-se à implementação do controlo de qualidade intralaboratorial. Esse controlo é realizado em rotina através da análise de amostras de água natural doce (superficial e subterrânea) e amostras de água de consumo humano, que contêm o analito de interesse. Esse processo permite a monitorização contínua do desempenho analítico em rotina. Os critérios de aceitação estabelecidos para o controlo de qualidade estabelecido são

apresentados na tabela (**Tabela 36**).

Tabela 36 | Critérios de aceitação aplicados pelo Laboratório para o controlo de qualidade.

Ensaio	Critério de aceitação ($\pm$ (%))
CQ LQ (0,10012 $\mu\text{g U/L}$)	25
CQ 0,6007 $\mu\text{g U/L}$	15
CQ 5,006 $\mu\text{g U/L}$	10
Duplicados de amostra	10
Recuperações de amostra	20
Er em MRC	15

4.2.10.1. Controlo de Qualidade Interno

De forma a assegurar o controlo de qualidade interno e a precisão dos resultados obtidos, foram realizados duplicados de amostras, tendo em conta os critérios estabelecidos pelo Laboratório apresentados na **Tabela 36**. Os valores obtidos dos duplicados foram monitorizados por meio de uma carta de aceitação, na qual o limite estabelecido é de 10 %, como é apresentada na **Figura 19**.

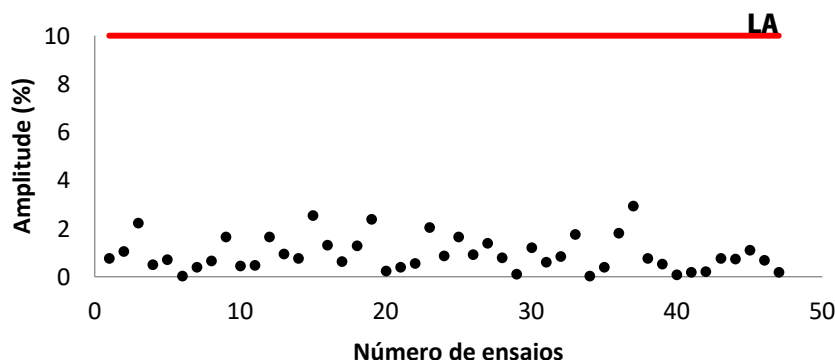


Figura 19 | Carta de aceitação de duplicados (LA – 10 %) para a monitorização do controlo de qualidade do método para determinação de urânio.

Com base na análise da carta de aceitação da **Figura 19**, é possível verificar que todas as amplitudes relativas dos ensaios realizados encontram-se abaixo do limite de aceitação estabelecido de 10 %, confirmando e validando a precisão dos resultados obtidos. Além disso, verifica-se que os valores na série de duplicados não ultrapassam os 5 %, o que permite, no futuro, a redução do nível de aceitação para os 5 %.

Seguidamente, após a verificar que todas as amplitudes relativas dos ensaios realizados se encontravam abaixo do critério de aceitação do Laboratório, procedeu-se à construção da carta de controlo de amplitudes (**Figura 20**), tendo em conta os dados na **Tabela 37**.

Tabela 37 | Valores definidos em termos de amplitude (%) para os limites de controlo e aviso, tendo em vista a construção da carta de controlo de amplitudes, dos duplicados de amostra.

$\bar{R}$ (%)	LSA (%)	LSC (%)	D_2	D'_2
0,989	2,484	3,231	3,267	2,512

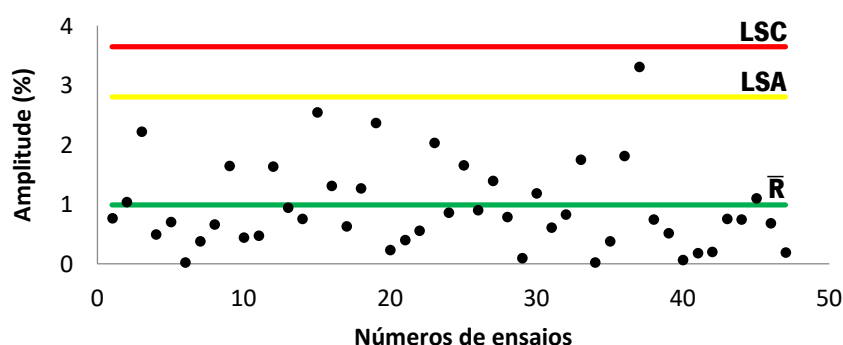


Figura 20 | Carta de controlo de amplitudes para os duplicados de amostra, tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método.

A partir da análise da carta de controlo de amplitudes (**Figura 20**) verifica-se que os pontos experimentais obtidos da amplitude relativa dos duplicados, encontram-se dentro dos limites estabelecidos, demonstrando assim que o método se encontra sob controlo e que os resultados são consistentes.

O Laboratório tem como procedimento elaborar cartas de aceitação, com o objetivo de implementar um monitoramento rigoroso da qualidade do método. Com esse propósito, recorreu-se à elaboração de uma carta de aceitação para o padrão de menor concentração da curva de calibração (0,10012 $\mu\text{g U/L}$), um padrão intermédio (0,6007 $\mu\text{g U/L}$) e o padrão de concentração mais elevada (5,006 $\mu\text{g U/L}$), recorrendo ao critério de aceitação de 25, 15 e 10 %, respetivamente. Na **Figura 21** estão apresentadas as cartas de aceitação para as três concentrações referidas, sendo que em **(A)** apresenta para o padrão de concentração 0,10012 $\mu\text{g U/L}$, **(B)** concentração 0,6007 $\mu\text{g U/L}$ e **(C)** concentração 5,006 $\mu\text{g U/L}$.

A partir da **Figura 21** constata-se que todos os resultados dos padrões selecionados, encontram-se dentro dos limites de aceitação estabelecidos pelo Laboratório.

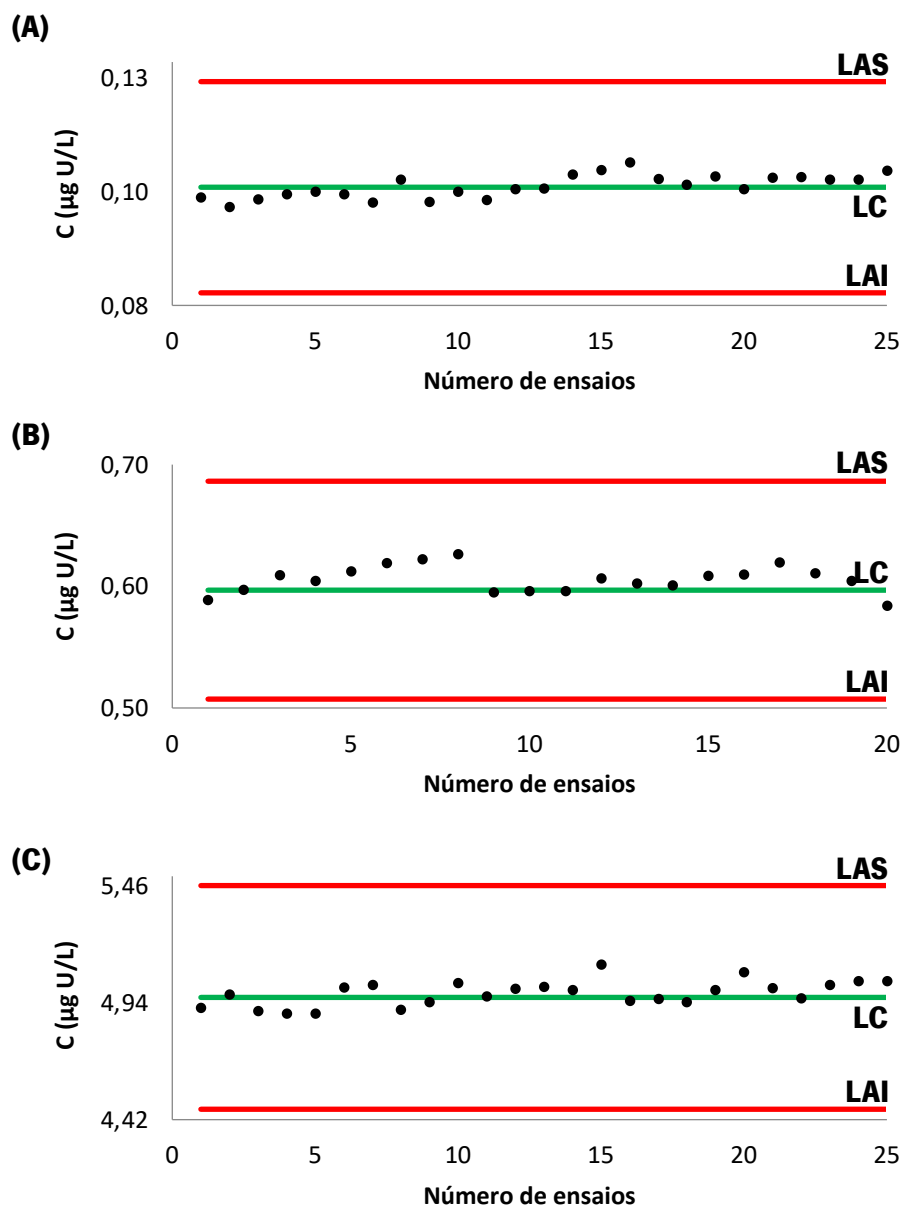


Figura 21 | Cartas de aceitação para o padrão: **(A)** de menor concentração da curva de calibração ($0,10012 \mu\text{g U/L}$); **(B)** intermédio ($0,6007 \mu\text{g U/L}$) e **(C)** de maior concentração ($5,006 \mu\text{g U/L}$) recorrendo ao critério de aceitação de 25, 15 e 10 %, respetivamente.

Após a análise das cartas de aceitação, prosseguiu-se com a construção das cartas de controlo. Na **Tabela 51 (Anexo 12)** são apresentados os valores das medições dos padrões de controlo, utilizados para a elaboração da carta de controlo de indivíduos. A partir desses valores, foram determinados a média, o desvio padrão (**S**), o coeficiente de variação (**CV**), assim como o erro relativo (**Er**), expostos na **Tabela 38**, para os três níveis de concentração.

Tabela 38 | Resultados dos parâmetros obtidos a partir da análise dos padrões de controle , utilizados para a construção da carta de controle de indivíduos.

Padrão (µg U/L)	C_{média} (µg U/L)	S (µg U/L)	CV (%)	Er (%)
0,10012	0,10414	0,0021	2,0	4,2
0,6007	0,5968	0,011	1,8	1,6
5,006	4,962	0,068	1,4	1,1

Com base nos resultados apresentados na **Tabela 38**, foi possível construir as cartas de controle de indivíduos, para os três níveis de concentração selecionados. Para isso, estabeleceu-se a linha central (**LC**) e os limites superior de aviso (**LAS**) e inferior (**LIA**), assim como os limites superior de controle (**LSC**) e inferior (**LIC**), para cada um os níveis de concentração, conforme apresentado na **Tabela 39**. Estes valores foram determinados utilizando as **Equações 41, 42, 43 e 44**.

Tabela 39 | Valores de concentração (µg U/L) para os limites de controle e de aviso tendo em vista a construção da carta de controle de indivíduos para os padrões de controle.

	0,10012 µg U/L	0,6007 µg U/L	5,006 µg U/L
LC	0,10414	0,5968	4,962
LSA	0,10836	0,6188	5,099
LIA	0,09991	0,5749	4,826
LSC	0,11047	0,6297	5,167
LIC	0,09780	0,5639	4,758

Assim, com base nos limites estabelecidos, foi possível construir as cartas de controle de indivíduos para os padrões de controle selecionados, que encontram-se apresentadas na **Figura 22**, de forma a monitorizar a qualidade do método.

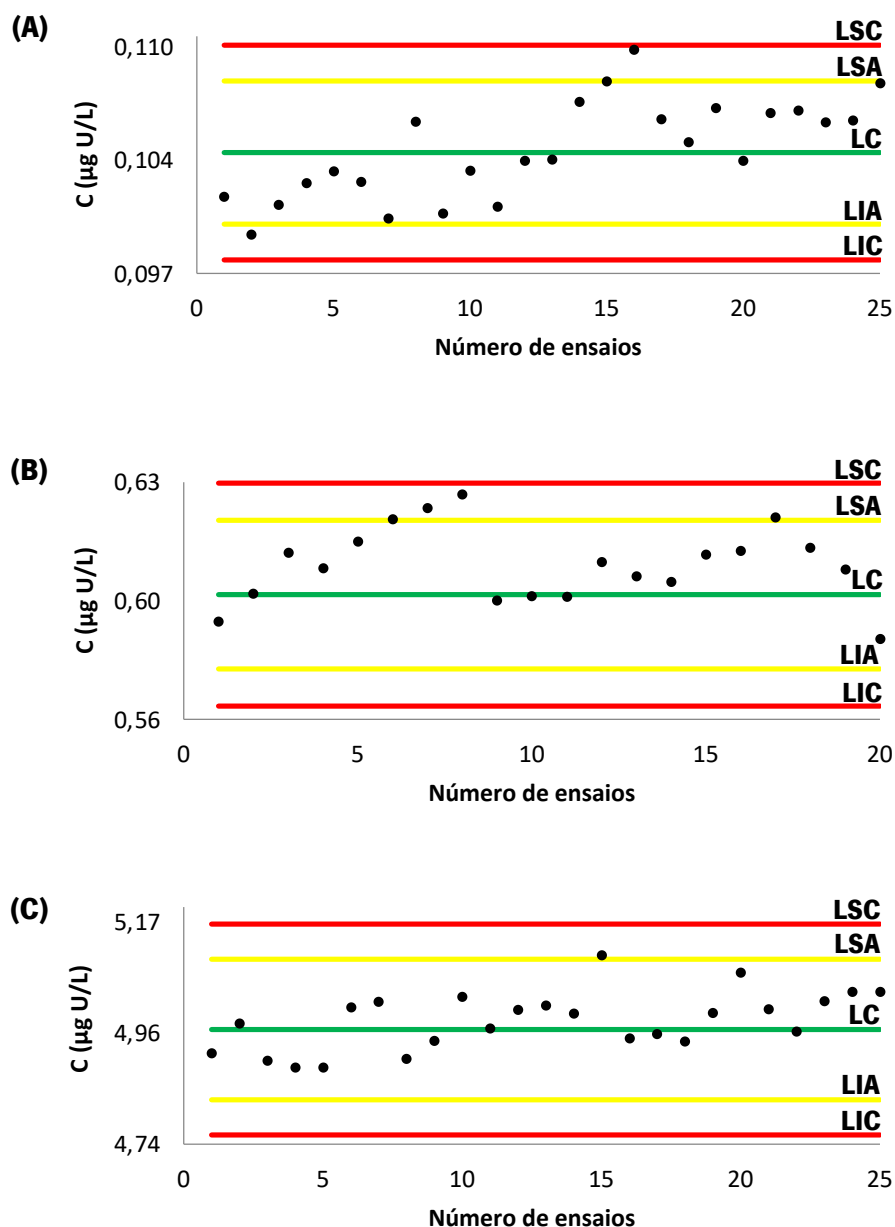


Figura 22 | Cartas de controlo de indivíduos para o padrão: **(A)** de menor concentração da curva de calibração (0,10012 µg U/L); **(B)** intermédio (0,6007 µg U/L) e **(C)** de maior concentração (5,006 µg U/L), tendo em vista a monitorização do controlo de qualidade do método, para o urânio.

Após a análise da carta de controlo de indivíduos para o padrão de menor concentração da curva de calibração (**Figura 22 (A)**), observa-se que os pontos experimentais obtidos se encontram dentro dos limites estabelecidos, demonstrando assim que o método se encontra sob controlo. Ao analisar mais detalhadamente, verifica-se que uma tendência de crescimento em seis valores consecutivos entre o décimo primeiro e o décimo sexto ensaios. No entanto, é importante ressaltar que essa tendência veio alterar-se nos ensaios subsequentes, não constituindo uma situação fora de controlo.

A análise da carta de controlo de indivíduos para o padrão intermédio da curva de calibração (**Figura 22 (B)**), permitiu confirmar que todos os pontos experimentais obtidos se encontram dentro

dos limites de controlo estabelecidos, demonstrando assim que o método se encontra sob controlo. Também foi possível verificar a ausência de situações fora de controlo ou tendência não aleatória, tendo como apoio o Guia RELACRE nº3, “Validação de Resultados em Laboratórios Químicos”.

Por último, verifica-se que todos os pontos experimentais obtidos relativos à monitorização do controlo de qualidade do padrão de maior concentração da curva de calibração (**Figura 22 (C)**) encontram-se dentro dos limites de controlo estabelecidos, indicando assim que o método de encontra sob controlo. Além disso, ao consultar o Guia RELACRE nº3, “Validação de Resultados em Laboratórios Químicos” bem como as instruções de trabalho do Laboratório, não foi verificada nenhuma situação fora de controlo ou tendência não aleatória.

4.3. Outras atividades desenvolvidas no Laboratório

A determinação da justeza de um método, como referido anteriormente, pode ser executada com recurso à participação de ensaios interlaboratoriais, mas por questões de logística e de tempo não foi possível a realização deste para o analito em estudo.

Porém, como o ICP-MS é um equipamento de análise multielementar, o urânio não foi validado como um analito independente, sendo que, juntamente com o urânio, foram estudados outros dezoito elementos cuja determinação já estava implementada no Laboratório. Este estudo consistiu na redução das gamas de trabalho dos elementos já estudados, em cerca de cinco vezes, assim como a diminuição dos limites de quantificação.

Neste contexto, foi possível realizar um ensaio interlaboratorial, nomeadamente, um ensaio de aptidão, para dezassete dos dezoito elementos estudados. Adicionalmente, o mercúrio foi analisado separadamente.

Os resultados obtidos para o ensaio de aptidão da AQUACHECK estão apresentados na **Tabela 40** e os valores de justeza são apresentados sob a forma de *Z-score*.

Através da **Tabela 40** é possível aferir o excelente desempenho do método, uma vez que todos os valores de *Z-score* para todos os elementos são inferiores a 2 em módulo.

Tabela 40 | Resultados obtidos no ensaio interlaboratorial da AQUACHECK realizados para dezoito elementos previamente implementados no Laboratório.

	C_{EIL} (µg/L)	C_{média} (µg/L)	Z-score
Ferro	419,00	463,00	1,42
Manganês	32,00	30,80	- 0,48
Cobre	74,40	74,50	0,03
Alumínio	45,00	45,60	0,12
Zinco	149,70	148,00	- 0,11
Bário	369,00	388,00	0,69
Boro	461,00	439,00	- 0,64
Cádmio	4,01	4,01	0,00
Chumbo	17,30	17,90	0,46
Níquel	8,30	8,70	0,48
Selénio	5,13	5,89	1,48
Arsénio	4,49	4,99	1,50
Antimónio	2,28	2,34	0,24
Mercúrio	0,80	0,78	- 0,19
Cobalto	4,33	4,54	0,65
Vanádio	5,44	5,59	0,37
Cromo	6,05	6,67	1,38
Berílio	9,52	9,88	0,51

Foi ainda possível obter formação acerca das políticas de ambiente, segurança e sistemas de gestão da empresa Águas do Norte, S.A., permitindo a assimilação dos valores, códigos de conduta e gestão praticados pela empresa.

Adicionalmente, obtive também formação em gestão de resíduos, num contexto de um laboratório.

Além da participação nas formações, fui convidado, com enorme satisfação, pela responsável técnica pelo ICP-MS para assistir e participar numa auditoria interna ocorrida em maio de 2023.

No mês junho de 2023, tive a oportunidade de supervisionar uma estagiária do 3º ano da Licenciatura em Engenharia Química e Biológica da Universidade do Minho durante a realização do seu Projeto Individual de licenciatura.

5

Capítulo 5

Conclusão

Neste capítulo encontram-se as principais conclusões a serem retiradas do trabalho apresentado e realizado ao longo de nove meses.

Na presente dissertação foi implementado e validado com sucesso o método de determinação do urânio por ICP-MS.

O processo de implementação e validação do método foi possível através da caracterização dos parâmetros de desempenho analíticos. Iniciou-se o processo de validação do método de determinação do urânio por ICP-MS pela seleção do isótopo a analisar, assim como a seleção do padrão interno a utilizar, sendo que o isótopo escolhido foi o que apresenta uma massa de 238 u. e o padrão interno o bismuto.

Após a seleção da gama de trabalho (0,1 a 5,0 $\mu\text{g U/L}$), avançou-se para a construção das curvas de calibração. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram bastante elevados em todas as curvas realizadas ao longo do trabalho, tendo-se obtido um valor médio de 0,99997. O teste de significância de correlação, os gráficos de análise de resíduos e o teste de Mandel, corroboraram a elevada linearidade na gama de concentrações estudada.

O estudo da sensibilidade ao longo de todo o trabalho permitiu aferir a estabilidade do método e do equipamento, uma vez que os analitos e óxidos avaliados encontram-se de acordo com os critérios definidos pelo fabricante do equipamento.

A seletividade do método foi verificada em ambas as matrizes avaliadas (águas de consumo humano (ACH) e águas doces naturais superficiais (ADNSup) e subterrâneas (ADNSub)) através da realização de ensaios de recuperação, sendo que as taxas de recuperação obtidas encontram-se dentro do intervalo de aceitação estabelecido pelo Laboratório (80 – 120 %), permitindo concluir que o método é seletivo para as matrizes ACH, ADNSup e ADNSub.

Os limiares analíticos foram determinados tendo em conta a adequação do método para as análises em rotina, tendo sido obtidos valores de limite de detecção do método e instrumental de 2,3 ng U/L e 0,017 $\mu\text{g U/L}$, respetivamente. Já valor do limite de quantificação considerado mostrou ser adequado, uma vez que, verificou-se que o CV e o Er (%) obtidos, 3,0 e 1,4 %, respetivamente, se encontram abaixo do critério estabelecido pelo Laboratório de 10 %.

No que diz respeito à precisão, este parâmetro foi avaliado em condições de repetibilidade e de precisão intermédia, tendo os resultados obtidos demonstrado ser satisfatórios, em ambas as condições, dado que não ultrapassa os 10 %.

A justeza foi avaliada com recurso a um MRC e a ensaios de recuperação, tendo sido obtidos, tendo sido obtidos resultados satisfatórios em ambas as metodologias, já que os valores dos erros relativo determinados foram inferiores a 15 %, cumprindo o requisito estipulado pelo Laboratório.

A incerteza da medição, sob a forma de incerteza expandida, estimada mediante a ISO 11352,

através de dados de validação do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial, permitiu demonstrar o cumprimento do requisito especificado pela Diretiva (EU) 2020/2184 e pelo Decreto-Lei n.º 69/2023, assim como o critério de aceitação do Laboratório, uma vez que os valores de incerteza de medição obtidos, pelas ambas metodologias realizadas, encontram-se bastante abaixo do critério de aceitação definido de 30 %, sendo que quando se utiliza os ensaios de recuperação para o cálculo da incerteza associada à justeza obteve-se incertezas de 12, 16 e 13 %, para ACH, ADNSup e ADNSub, respetivamente. Já quando se utilizou o MRC para o cálculo da incerteza associada à justeza obteve-se uma incerteza de 18 %.

Posto isto, afirma-se que o método foi validado com sucesso, uma vez que os parâmetros de desempenho foram caracterizados e cumpriram com os critérios impostos pelo Laboratório e em consonância com os da Diretiva (EU) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho, datada de 16 de dezembro de 2020, assim como do Decreto-Lei n.º 69/2023, de 21 de agosto de 2023.

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

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

6

Capítulo 6

Referências bibliográficas

Neste capítulo encontram-se apresentadas as referências bibliográficas utilizadas ao longo da dissertação.

- [1] ADP S.A., «Águas de Portugal. História.», <https://www.adp.pt/pt/proposito/a-nossa-historia/?id=7>, acessado a 23/11/2022.
- [2] ADP S.A., «Águas de Portugal. O que fazemos?», <https://www.adp.pt/pt/sobre-nos/o-que-fazemos/?id=26>, acessado a 23/11/2022.
- [3] ADP S.A., «Águas de Portugal. Onde estamos?», <https://www.adp.pt/pt/sobre-nos/onde-estamos/?id=27>, acessado a 23/11/2022.
- [4] ADN S.A., «Águas do Norte. Quem somos», <https://www.adnorte.pt/pt/aguas-do-norte/quem-somos/?id=5>, acessado a 23/11/2022.
- [5] Diário da República, 1ª Série - Nº 104 - Decreto-Lei nº 93/2015 de 29 de maio de 2015.
- [6] Diário da República, 1ª Série - Nº 23 - Decreto-Lei nº 16/2017 de 1 de fevereiro de 2017.
- [7] ADN S.A., «Águas do Norte. Laboratório.», <https://www.adnorte.pt/pt/atividade/laboratorio/?id=58>, acessado a 23/11/2022.
- [8] NP EN ISO/IEC 17025:2018. Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaios de calibração. 2018.
- [9] Diário da República, 1ª Série - Nº 161 - Decreto-Lei nº 69/2023 de 21 de agosto de 2023.
- [10] ADN S.A., «Águas do Norte. Qualidade da água.», <https://www.adnorte.pt/pt/atividade/sistema-multimunicipal-do-norte-de-portugal/qualidade-da-agua/?id=105>, acessado a 23/11/2022.
- [11] Ministério do Ambiente do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, «Relatório do Estado do Ambiente.» Agência Portuguesa do Ambiente, 2011.
- [12] E. Caçador, «Implementação e validação de métodos analíticos», Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2018.
- [13] A. Patel, C. Hecht, A. Craddock, M. Edwards, L. Ritchie, «Drinking Water in the United States: Implications of Water Safety, Access, and Consumption», *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 40, n. 1, pp. 345–373, 2020, doi: 10.1146/annurev-nutr-122319-035707.
- [14] P. Gleick, *The world's water.*, Volume 9. Oakland: Pacific Institute for Studies in Development, Environment, and Security, 2018.
- [15] E. Santos, «Validação de métodos analíticos e monitorização da qualidade de águas subterrâneas», Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, 2016.
- [16] D. Arezes, H. Costa, P. Ramísio, «Enquadramento estratégico das águas pluviais: a necessidade de uma gestão sustentável», *A&R*, n. 5, pp. 19–29, 2019, doi: 10.22181/aer.2019.0502.
- [17] Concelho Nacional da Água em Zonas Urbanas, «Água no Planeta Terra», <https://conselhonacionaldaagua.weebly.com/aacutegua-no-planeta-terra.html>, 2021.
- [18] Jornal Oficial da União Europeia, Diretiva (UE) 2020/2184 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2020.
- [19] APA, I.P., Agência Portuguesa do Ambiente, «Relatório do Estado do Ambiente 2020/2021», https://rea.apambiente.pt/dominio_ambiental/agua.
- [20] National Geographic, «Surface Water», <https://education.nationalgeographic.org/resource/surface-water/>, acessado a 25 de outubro de 2022.
- [21] M. Costa, «Qualidade da água e problemas de saúde pública associados a processos de

- contaminação: o caso de estudo de nascentes na freguesia de Dem (Caminha, N de Portugal)», Dissertação de Mestrado, Universidade do Minho, Braga, 2018.
- [22] Diário da República, 1ª Série - Nº 176 - Decreto-Lei nº 236/1998 de 1 de agosto de 1998.
- [23] L. Ribeiro, «Ecosystems e Bem-Estar Humano. Avaliação para Portugal do Millennium Ecosystem Assessment». *Lisboa: Escolar Editora*, 2009.
- [24] G. Keast e R. Johnston, «Unicef Handbook on Water Quality», *UNICEF*. 2008.
- [25] Jornal Oficial da União Europeia, Diretiva 2006/118/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de dezembro de 2006.
- [26] S. Verma, K. Kim, «Graphene-based materials for the adsorptive removal of uranium in aqueous solutions», *Environ. Int.*, vol. 158, p. 1044, 2022, doi: 10.1016/j.envint.2021.106944.
- [27] L. Keith, O. Faroon, «Uranium», *Handbook Tox. Met.*, pp. 885–936, 2022, doi: 10.1016/B978-0-12-822946-0.00032-5.
- [28] P. Smedley, D. Kinniburgh, «Uranium in natural waters and the environment: Distribution, speciation and impact», *J. Appl. Geochem.*, vol. 148, p. 1034, 2023, doi: 10.1016/j.apgeochem.2022.105534.
- [29] World Health Organization, «Uranium in Drinking-water. Background for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality», 2004.
- [30] Los Alamos National Laboratory, «Periodic Table of Elements: Uranium», <https://periodic.lanl.gov/92.shtml>, acessado a 23 de maio de 2023.
- [31] A. Meinrath, P. Schneider, G. Meinrath, «Uranium ores and depleted uranium in the environment, with a reference to uranium in the biosphere from the Erzgebirge/Sachsen, Germany», *J. Environ. Radioact.*, vol. 64, pp. 175–193, 2003, doi: 10.1016/S0265-931X(02)00048-6.
- [32] J. Wall, L. Krumholz, «Uranium Reduction», *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 60, pp. 149–166, 2006, doi: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121357.
- [33] ISO 17294-2. Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes. 2016.
- [34] European Food Safety Authority (EFSA), «Uranium in foodstuffs, in particular mineral water», *EFS2*, vol. 7, 2009, doi: 10.2903/j.efsa.2009.1018.
- [35] S. Haneklaus, H. Windmann, M. Maekawa, L. Zhang, E. Schnug, «Diet Controls Uranium Intake and Aggravates Health Hazards», *MRAJ*, vol. 9, 2021, doi: 10.18103/mra.v9i8.2484.
- [36] R. Mehra, S. Singh, K. Singh, «Uranium studies in water samples belonging to Malwa region of Punjab, using track etching technique», *Radiat. Meas.*, vol. 42, pp. 441–445, 2007, doi: 10.1016/j.radmeas.2007.01.040.
- [37] M. Jamali, Y. Assadi, F. Shemirani, M. Hosseini, R. Kozani, M. Farahani, M. Niasari, «Synthesis of salicylaldehyde-modified mesoporous silica and its application as a new sorbent for separation, preconcentration and determination of uranium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry», *Anal. Chim. Acta*, vol. 579, pp. 68–73, 2006, doi: 10.1016/j.aca.2006.07.006.
- [38] P. Kurttio, A. Leino, L. Salonen, H. Saha, «Bone as a Possible Target of Chemical Toxicity of Natural Uranium in Drinking Water», *EHP*, vol. 113, pp. 68–72, 2005, doi: 10.1289/ehp.7475.
- [39] E. Ansoborlo, O. Prat, P. Moisy, C. Auwer, P. Guibaud, M. Carriere, M. Gouget, J. Duffield, D. Doizi, T. Vercouter, «Actinide speciation in relation to biological processes», *Biochim.*, vol. 88, pp.

- 1605–1618, 2006, doi: 10.1016/j.biochi.2006.06.011.
- [40] M. Betti, L. Aldave de las Heras, «Glow discharge spectrometry for the characterization of nuclear and radioactively contaminated environmental samples», *Spectrochim. Acta Part B*, vol. 59, pp. 1359–1376, 2004, doi: 10.1016/j.sab.2004.07.006.
- [41] S. Sahoo, V. Jha, A. Patra, S. Jha, M. Kulkarni, «Scientific background and methodology adopted on derivation of regulatory limit for uranium in drinking water – A global perspective», *Environ. Adv.*, p. 1020, 2020, doi: 10.1016/j.envadv.2020.100020.
- [42] World Health Organization, «Guidelines for drinking-water quality». 2017.
- [43] U.S. Environmental Protection Agency, «Technical Fact Sheet: Final Rule for (Non-Radon) Radionuclides in Drinking water». 2000.
- [44] Diário da República, 1.ª série - N.º 161, «Decreto-Lei n.º 69/2023 de 21 de agosto de 2023», Anexo I - Parte B.
- [45] J. Trindade, V. Lemos, U. Cerqueira, C. Novaes, S. Araújo, M. Bezerra, «Multivariate optimization of a dispersive liquid-liquid microextraction method for determination of copper and manganese in coconut water by FAAS», *Food Chem.*, vol. 365, p. 130473, 2021, doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130473.
- [46] S. Wilschefski, M. Baxter, «Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Introduction to Analytical Aspects», *CBR*, vol. 40, pp. 115–133, 2019, doi: 10.33176/AACB-19-00024.
- [47] S. Döker, L. Uzun, A. Denizli, «Arsenic speciation in water and snow samples by adsorption onto PHEMA in a micro-pipette-tip and GFAAS detection applying large-volume injection», *Talanta*, pp. 123–129, 2013, doi: 10.1016/j.talanta.2012.10.019.
- [48] Y. Yamini, M. Safari, «Modified magnetic nanoparticles with catechol as a selective sorbent for magnetic solid phase extraction of ultra-trace amounts of heavy metals in water and fruit samples followed by flow injection ICP-OES», *Microchem. J.*, vol. 143, pp. 503–511, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2018.08.018.
- [49] T. Van Acker, S. Theiner, E. Bolea-Fernandez, F. Vanhaecke, G. Koellensperger, «Inductively coupled plasma mass spectrometry», *Nat. Rev. Methods Primers*, vol. 3, p. 52, 2023, doi: 10.1038/s43586-023-00235-w.
- [50] A. Zergui, M. Aledeh, S. Hamad, «Metallic profile of Zamzam water: Determination of minerals, metals and metalloids by ICP-MS», *J. Trace Eleme. Min.*, vol. 2, p. 1031, 2022, doi: 10.1016/j.jtemin.2022.100031.
- [51] J. Qiao, Y. Xu, «Direct measurement of uranium in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry», *Talanta*, vol. 183, pp. 18–23, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.02.045.
- [52] Thermo Elemental, «ASS, GFAAS, ICP or ICP-MS? Which technique should I use? An elementary overview of elemental analysis.» 2001.
- [53] D. Duckworth, D. Smith, C. Barshick, «Inorganic mass spectrometry: fundamentals and applications». Practical spectroscopy. New York: M. Dekker Inc, 2000.
- [54] J. Broekaert, «Analytical Atomic Spectrometry with flames and plasmas». Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [55] T. Manning, W. Grow, «Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry», vol. 2. The Chemical Educator, 1997.

- [56] ISO 17294-1. Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 1: General guidelines. 2004.
- [57] A. Castro, «PRL_0007: Determinação de Metais por Espetroscopia de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS)». 2019.
- [58] N. Jakubowski, I. Feldmann, D. Stuewer, «Analytical improvement of pneumatic nebulization in ICP-MS by desolvation», *Spectrochim. Acta Part B*, vol. 47, pp. 107–118, 1992, doi: 10.1016/0584-8547(92)80011-5.
- [59] ThermoFisher Scientific, «iCAP Qnova Series ICP-MS. Operating Manual.» 2020.
- [60] J. Kosler, «Present Trends and the Future of Zircon in Geochronology: Laser Ablation ICPMS», *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 53, pp. 243–275, 2003, doi: 10.2113/0530243.
- [61] R. Thomas, «A Beginner's Guide to ICP-MS- Part III: The Plasma Source», *Spectrosc.*, vol. 16, pp. 16–30, 2001.
- [62] Bramer, Scott, «An Introduction to Mass Spectrometry», Widener University Department of Chemistry, Chester, 1998.
- [63] N. Yamada, «Kinetic energy discrimination in collision/reaction cell ICP-MS: Theoretical review of principles and limitations», *Spectrochim. Acta Part B*, vol. 110, pp. 31–44, 2015, doi: 10.1016/j.sab.2015.05.008.
- [64] Agilent Technologies, «Collision/Reaction Cells in ICP-MS». 2010.
- [65] EPA, «Method 200.8: Determination of Trace Elements in Waters and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry». 1994.
- [66] A. Castro, «ITL_0002:Instrução de trabalho para a implementação e validação de Metais por ICP-MS, no âmbito de acreditação Flexível Global.» 2019.
- [67] M. Himri, A. Pastor, M. Guardia, «Determination of uranium in tap water by ICP-MS», *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 367, pp. 151–156, 2000, doi: 10.1007/s002160051616.
- [68] J. Avivar, L. Ferrer, M. Casas, V. Cerdà, «Fully automated lab-on-valve-multisyringe flow injection analysis-ICP-MS system: an effective tool for fast, sensitive and selective determination of thorium and uranium at environmental levels exploiting solid phase extraction», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 27, p. 327, 2012, doi: 10.1039/c2ja10304d.
- [69] A. Rocha, «Espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo - ICP-MS: Implementação e validação de um método para determinação de metais em água para consumo humano», Dissertação de Mestrado, Universidade da Beira Interior, 2009.
- [70] K. Chandrasekaran, D. Karunasagar, J. Arunachalam, «Dispersive liquid–liquid micro extraction of uranium(vi) from groundwater and seawater samples and determination by inductively coupled plasma–optical emission spectrometry and flow injection–inductively coupled plasma mass spectrometry», *Anal. Methods*, vol. 3, p. 2140, 2011, doi: 10.1039/c1ay05329a.
- [71] G. Pandit, S. Sahu, M. Tiwari, P. Ajmal, R. Bhangare, «Laser fluorimetric analysis of uranium in water from Vishakhapatnam and estimation of health risk», *Radiat Prot Environ*, vol. 36, p. 128, 2013, doi: 10.4103/0972-0464.137478.
- [72] C. Ruan, W. Luo, W. Wang, B. Gu, «Surface-enhanced Raman spectroscopy for uranium detection and analysis in environmental samples», *Analytica Chimica Acta*, vol. 605, pp. 80–86, 2007, doi: 10.1016/j.aca.2007.10.024.

- [73] RELACRE, «Guia RELACRE 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química». 2000.
- [74] Eurachem/CITAC Guide, *Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation*, 3rd Edition. 2016.
- [75] B. Magnusson, U. Ormemark, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Validation and Related Topics*, 2nd Edition. 2014.
- [76] D. Geraldo, «Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Validação de Métodos Analíticos», Universidade do Minho, 2021/2022.
- [77] ISO 11352, «Water Quality - Estimation of Measurement Uncertainty Based on Validation and Quality Control Data». 1st Edition, 2012.
- [78] RELACRE, «Guia RELACRE 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos». 1996.
- [79] ISO 8466-1, «Water Quality - calibration and evolution of analytical methods and estimation of performance characteristics - Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function». 1st Edition, 1990.
- [80] W. Beyer, «CRC Standard Mathematical Tables», 31st Edition. Boca Raton, 2002.
- [81] IUPAC, «Compendium of Chemical Gold Book». 2014.
- [82] ISO 5725-2, «Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method». 2nd Edition, 2020.
- [83] ISO 5725-1, «Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions». 1st Edition, 1994.
- [84] A. Bettencourt, «Apontamentos da Unidade Curricular Controlo de Qualidade e Validação de Métodos Analíticos», Universidade do Minho, 2021/2022.
- [85] ISO GUIDE 30, «Reference materials - Selected terms and definitions». 2015.
- [86] ISO GUIDE 35, «Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability». 2017.
- [87] European Accreditation, «The Selection and use of reference Materials». 2003.
- [88] ADN S.A., «ITL_0013: Validação de métodos no âmbito de matriz fixa e flexível intermédia no LabAdNorte». 2020.
- [89] ISO/IEC 43-1, «Proficiency testing by interlaboratory comparisons - Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes». 2nd Edition, 1997.
- [90] ISO/IEC 17043, «Conformity assessment - General requirements for proficiency testing». 2010.
- [91] RELACRE, «Guia RELACRE 31 - Quantificação de Incerteza de Medição em Ensaio Químicos». 2018.
- [92] Eurachem/CITAC Guide, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3rd Edition. 2012.
- [93] RELACRE, «Guia RELACRE 9 - Alguns exemplos de Cartas de Controlo em Laboratórios de Análise Química». 1st Edition, 1998.
- [94] ISO 7870-1, «Control charts - Part 1: General guidelines». 2019.
- [95] ISO 7870-2, «Control charts - Part 2: Shewhart control charts». 2013.

Anexos

Anexo 1 | Programa da máquina de lavar utilizada para a lavagem do material afeto ao ICP-MS

Programa G ou 2 - material geral (vidro e plástico) e material volumétrico utilizado nas análises de água.

1. Pré-lavagem: Água fria.
2. Lavagem principal: Água quente, dosagem de detergente, 5 minutos a temperatura entre os 55 e 60 °C.
3. Enxaguamento 1: Água quente, dosagem de neutralizador.
4. Enxaguamento 2: Água fria.
5. Enxaguamento 3: Água desionizada.
6. Enxaguamento final: Água desionizada, 1 minuto entre 55 e 60 °C.

Imediatamente após o final dos programas deixar a porta da máquina aberta cerca de 10 cm, durante 10 a 15 minutos para se ter bons resultados de secagem e impedir a corrosão da máquina.

De notar que a máquina de lavar encontra-se ligada a um depósito de água desionizada.

Anexo 2 | Incerteza expandida da concentração de soluções padrão

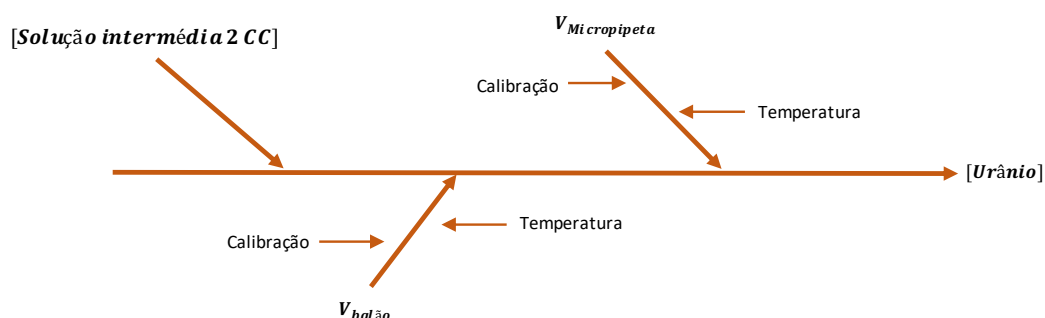


Figura 23 | Diagrama de “causa-efeito” para a identificação de fontes de incerteza da solução padrão de menor concentração (0,10012 µg U/L).

Tabela 41 | Cálculos auxiliares para a determinação das incertezas associadas ao volume da micropipeta, do balão volumétrico e da incerteza combinada e expandida da concentração de uma solução padrão de urânio de 0,10012 µg U/L.

Micropipeta de 1000 µL			
Descrição	Incerteza de x	Incerteza padrão (u(x))	Incerteza padrão relativa (u(x)/x)
Calibração	0,58	0,33	-
Temperatura	0,084	0,048	-
U (V _{pip})	-	0,34	0,0034

Balão Volumétrico de 100 mL			
Descrição	Incerteza de x	Incerteza padrão (u(x))	Incerteza padrão relativa (u(x)/x)
Calibração	0,10	0,041	-
Temperatura	0,084	0,048	-
U (V)	-	0,063	0,00063

Cálculo da incerteza combinada u _c (y) e da incerteza expandida U(y)			
Descrição	Valor de x	u _c (y)	u _c (x)/x
C _{sol.intermédia 2} (µg U/L)	100,12	0,31	0,0031
V _{pipetado} (µL)	100,00	0,34	0,0034
V _{b.volumétrico} (mL)	100,000	0,063	0,00063
C _{sol.padrão de 0,1} (µg U/L)	0,10012	0,00047	-

Valor da mensurada	Fator de expansão (K)	Incerteza expandida (U)
0,10012	2	0,00093

0,10012 ± 9,3×10 ⁻⁴ µg U/L	
---------------------------------------	--

Anexo 3 | Instruções de funcionamento do ICP-MS Thermo Scientific iCAP RQ

Antes de ligar o equipamento, verificar que a garrafa de árgon encontra-se ligada, que tem uma pressão acima de 10 bar e também que a extração encontra-se ligada. Além disso, verificar se a garrafa de hélio está aberta e verificar a pressão (2 bar).

Ligar o ICP-MS Thermoscientific iCAP RQ

1. Ligar o refrigerador que se encontra na sala de preparação de soluções da absorção atômica.
2. Ligar o amostrador automático, na parte de trás do equipamento, lado direito.
3. Verificar o estado dos tubos da bomba peristáltica, caso estejam muito danificados trocar, tendo em atenção o sentido do fluxo da bomba.
4. Colocar no frasco que se encontra no lado direito do amostrador, solução de lavagem, e no frasco do lado esquerdo do amostrador a solução de padrão interno.
5. Ligar o computador associado ao equipamento.
6. Abrir o *Instrument Control* e verificar a exaustão do plasma ($> 0,20$) e a bomba peristáltica (40,0 rpm).
7. Em *Instrument Control*, clique em iCAP RQ, *Main* e clique em ON, para ligar o equipamento e a bomba peristáltica, em simultâneo.
8. No painel principal, em baixo, aparece a mensagem que o equipamento já se encontra em modo *operate*.
9. Na posição 4-31 do amostrador automático, colocar um copo com branco de trabalho. No *Instrument Control*, no separador ASX-560, clique na posição 4-31, para a *probe* se deslocar até essa posição e verificar se está a aspirar, corretamente.
10. Certificar que o equipamento está no modo STD e clicar em *Run*, deixando o equipamento estabilizar 30 minutos. Passado 30 minutos, tocar o modo STD, pelo modo KED e deixar o equipamento estabilizar 10 minutos.
11. Após estabilizar, colocar num tubo de Falcon, aproximadamente 15 mL de solução *tune* e colocar na posição P10 do amostrador. Retirar a *probe* do padrão interno e colocar no tubo de Falcon, juntamente com a *probe* do amostrador, indo ao painel ASX-560 e clicar na posição P10, fazendo com que a *probe* do amostrador se desloque até à posição P10. Em seguida, clicar em *Run* e esperar que estabilize, clicando no STOP quando estabilizar o número de contagens.
12. Iniciar o *Performance test*, clicando em *Performance Report*, *Run an existing performance report*, Next. No final do guardar na pasta "*Performance Report KED_ AdNorte*".

Nota: Caso estes testes falhem devem ser repetidos, caso esta situação se mantenha deve ser realizado um *AutoTune Source* de acordo com o *Instrument Control*.

13. Após todos os testes realizados, antes de iniciar a sessão de trabalho, deve-se fazer o acondicionamento dos cones com uma amostra real, ou seja, aspirar um amostra durante uns minutos antes de iniciar a série de trabalho.

Sessão de trabalho (Qtegra)

1. Abrir o software Qtegra, clicar em LabBooks, *Create a new LabBook from an existing LabBook* e escolher uma sessão já criada e dar nome à série “ICP_ddmmaaaa”.
2. Em *Sample List* adicionar o controlo de qualidade e as amostras pretendidas a analisar.
3. Carregar o amostrador de acordo com o definido na sua sessão de trabalho.
4. Iniciar a série, clicando na seta verde, em que se abrirá uma segunda ordem de iniciação e voltar a clicar na seta verde.
5. Na segunda ordem que se abrirá, não esquecer de ir a *Options* e seleccionar a opção *Closedown on an empty queue*, que irá desligar o equipamento automaticamente no final da série de trabalho.

Anexo 4 | Exemplo do *Performance Report*, obtido no dia 10 de maio de 2023

Performance Report



System

Time 5/10/2023 2:39:11 PM
 Instrument id iCAP RQ
 Operator ADMINTH-813575H\Administrator
 Template KED_AdNorte
 Serial number RQ00833
 Last Autotune Autotune-Tune Std PM-20230510-142249798.imatdat
 Solution No solution specified

Sensitivity & Stability Test

Result	Runs	Sweeps
Passed	3	30

Sensitivity

Analyte	Result	Value	Condition	Limit
Bkg4.5	Passed	0.0 CPS	Less than	0.5 CPS
Bkg220.7	Passed	0.0 CPS	Less than	2.0 CPS
59Co/35Cl.16O	Passed	20.3	Greater than	18.0
59Co	Passed	30,192.0 CPS	Greater than	30,000.0 CPS
238U	Passed	420,642.0 CPS	Greater than	85,000.0 CPS
209Bi	Passed	272,906.0 CPS	Greater than	42,500.0 CPS
140Ce.16O/140Ce	Passed	0.0078	Less than	0.015
115In	Passed	45,325.0 CPS	Greater than	35,000.0 CPS

Stability

Analyte	Value	Limit
59Co	1.1 %	2
238U	0.7 %	2
115In	1.3 %	2

Mass Calibration Test

Result	Channels	Dwell	MeasureWidth	PointSpacing	Sweeps
Passed	75	0.04	1.5	0.02	5

Analyte	Result	Centroid	Offset	Peak Width	Peak Width Min	Peak Width Max
59Co	Passed	58.9517	0.0185	0.673	0.600	0.850
115In	Passed	114.9208	0.0169	0.666	0.600	0.850
209Bi	Passed	209.0206	0.0402	0.640	0.600	0.850

Performance Report



Tune Settings

Parameter	Value
Additional Gas Flow 1	0.00
Additional Gas Flow 2	0.00
Additional Gas Flow 3	0.00
Angular Deflection	-280.00
Auxiliary Flow	0.80
CCT Bias	-21.00
CCT Entry Lens	-46.00
CCT Exit Lens	-40.00
CCT Focus Lens	0.90
CCT1 Flow	5.10
CCT1 Shut-Off Valve	1.00
CCT2 Flow	0.00
CCT2 Shut-Off Valve	0.00
Cool Flow	14.00
D1 Lens	-350.00
D2 Lens	-158.00
Deflection Entry Lens	-35.00
Extraction Lens 1 Negative	0.00
Extraction Lens 1 Polarity	1.00
Extraction Lens 1 Positive	0.00
Extraction Lens 2	-133.67
Focus Lens	-8.00
Nebulizer Flow	1.10
Peristaltic Pump Speed	40.00
Plasma Power	1550.00
Pole Bias	-18.00
Quad Entry Lens	-30.00
Sampling Depth	5.00
Spray Chamber Temperature	2.70
Torch Horizontal Position	-0.80
Torch Vertical Position	0.00
Virtual CCT Mass Maximum Dac Limit Set	4095.00
Virtual CCT Mass parameter b	1.00
Virtual CCT Mass to Dac Factor	60.00
Virtual CCT Mass to Dac Offset	50.00

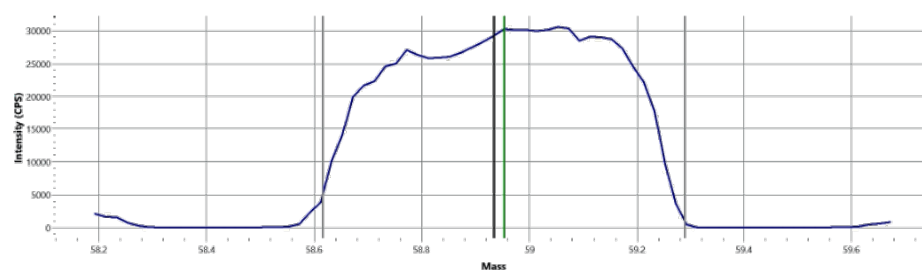
Vacuum Check

Parameter	Result	Value
Analyzer Pressure	Vacuum ok	7.405e-7
Interface Pressure		1.769e+0

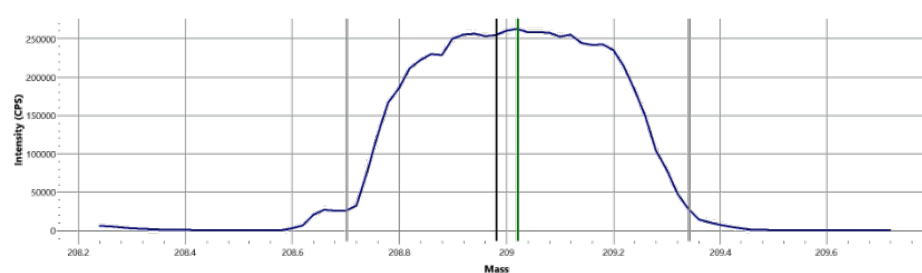
Detector Voltages

Analog	Counting
-2287.50	1637.50

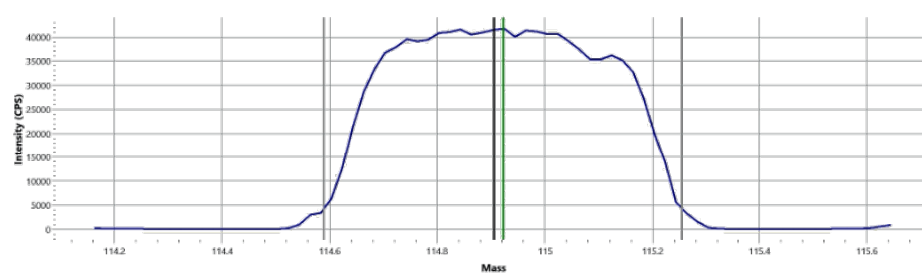
Performance Report

Mass Calibration Peaks
59Co

209Bi



115In



Anexo 5 | Resultados obtidos pelo *software* para a curva de calibração realizada no dia 23 de maio de 2023, com respectivos fatores de correção e concentrações corrigidas

Tabela 42 | Análise de dados obtidos pelo software Qtegra.

	Concentração software (µg U/L)	Fator correção	Concentração corrigida(µg U/L)
Branco	22,2	1,000	22,2
Padrão 1	26264,4	0,994	26106,1
Padrão 2	51039,4	0,984	50198,0
Padrão 3	96974,9	0,997	96675,9
Padrão 4	193467,4	0,995	192419,3
Padrão 5	489679,1	0,982	481039,7
Padrão 6	1245740,3	0,968	1205578,3

Anexo 6 | Curvas de calibração realizadas ao longo da validação do método de determinação do urânio e respectivos valores das incertezas associadas ao declive e à ordenada na origem, bem como os coeficientes de determinação obtidos para cada curva.

Tabela 43 | Equações das curvas de calibração obtidas, ao longo do tempo, e respectivos intervalos de confiança da ordenada na origem e do declive, para 95 % de probabilidade, assim como os respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Data	Curvas de calibração	R^2
24/01/2023	$I \text{ (cps)} = ((257,8 \pm 8,7) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,019 \pm 4,2) \times 10^3$	0,9999992
25/01/2023	$I \text{ (cps)} = ((309,9 \pm 4,4) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,032 \pm 2,1) \times 10^3$	0,9999494
14/02/2023	$I \text{ (cps)} = ((314,1 \pm 5,5) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,032 \pm 2,7) \times 10^3$	0,9999608
15/02/2023	$I \text{ (cps)} = ((317,7 \pm 8,4) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,020 \pm 4,1) \times 10^3$	0,9999830
14/03/2023	$I \text{ (cps)} = ((360,1 \pm 4,7) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,033 \pm 2,3) \times 10^3$	0,9999842
22/03/2023	$I \text{ (cps)} = ((355,5 \pm 4,4) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,022 \pm 2,1) \times 10^3$	0,9999184
22/03/2023	$I \text{ (cps)} = ((365,5 \pm 3,3) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,4 \pm 1,6) \times 10^3$	0,9999888
29/03/2023	$I \text{ (cps)} = ((370,1 \pm 2,0) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (1,3 \pm 9,9) \times 10^2$	0,9999520
12/04/2023	$I \text{ (cps)} = ((329,7 \pm 3,0) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,078 \pm 1,5) \times 10^3$	0,9999849
10/05/2023	$I \text{ (cps)} = ((299,3 \pm 6,3) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,050 \pm 3,0) \times 10^3$	0,9999952
23/05/2023	$I \text{ (cps)} = ((241,0 \pm 1,4) \times 10^3) \cdot C \text{ (}\mu\text{g U/L)} + (0,2 \pm 7,0) \times 10^2$	0,9999972

Anexo 7 | Carta de controlo para estudo de estabilidade dos declives**Tabela 44** | Declives das curvas de calibração obtidos, ao longo do tempo, utilizados para construção da carta de controlo de declives.

Data	Declive (cps L μg^{-1})
24/01/2023	257720,9
25/01/2023	309943,0
14/02/2023	314120,4
15/02/2023	317724,6
14/03/2023	360293,2
22/03/2023	355484,5

Tabela 45 | Declives das curvas de calibração obtidos, ao longo do tempo, utilizados para monitorização da carta de controlo de declives.

Data	Declive (cps L μg^{-1})
22/03/2023	365495,6
29/03/2023	370940,9
12/04/2023	329697,9
10/05/2023	299258,0
23/05/2023	241039,8

Anexo 8 | Ensaios de recuperação em três matrizes para o estudo da seletividade**Tabela 46** | Valores de concentração obtidos em amostras reais, através de ensaios de recuperação para o estudo da seletividade.

	C_{amostra} µg U/L	C_{amostra + fortificação} µg U/L
Água de Consumo Humano	0,001	1,966
	0,001	1,975
	0,000	2,014
	0,003	2,005
	0,001	2,003
	0,001	1,995
	0,002	1,986
	0,002	1,968
	0,001	2,025
	0,001	1,766
Água Doce Natural Superficial	0,035	2,044
	0,036	2,045
	0,037	2,098
	0,020	2,305
	0,020	2,107
	0,142	2,189
	0,032	2,083
	0,032	2,040
	0,032	2,086
	0,022	2,152
Água Doce Natural Subterrânea	0,003	2,040
	2,410	4,429
	0,413	2,447
	0,407	2,485
	0,039	2,088
	0,072	2,117
	0,008	2,005
	0,133	2,123
	0,091	2,124
	0,034	2,083

Anexo 9 | Limiares analíticos do método

Tabela 47 | Resultados obtidos na leitura de dez brancos, em condições de precisão intermédia.

Réplica	C (µg U/L)
29/03/2023	0,00023
14/04/2023	0,00046
10/05/2023	0,00049
10/05/2023	0,00070
23/05/2023	0,00067
23/05/2023	0,00203
23/05/2023	0,00108
23/05/2023	0,00217
23/05/2023	0,00021
23/05/2023	0,00019
Média	0,00082
Desvio padrão	0,00069

Tabela 48 | Avaliação do padrão de menor concentração da curva de calibração, em condições de precisão intermédia, de forma a confirmar o LQ do método de determinação do urânio em estudo.

Réplica	C (µg U/L)
25/01/2023	0,1026
25/01/2023	0,1016
15/02/2023	0,1042
15/02/2023	0,1055
14/03/2023	0,1040
14/03/2023	0,1043
22/03/2023	0,1015
22/03/2023	0,1011
22/03/2023	0,1023
22/03/2023	0,1030
Média	0,1030
Desvio padrão	0,0014

Anexo 10 | Precisão do método em condições de repetibilidade**Tabela 49** | Concentrações obtidas da avaliação da precisão do método, em condições de repetibilidade.

Réplica	0,10012 µg U/L	0,6007 µg U/L	5,006 µg U/L
y₁	0,10154	0,6006	4,945
y₂	0,09929	0,6087	4,954
y₃	0,10106	0,6098	4,940
y₄	0,10232	0,6196	4,995
y₅	0,10304	0,6106	5,073
y₆	0,10241	0,6043	5,002

Anexo 11 | Precisão do método em condições de precisão intermédia**Tabela 50** | Concentrações obtidas da análise de três níveis de concentração, ao longo do tempo, para a determinação da precisão intermédia.

Data	0,10012 µg U/L	Data	0,6007 µg U/L	Data	5,006 µg U/L
22/03/23	0,10154	29/03/23	0,5889	22/03/23	4,916
22/03/23	0,09929	29/03/23	0,5970	22/03/23	4,974
22/03/23	0,10106	29/03/23	0,6091	22/03/23	4,901
22/03/23	0,10232	12/04/23	0,6046	22/03/23	4,889
22/03/23	0,10304	12/04/23	0,6125	22/03/23	4,888
22/03/23	0,10241	12/04/23	0,6192	22/03/23	5,005
22/03/23	0,10025	12/04/23	0,6224	22/03/23	5,016
29/03/23	0,10596	12/04/23	0,6264	29/03/23	4,905
29/03/23	0,10053	10/05/23	0,5952	29/03/23	4,941
29/03/23	0,10306	10/05/23	0,5963	29/03/23	5,026
29/03/23	0,10096	10/05/23	0,5962	29/03/23	4,965
29/03/23	0,10365	10/05/23	0,6064	29/03/23	5,001
12/04/23	0,10374	10/05/23	0,6022	12/04/23	5,009
12/04/23	0,10715	23/05/23	0,6006	12/04/23	4,994
12/04/23	0,10835	23/05/23	0,6087	12/04/23	5,106
12/04/23	0,11020	23/05/23	0,6098	10/05/23	4,945
10/05/23	0,10610	23/05/23	0,6196	10/05/23	4,954
10/05/23	0,10475	23/05/23	0,6106	10/05/23	4,940
10/05/23	0,10678	23/05/23	0,6043	10/05/23	4,995
10/05/23	0,10364	23/05/23	0,5838	10/05/23	5,073
10/05/23	0,10649	-	-	10/05/23	5,002
23/05/23	0,10661	-	-	23/05/23	4,958
23/05/23	0,10593	-	-	23/05/23	5,017
23/05/23	0,10603	-	-	23/05/23	5,035
23/05/23	0,10824	-	-	23/05/23	5,035

Anexo 12 | Cartas de controle

Tabela 51 | Concentrações obtidas, para três níveis de concentração, ao longo do tempo, para a construção das cartas de controle.

Data	0,10012 µg U/L	Data	0,6007 µg U/L	Data	5,006 µg U/L
25/01/23	0,10264	25/01/23	0,5940	25/01/23	4,917
25/01/23	0,10312	25/01/23	0,6068	25/01/23	4,985
25/01/23	0,10163	15/02/23	0,5984	25/01/23	4,859
14/02/23	0,10238	15/02/23	0,6074	14/02/23	5,011
14/02/23	0,10508	14/03/23	0,6048	14/02/23	4,885
14/02/23	0,10553	14/03/23	0,6014	14/02/23	4,911
15/02/23	0,10485	14/03/23	0,6165	15/02/23	4,861
15/02/23	0,10190	14/03/23	0,6100	15/02/23	5,008
15/02/23	0,10546	22/03/23	0,5812	15/02/23	5,005
14/03/23	0,10513	22/03/23	0,5819	14/03/23	5,008
14/03/23	0,10403	22/03/23	0,5891	14/03/23	5,018
14/03/23	0,10430	22/03/23	0,5909	14/03/23	5,067
14/03/23	0,10861	22/03/23	0,5878	14/03/23	5,014
14/03/23	0,10559	22/03/23	0,5838	14/03/23	5,003
22/03/23	0,09949	29/03/23	0,5984	22/03/23	4,884