

Validação de métodos fotométricos em cuvete (Azoto total e Fósforo Total) em águas residuais

Filipe Soares Gonçalves

Mestrado em Ciências e Tecnologias do Ambiente
Departamento de Geociências, Ambiente e Ordenamento do
Território
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
2019

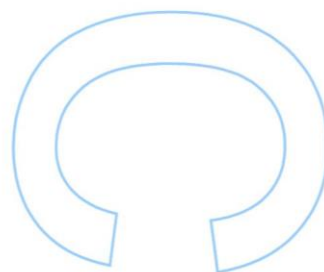
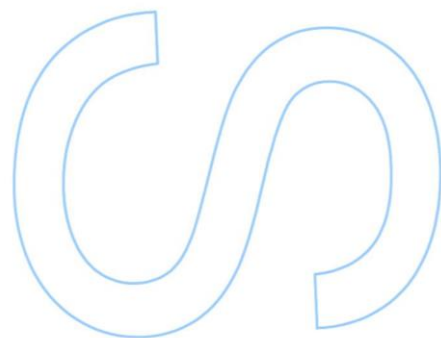
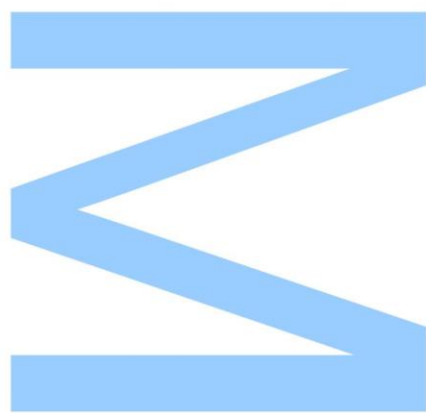
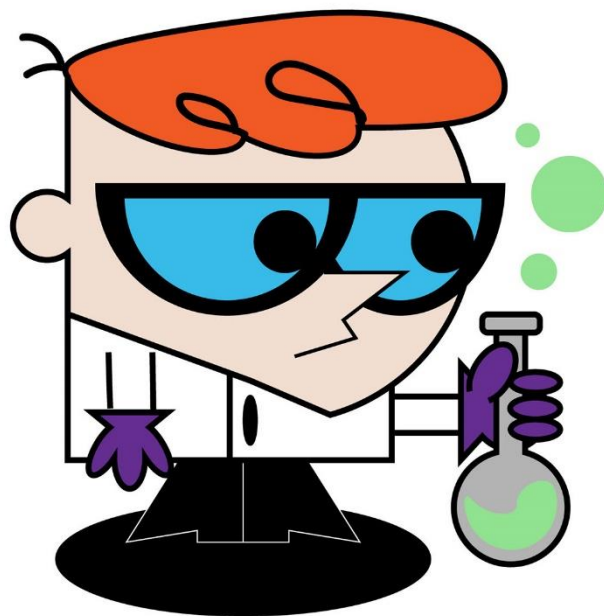
Orientador

Ricardo Filipe Andrade Quintas, Técnico de Qualidade e
Ambiente, Silliker Portugal, S.A.

Joaquim Esteves da Silva, Professor Catedrático, Faculdade de
Ciências da Universidade do Porto

Coorientadora

Andreia Isabel Costa Martins, Msc Química, Silliker Portugal, S.A.



Agradecimentos

Começo agradecendo à minha família que mesmo distante me deram todo o apoio necessário no cumprimento dessa etapa.

À minha namorada pelo suporte e companhia durante toda essa jornada em terras estrangeiras.

Todo o pessoal da Silliker que tive o prazer de conviver durante esses 9 meses e que fizeram esse estágio ser bastante divertido.

Agradeço ainda ao meu orientador Xuxu (também conhecido como Ricardo Quintas) que mesmo tentando sabotar meu trabalho algumas vezes, sempre foi solícito e prestativo para tirar todas as minhas dúvidas a respeito do trabalho.

À satanás (Andreia Martins) e o escroto do cidadão tirsense (Pedro) por partilharem bons momentos de risadas e águas fedidas e nojentas no laboratório de ambiente.

Resumo

O presente relatório concluído no âmbito da unidade curricular “estágio” do Mestrado em Ciências e Tecnologia do Ambiente com especialização em Riscos: Avaliação e Gestão Ambiental, foi realizado no laboratório de ambiente da empresa Silliker Portugal, S.A. com o intuito de validar novos métodos de análises para caracterização de Azoto total e Fósforo total em águas residuais industriais, mais especificamente o método baseado em kits de análise com cuvete da Hach Lange.

Ao longo do processo de validação onde foram analisadas várias amostras de águas residuais de clientes da Silliker, assim como padrões internos de controle e materiais de referência certificados, foram avaliados diversos parâmetros como seletividade, especificidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão e incertezas.

No final os resultados passaram por tratamento estatístico afim de validar o método em causa, com resultados satisfatórios dentro dos limites estabelecidos pelo controle de qualidade.

Abstract

This report, within the scope of the course “internship” of the Master in Environmental Science and Technology with specialization in Risks: Environmental Assessment and Management, was conducted in the environment laboratory of Silliker Portugal, S.A. in order to validate new methods of analysis for characterizaation of total nitrogen and total phosphorus in industrial wastewater, more specifically the method based on Hach Lange cuvette analysis kits.

Throughout the validation process where various samples of Silliker’s customers wastewater were analyzed, as well as internal control standards and certified reference materials, various parameters and certified reference materials, various parameters such as selectivity, specificity, detection and quantification limits, precision and accuracy and uncertainties.

In the end the results were statistically treated in order to validate the method in question, with satisfactory results within the limits established by the quality control.

Índice

1	Introdução	12
1.1	Silliker Portugal, S.A.	12
1.2	Azoto e Fósforo nas Águas Residuais	13
1.2.1	Legislação	13
1.2.2	Azoto	14
1.2.3	Fósforo	16
2	Validação de Métodos.....	16
2.1	Objetivo da Validação	17
2.2	Processo de Validação	17
2.3	Avaliação Indireta	19
2.3.1	Seletividade e Especificidade	19
2.3.2	Quantificação.....	20
2.3.2.1	Curvas de Calibração	20
2.3.3	Limites Analíticos.....	22
2.3.3.1	Limite de Detecção (LD).....	22
2.3.3.2	Limite de Quantificação (LQ).....	23
2.3.3.3	Sensibilidade.....	24
2.3.4	Precisão	25
2.3.4.1	Repetibilidade	26
2.3.4.2	Precisão Intermédia	28
2.4	Avaliação direta	30
2.4.1	Exatidão	30

2.4.1.1	Materiais de Referência Certificados (MRCs).....	31
2.4.1.2	Ensaio de Comparação Interlaboratorial (ECI)	32
2.5	Incerteza.....	33
3	Não Conformidades	37
3.1	Incerteza.....	37
3.2	Aceitação dos Ensaio Brancos.....	38
4	Procedimento das Análises	40
4.1	Azoto Total	40
4.1.1	Reagentes	40
4.1.2	Aparelhos e utensílios	41
4.1.3	Técnica.....	43
4.2	Fósforo Total	46
4.2.1	Reagentes	46
4.2.2	Aparelhos e utensílios	47
4.2.3	Técnica.....	47
5	Resultados e Discussão – Azoto Total	50
5.1	Azoto LCK 138	50
5.1.1	Repetibilidade.....	50
5.1.2	Precisão Intermédia.....	51
5.1.3	Gama de Trabalho.....	53
5.1.4	Exatidão	54
5.2	Azoto LCK 238	55
5.2.1	Repetibilidade.....	55

5.2.2	Precisão Intermédia.....	55
5.2.3	Gama de Trabalho.....	57
5.2.4	Exatidão	58
5.3	Azoto LCK 338	59
5.3.1	Repetibilidade.....	59
5.3.2	Precisão Intermédia.....	59
5.3.3	Gama de Trabalho.....	61
5.3.4	Exatidão	62
5.4	Validação do Método	63
5.4.1	Repetibilidade.....	63
5.4.2	Precisão Intermédia.....	64
5.4.3	Veracidade	64
5.4.4	Gama de Trabalho, Limite de Detecção e Quantificação	65
5.4.5	Incerteza.....	65
5.4.5.1	Cálculo com uso de MRCs.....	65
5.4.5.2	Cálculo com Recuperações	66
6	Resultados e Discussão – Fósforo Total	69
6.1	Fósforo LCK 349	69
6.1.1	Repetibilidade.....	69
6.1.2	Precisão Intermédia.....	70
6.1.3	Gama de trabalho.....	71
6.2	Fósforo LCK 350	72
6.2.1	Repetibilidade.....	72

6.2.2	Precisão Intermédia.....	73
6.2.3	Gama de trabalho.....	74
6.3	Validação do Método	75
6.3.1	Repetibilidade.....	75
6.3.2	Precisão Intermédia.....	76
6.3.3	Veracidade	77
6.3.4	Gama de Trabalho, Limite de Detecção e Quantificação	77
6.3.5	Incerteza.....	77
6.3.5.1	Cálculo com Recuperações	77
7	Conclusões	78
8	Bibliografia	81
9	Anexos.....	84
9.1	Anexo I	84
9.2	Anexo II	87
9.3	Anexo III	92

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo do Azoto. (fonte: Chemistry for Environmental Engineering and Science, 5th edition).....	15
Figura 2: Interpretação dos resultados usando os conceitos de LD e LQ (figura própria).	24
Figura 3: Precisão aumenta à medida que a dispersão entre os resultados diminui (fonte: figura adaptada do Guia RELACRE 3 - 1996).....	25
Figura 4: Na imagem A os resultados são precisos, porém com menor exatidão. Em B são precisos e com maior exatidão (fonte: figura adaptada do Guia RELACRE 3 - 1996).	25
Figura 5: Quadro resumo dos erros, parâmetro de avaliação e quantificação. (fonte: adaptado de A. Menditto, et al Accred. Qual. Assur. 2006, 12, 45).	37
Figura 6: Kit LCK 138.....	41
Figura 7: Kit LCK 238.....	41
Figura 8: Kit LCK 338.....	42
Figura 9: Termoreator HACH HT 200 S.	42
Figura 10: Fotómetro HACH DR 1900.	43
Figura 11: Cuvetes de ensaios.	45
Figura 12: Cuvete de ensaio acoplado ao fotómetro para fazer a leitura.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1: Cálculo da repetibilidade, 10 análises da mesma amostra.	51
Tabela 2: Teste de Grubbs para o PC 1.....	52
Tabela 3: Teste de Grubbs para o PC 16.....	52
Tabela 4: Estudo da precisão intermédia com 22 amostras em duplicato.	53
Tabela 5: Análise da homogeneidade das variâncias com o uso do teste F.	54
Tabela 6: Estudo da exatidão do método com uso de testes estatísticos (Erro Relativo, Teste T e Z-score).	54
Tabela 7: Cálculo da repetibilidade, 10 análises da mesma amostra.	55
Tabela 8: Teste de Grubbs para o PC 5.....	56
Tabela 9: Teste de Grubbs para o PC 40.....	56
Tabela 10: Ensaio com 20 amostras em duplicato para o estudo da precisão intermédia.	57
Tabela 11: Estudo da homogeneidade da variância com recurso ao teste F.	58
Tabela 12: Estudo da exatidão do método com uso de testes estatísticos (Erro Relativo, Teste T e Z-score).	58
Tabela 13: Cálculo da repetibilidade, com 10 ensaios repetidos.	59
Tabela 14: Teste de Grubbs para o PC 20.....	60
Tabela 15: Teste de Grubss para o PC 100.....	60
Tabela 16: Estudo da precisão intermédia com uso de ensaios duplicatos de 24 amostras de águas residuais.	61
Tabela 17: Estudo da homogeneidade das variâncias com recurso do teste F.....	62
Tabela 18: Estudo da exatidão com análise de MRC e uso de testes estatísticos.	62
Tabela 19: Estudo da repetibilidade do método com recurso do Teste C de Cochran.	63

Tabela 20: Resultados submetidos ao teste de Grubbs para detecção de outliers.	63
Tabela 21: Resultados do estudo da precisão intermédia do método.	64
Tabela 22: Resultados do teste interlaboratorial para atestar a veracidade das análises.	64
Tabela 23: Valores definidos para as Gamas de trabalho e Limites de detecção e quantificação.	65
Tabela 24: Cálculo da incerteza associada à precisão do método.	65
Tabela 25: Cálculo da incerteza associada à exatidão do método.	66
Tabela 26: Estudo da incerteza associada à exatidão a partir da análise de ensaios de recuperação.	67
Tabela 27: Estudo da incerteza associada à exatidão a partir da análise de ensaios de recuperação.	67
Tabela 28: Estudo da incerteza associada à exatidão a partir da análise de ensaios de recuperação.	68
Tabela 29: Cálculo final da incerteza expandida relativa do método.	68
Tabela 30: Estudo da repetibilidade com a análise de uma amostra de água residual repetida 10 vezes.	69
Tabela 31: Teste de Grubbs da análise de amostra de água residual em condições de repetibilidade.	70
Tabela 32: Estudo da precisão intermédia com a análise de 25 amostras de águas residuais em duplicato.	71
Tabela 33: Avaliação da homogeneidade das variâncias com o teste F.	72
Tabela 34: Estudo da repetibilidade com uso de amostra de água residual repetida 10 vezes.	72
Tabela 35: Teste de Grubbs da análise de amostra de água residual em condições de repetibilidade.	73

Tabela 36: Estudo da precisão intermédia com a análise de 23 amostras de águas residuais em duplicatos.	74
Tabela 37: Estudo da homogeneidade das variâncias com uso do teste F.	75
Tabela 38: Cálculo da repetibilidade do método, com avaliação usando o teste C de Cochran.	75
Tabela 39: Avaliação pelo teste de Grubbs para detectar possíveis outliers.	76
Tabela 40: Resultados da precisão intermédia do método.	76
Tabela 41: Resultados dos testes interlaboratoriais avaliando a veracidade das análises.	77
Tabela 42: Valores definidos das Gamas de Trabalho e Limites de Detecção e Quantificação dos métodos.	77
Tabela 43: Resultados da incerteza expandida relativa calculados para os métodos.	78

Lista de Abreviaturas

Abs	Absorvância
BIPEA	Bureau Interprofessionnel des Etudes Analytiques
DIN	Deutsches Institut Fur Normung
EGI	Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda.
ECI	Ensaio de Comparação Interlaboratorial
IPAC	Instituto Português de Acreditação, I.P
ISO	International Organization for Standardization
IEC	International Electrotechnical Commission
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LQ	Limite de Quantificação
LD	Limite de Detecção
MRC	Material de Referência Certificado
PAFQ	Procedimento de Análise Físico-Química
PC	Padrões de Controle
PCQ	Procedimento de Controlo da Qualidade
VLE	Valores Limites de Emissão
VIM	International Vocabulary of Metrology
RTQ	Responsável Técnico de Química
RQ	Responsável de Qualidade

1 Introdução

No rastro do desenvolvimento humano moderno pela indústria veio a consciência dos aspectos e impactos ambientais das atividades e legislações foram estabelecidas para o controle de possíveis danos ao ambiente, com as águas residuais industriais não foi diferente. Essas águas podem ser definidas como “águas que tem suas características naturais modificadas após passar pelo processo da cadeia produtiva” e não podem ser descartadas no ambiente sem devido tratamento, a fim de estabelecer níveis aceitáveis de qualquer substância contaminante. Com o intuito de caracterizar essas águas para proceder com o devido tratamento foram desenvolvidos cada vez mais técnicas de análises, que conseqüentemente necessitaram passar por métodos de validação para serem credenciadas como válidas pelas entidades de acreditação e assim encaminhadas para uso. Nesse contexto o Azoto e Fósforo são dos mais comuns possíveis contaminantes, e dos mais estudados ao longo dos anos, nas águas residuais.

1.1 Silliker Portugal, S.A.

A Silliker é uma empresa de caráter independente que atua no setor da prestação de serviços analíticos e de consultoria para o setor da alimentação, nutrição, água e ambiente, agroquímicos, bens de consumo, cosmético e farmacêutico. Com o nome de EGI – Sociedade de Engenharia e Gestão da Qualidade, Lda., foi fundada em julho de 1992 em Vila Nova de Gaia, como uma alternativa às necessidades do crescente mercado no setor numa época em que o tema da prevenção da qualidade e segurança alimentar estava tomando cada vez mais destaque e a oferta por tais serviços ainda era aquém do esperado. Nesse contexto a, na época ainda EGI, galgou rapidamente a posição de líder nacional do setor.

No ano seguinte a sua criação e por conta da sua forte política de qualidade, ela foi integrada ao Sistema Português da Qualidade com a acreditação do seu laboratório.

Em 2000, fruto da importância das avaliações organolépticas na caracterização dos consumíveis, foi criado o laboratório de análise sensorial. Como resultado direto do seu constante crescimento de mercado, em março de 2005, a EGI passou a contar com novas instalações, pensadas e estruturadas para abrigar todos os seus presentes e futuros laboratórios.

Foi em março de 2008, com a compra da EGI pela multinacional americana Silliker, que foi criada a Silliker Portugal, S.A. e a empresa passou a fazer parte de um dos maiores grupos mundiais no ramo da prestação de serviços no setor de qualidade e segurança alimentar. A partir de 2014 a Silliker começou a se apresentar como Mérieux NutriSciences.

A empresa tem como missão a proteção da saúde dos consumidores de todo o mundo a partir da realização de seus serviços. Ela está presente atualmente em 26 países, com mais de 7000 colaboradores, mais de 100 laboratórios acreditados ao redor do globo e conta com mais de 50 anos de experiência trabalhando lado a lado com as principais empresas do setor de alimentos e bebidas.

1.2 Azoto e Fósforo nas Águas Residuais

1.2.1 Legislação

O Decreto-Lei nº 236/98 tem por objetivo definir as normas, critérios e objetivos de qualidade com a missão de proteger o meio aquático e melhorar a qualidade das águas de acordo com suas finalidades. Para isso, no artigo 2º parágrafo 2, estabelece que faz parte do âmbito do decreto-lei as normas para descarga de águas residuais tanto no meio aquático quanto no terrestre, com a finalidade de proporcionar qualidade nas águas e solos e proteção da saúde pública.

O capítulo VI do Decreto-lei intitulado de “Protecção das águas contra a poluição causada por descargas de águas residuais”, expressa no artigo 63º que o seu objetivo é reduzir ou eliminar a poluição ocasionada com a descarga de águas residuais no meio aquático e no solo, sendo aplicadas à descarga em águas superficiais e do litoral, águas territoriais, águas subterrâneas, no solo e em colectores. Os valores limites de emissão (VLE) definidos no anexo XVIII do decreto-lei para o Fósforo total e o Azoto total, são:

- Fósforo total: ≤ 0.5 mg/l P em lagoas ou albufeiras, ≤ 3 mg/l P em águas que alimentam lagoas ou albufeiras e ≤ 10 mg/l P nos demais casos;
- Azoto total: ≤ 15 mg/l N em qualquer tipo de corpo d'água.

O controle de qualidade das emissões das águas residuais, segundo o artigo 69º do decreto-lei, é de responsabilidade da entidade que faz a descarga e abrange a análise das características físico-químicas que devem ser realizadas pelos métodos analíticos definidos no anexo XXII do presente decreto-lei. Define também que a entidade pode

realizar as análises com o uso de métodos diferentes desde que comprove que estes têm os limites de detecção, precisão e exatidão no mesmo nível dos definidos no anexo XXII. Os laboratórios responsáveis pelas análises devem ser acreditados para tal e participantes de programas de controle de qualidade do IPAC. Os anexos do decreto-lei citados anteriormente podem ser consultados no **anexo III** no final do relatório.

Por fim, as águas residuais estarão em conformidade e poderão ser despejadas no meio aquático se os valores de emissão obedecerem a duas condições:

1. Que a média mensal dos valores encontrados para cada uma das substâncias referidas na presente norma de descarga não ultrapassem o VLE;
2. Que o valor máximo observado durante o mês de laboração para cada substância da norma de descarga não ultrapassa o dobro do seu VLE.

1.2.2 Azoto

O azoto e seus diversos compostos são importantes no contexto hídrico, atmosférico e nos inúmeros processos que envolvem os seres vivos. Os vários estados de oxidação atingidos pelo azoto e suas, muitas vezes rápidas, mudanças ocasionadas pelos organismos vivos acabam por tornar sua química bem complexa. As bactérias, por exemplo, a depender da prevalência de uma situação aeróbica ou anaeróbica, podem reduzir ou oxidar os compostos de azoto. Dos compostos do azoto, três são solúveis em água e reagem para formar os íons inorgânicos amônio, nitrito e nitrato de acordo com as **equações 1, 2 e 3**. Esses íons podem atingir diversos níveis de concentração nas águas e podem gerar problemas ambientais preocupantes.



O azoto chega às águas de diversas formas. O esgoto sanitário, geralmente, é a principal dessas vias de contaminação, lançando azoto orgânico na água, pela forte presença de proteínas, e azoto amoniacal (proveniente da hidrólise da uréia na água). Outra fonte bastante preocupante são os efluentes industriais que também contribuem com descargas de azoto orgânico e amoniacal nas águas, como é comum em curtumes, siderúrgicas, frigoríficos, alimentícias, petroquímicas, matadouros, farmacêuticas e químicas. Em áreas agrícolas pode ocorrer o escoamento das águas pluviais nos solos

fertilizados, causando o lixiviamento de compostos de azoto para corpos d'água, processo semelhante ocorre com a drenagem urbana de águas pluviais.

Para melhor compreender a interação do azoto com o ambiente é de suma importância conhecer o ciclo do azoto (**figura 1**), principalmente o processo de nitrificação, onde ocorre a oxidação da amônia produzindo nitrito e nitrato, respectivamente. O processo de nitrificação acontece às custas de oxigênio e quando ocorre na água acaba por reduzir os níveis de oxigênio dissolvido nos corpos d'água, esse processo é conduzido por microrganismos e algas nitrificantes, que a depender da concentração das descargas podem se proliferar de forma excessiva levando a eutrofização desses corpos d'água.

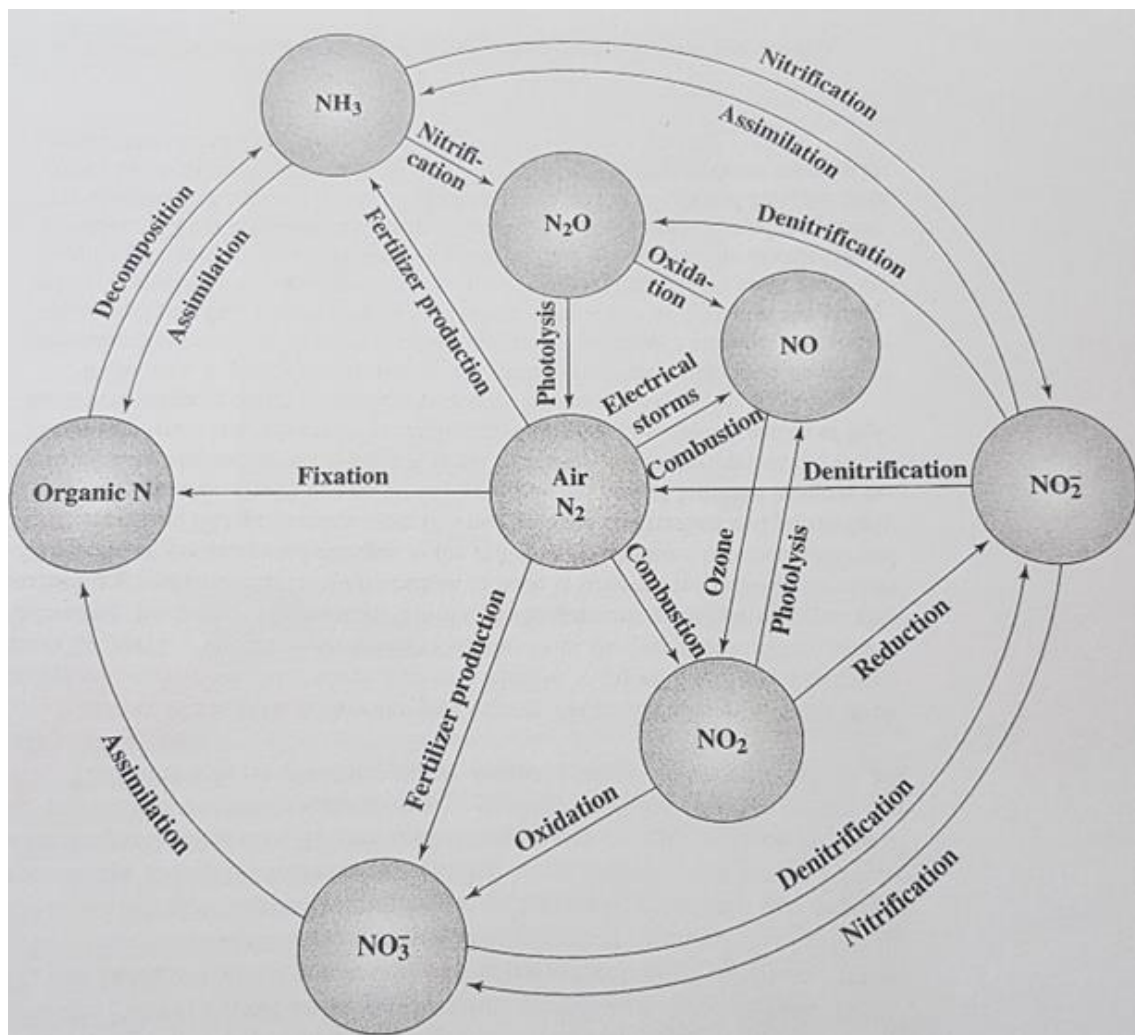


Figura 1: Ciclo do Azoto. (fonte: Chemistry for Environmental Engineering and Science, 5th edition).

Na análise química a soma das concentrações de amônia, nitrito, nitrato e nitrogênio orgânico é contabilizada na forma de azoto total.

1.2.3 Fósforo

O grande número de formas como o fósforo afeta os fenômenos ambientais acabaram gerando um grande interesse por técnicas capazes de determiná-lo. O fósforo geralmente aparece no meio hídrico de 3 modos distintos:

- Fósforo orgânico: a forma na qual ele compõe moléculas orgânicas como os detergentes;
- Ortofosfatos: na forma de radicais que se combinam à cátions para formar sais inorgânicos nas águas;
- Polifosfato: ou fosfatos condensados, ou ainda, polímeros de ortofosfatos, essa forma é rapidamente hidrolisada e se converte em ortofosfato.

São os compostos inorgânicos do fósforo que geram maior preocupação para o ambiente, os ortofosfatos, fosfatos e suas formas molecularmente desidratadas, chamados de polifosfatos ou fosfatos condensados, o fósforo orgânico tende a ser de menor preocupação.

A maior fonte de fósforo nas águas superficiais ainda são as descargas sanitárias (provenientes, principalmente, de fezes e detergentes). As indústrias, em termos gerais são as mesmas que contribuem com a contaminação de azoto, com seus efluentes também são caracterizadas como fontes importantes de fósforo nessas águas. Assim como o azoto, o excesso de fósforo nas águas vai ocasionar a proliferação anormal de microrganismos e algas causando a eutrofização. É estimado que apenas 1g de fosfatos ocasionam o crescimento de 10g de algas (sem contabilizar os outros microrganismos), que consomem por volta de 150g de oxigênio dissolvido na água quando morrem e passam por processos de decomposição.

Para a análise do fósforo total é necessário realizar a conversão das diferentes formas de fósforo na água em ortofosfatos (os polifosfatos são rapidamente convertidos por hidrolise e o fósforo orgânico requer digestão ácida).

2 Validação de Métodos

Definido pela NP EN ISO 9000:2005 como “confirmação, através do fornecimento de provas objetivas, de que os requisitos para um uso específico pretendido ou aplicação foram cumpridos”, pela ISO/IEC 17025:2005 “confirmação por exame e fornecimento de provas objetivas de que são cumpridos os requisitos particulares para

um uso específico pretendido” e pela International Vocabulary of Metrology (VIM) como sendo “verificação, quando os requisitos especificados forem adequados para uma utilização prevista”. É nada mais do que um processo para definição de um requisito analítico confirmando que o método em questão tem plenas capacidades para o objetivo o qual foi designado.

2.1 Objetivo da Validação

Por ser um processo que lida com manipulações, o método usado no ensaio, pode sofrer com o acúmulo de erros (sistemáticos e aleatórios) e gerar um impacto significativo no resultado da análise. Por isso é de fundamental importância que os laboratórios de análise química tenham a sua disposição ferramentas de validação para a demonstração contínua e posterior da conformidade e qualidade de seus métodos internos de ensaios.

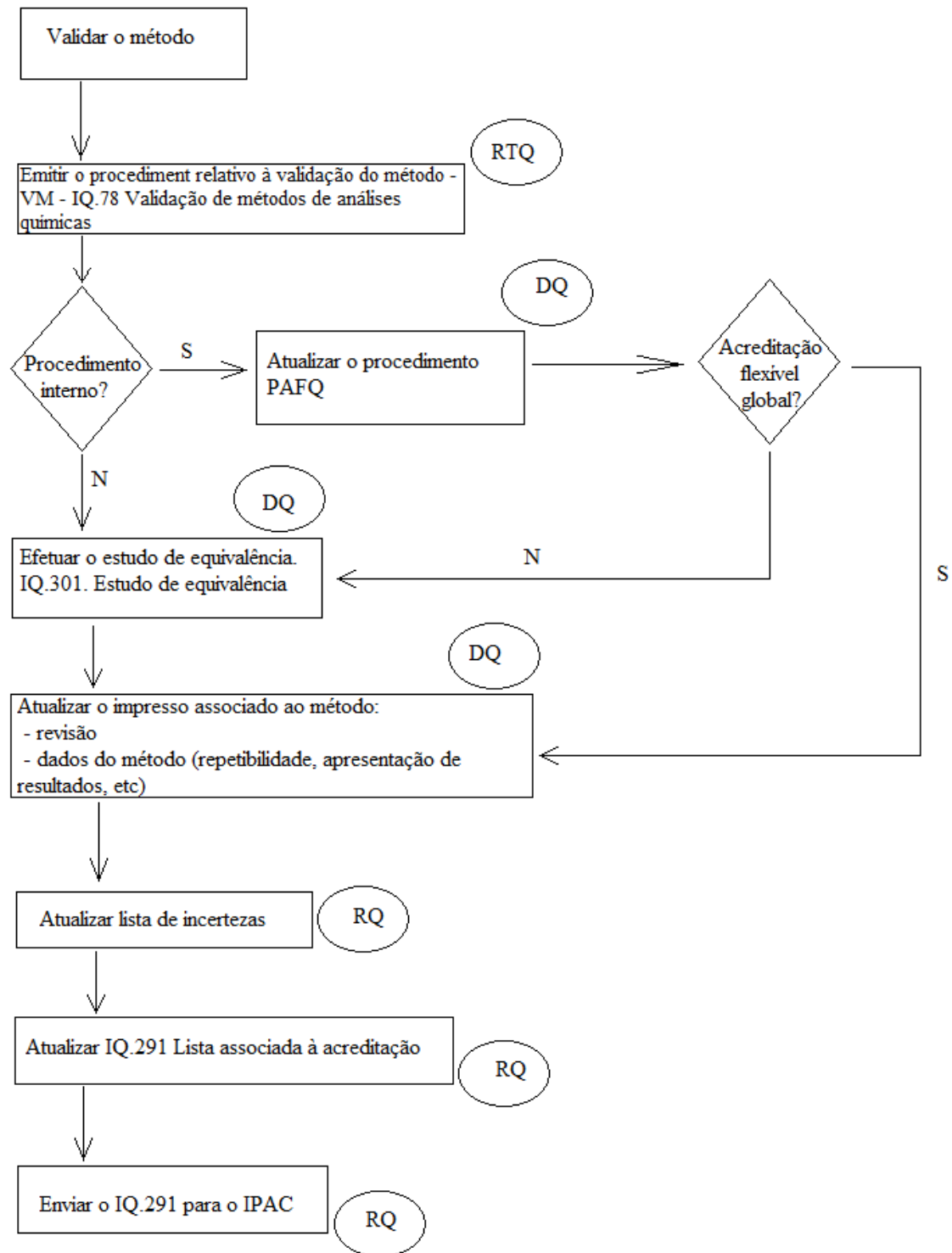
Os resultados obtidos pelos métodos de análises dos laboratórios têm diversas aplicações que vão influenciar decisões e por isso tem de ser confiáveis e claros.

2.2 Processo de Validação

Ao longo do processo de validação do método em específico alguns parâmetros devem ser avaliados direta e indiretamente, de acordo com o procedimento relativo ao controle da qualidade da Silliker (PCQ.34) são eles:

- ✓ Precisão.
- ✓ Repetibilidade.
- ✓ Precisão Intermédia.
- ✓ Exatidão.
- ✓ Limites de Detecção e Quantificação.
- ✓ Linearidade.
- ✓ Gama de Trabalho.
- ✓ Incerteza.
- ✓ Resultados.

Na Silliker o processo de validação de métodos segue o fluxograma abaixo, definido no procedimento interno relativo ao controlo de qualidade PCQ.34:



RTQ: Responsável Técnico de Química. RQ: Responsável de Qualidade. DQ: Departamento de Qualidade.

2.3 Avaliação Indireta

2.3.1 Seletividade e Especificidade

A seletividade de um método analítico trata-se da capacidade que tal método tem para identificar e quantificar, sem restar dúvidas, um analito numa amostra que pode conter outros componentes, sejam impurezas ou componentes da matriz. Estes outros componentes, ou interferentes, são as substâncias capazes de gerar alterações na quantificação e ocasionar desvios sistemáticos. De acordo com a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) diz respeito à “extensão do qual o método pode ser usado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem interferências de outros componentes de comportamento semelhante”. Desse modo, a seletividade de um método, também pode ser encarada como uma medida do quanto um determinado método consegue quantificar o analito numa mistura com interferentes e nas condições analíticas previamente definidas para a análise da matriz em questão.

No estudo das possíveis interferências são utilizados ensaios de recuperação, em que amostras de mesma matriz tem sua concentração variada por contaminação com soluções de concentrações bem conhecidas, para através da **equação 4** chegar ao percentual de recuperação.

$$\%Recuperação = \frac{(C_{amostra\ reforçada} - C_{amostra})}{C_{solução\ reforço}} \times 100 \quad (4)$$

Onde $C_{amostra\ reforçada}$ é a concentração da amostra contaminada com a solução reforço, $C_{amostra}$ é a concentração da amostra e $C_{solução\ reforço}$ é a concentração da solução reforço.

Especificidade trata-se da capacidade do método em quantificar, corretamente e sem dúvidas, um analito em meio a outros componentes presentes na matriz, de forma que o resultado obtido tenha origem apenas no analito. Na prática o método é considerado específico se suas taxas de recuperação forem próximas de 100%, geralmente o aceitável é entre 80% e 120%.

2.3.2 Quantificação

2.3.2.1 Curvas de Calibração

Na análise quantitativa, a calibração, indica o processo pelo qual a resposta proveniente de uma medida se relaciona com a concentração de uma substância analisada. As curvas de calibração deverão ser efetuadas sempre que se aplicar ao método em questão (no caso dos métodos validados neste relatório, uma auditoria interna posteriormente avaliada pelo IPAC, atestou que as análises poderiam ser feitas diretamente contra a curva do aparelho espectrofotómetro HACH DR 1900 sem a necessidade de efetuar curva de calibração para cada análise).

Para a elaboração da curva de calibração os padrões devem ser distribuídos equitativamente ao longo da gama de trabalho, o ensaio em branco (solução com todos os reagentes, exceto o analito em estudo) geralmente é diferente de zero e é incluído na curva de calibração.

A aceitação da curva de calibração depende de alguns critérios, como: coeficiente de correlação, gama de trabalho, linearidade e declive.

A fórmula da equação da reta é mostrada na **equação 5**:

$$y = a + bx \quad (5)$$

onde “a” representa a ordenada na origem, “b” é o declive e “x” e “y” são conjuntos de pares ordenados que formam a reta (x1, y1; x2, y2; x3, y3; xn, yn; onde “n” corresponde ao número de pontos marcados na reta). Na representação gráfica “x” corresponde às concentrações e “y” ao sinal do aparelho (aqui será a absorvância Abs). O declive da reta (b) deve cumprir com o determinado pelos critérios de aceitação do declive definidos pelos impressos de controle de qualidade.

O coeficiente de correlação é definido pela **equação 6**:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^N [(xi - \bar{x}) \times (yi - \bar{y})]}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (xi - \bar{x})^2] \times [\sum_{i=1}^N (yi - \bar{y})^2]}} \quad (6)$$

Onde a média de x, $\bar{x}$, é a média dos valores de concentração dos padrões e a média y, $\bar{y}$, corresponde à média dos valores de resposta do aparelho. O valor desse

coeficiente fica entre -1 e +1, sendo -1 quando há correlação negativa (inversamente proporcional) e +1 na correlação positiva (diretamente proporcional) e para a curva de calibração ser aceita o coeficiente tem que ser de pelo menos 0.995.

Trata-se por gama de trabalho o intervalo de concentrações no qual o método fornece ao analito resultados com precisão, exatidão e linearidade. A linearidade é a capacidade do método para obter sinais que são diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra. A extremidade inferior da faixa de trabalho é definida pelo limite de quantificação (LQ) e a superior por concentrações nas quais não são observadas anomalias significativas a sensibilidade analítica do método.

Nas situações em que os métodos necessitam de curvas de calibração com gamas de trabalho que não estão propriamente definidas em documentos ou que porventura tenham sido modificadas a norma ISO 8466-1 (Qualidade da água - Calibração e avaliação de métodos analíticos - Parte 1: Função de calibração linear) define as diretrizes para a avaliação da gama de trabalho através do Teste da homogeneidade das variâncias para checar se a gama está bem ajustada ou não.

Inicialmente é preciso determinar as variâncias dos padrões usados na análise (os padrões limites da gama) S^2_1 e S^2_4 de acordo com a **equação 7**:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (7)$$

A média de y é dada pela **equação 8**:

$$\bar{y}_i = \frac{\sum_j^{10} y_{i,j}}{n_1} \quad (8)$$

i é o número da solução padrão utilizada (nos métodos validados vai de 1 a 4).

j corresponde ao número de repetições feitas por padrão.

Através do teste PG as variâncias são estudadas para verificar a existência de diferenças significativas nos limites da gama de trabalho, duas situações podem acontecer:

$$PG = \frac{S_4^2}{S_1^2}, \text{ quando } S_4^2 > S_1^2$$

Ou

$$PG = \frac{S_1^2}{S_4^2}, \text{ quando } S_4^2 < S_1^2$$

O valor calculado para PG é comparado com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor/Fisher para n-1 graus de liberdade, criando duas possíveis situações:

- $PG \leq F$, não existem diferenças significativas entre as variâncias e a gama de trabalho está bem ajustada;
- $PG > F$, existem diferenças significativas entre as variâncias e a gama de trabalho deve ser reduzida até a diferença das variâncias cumprir o primeiro critério.

2.3.3 Limites Analíticos

São os limites inferiores da curva de calibração do método relacionados a baixos níveis de concentração do analito (ou pouca seletividade do método). Chamados de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), são de suma importância, já que possibilitam ao analista reconhecer os limiares analíticos inferiores do método utilizado. De acordo com o Guia Relacre 13 existem várias formas de calcular esses limiares analíticos e devem ser atualizados por parte do laboratório que aplica o método sempre que for necessário.

2.3.3.1 Limite de Detecção (LD)

Definido pela IUPAC, em termos gerais, como sendo a “menor quantidade ou concentração de analito na amostra de teste que pode ser confiavelmente distinguida de zero”. É a menor quantidade de substância em análise possível de ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada com um valor exato. Assim, uma leitura que seja menor que o LD não significa automaticamente em ausência do analito. Segundo o Guia Relacre 13, para definir de maneira correta o LD é necessário conhecer os conceitos estatísticos do erro de tipo I e erro de tipo II, sendo eles:

- Erro de tipo I: chamado de “risco α ”, é a probabilidade de concluir que o analito está na presente no composto, quando na realidade ele não está;
- Erro de tipo II: chamado de “risco β ”, é a probabilidade de concluir que o analito não está presente no composto, quando na realidade ele está.

Por recomendações da IUPAC esses dois tipos de erros devem ser minimizados ao ponto de $\alpha = \beta = 5\%$.

A termos quantitativos o limite de detecção (LD), no caso geral, é dado pela **equação 9**:

$$L.D. = X_0 + K \times \sigma_0 \quad (9)$$

Onde:

X_0 : média aritmética do teor medido por uma série de brancos ou padrões vestígio.

σ_0 : desvio padrão de X_0 .

Sendo a lei de probabilidade e X_0 conhecida e de distribuição normal, o K assume o valor de $\cong 3.3$ para nível de confiança por volta dos 99.7%, e assim a expressão passa a ser a **equação 10**:

$$L.D. \cong X_0 + 3.3 \times \sigma_0 \quad (10)$$

Quando o método em causa usa calibração linear, o LD, vem da **equação 11**:

$$L.D. = \frac{(3.3 \times S_{y/x})}{b} \quad (11)$$

$S_{y/x}$: desvio padrão residual da curva de calibração;

b: declive da curva de calibração.

2.3.3.2 Limite de Quantificação (LQ)

Segundo o Eurachem é “a menor concentração de analito que pode ser determinado, com precisão e exatidão aceitáveis”. Geralmente o LQ define a concentração do padrão de controle de menor concentração, o primeiro ponto da curva de calibração. Após a sua determinação o LQ deve ser submetido a testes para confirmar se a precisão e exatidão obtidas são aceitáveis. Os testes consistem na passagem de padrões com concentrações próximas ou iguais ao padrão de menor concentração por condições de precisão intermédia. A IUPAC estabelece que o coeficiente de variação desses padrões não pode passar de 10%.

No caso geral, em termos quantitativos, é expresso pela **equação 12**:

$$L.Q. = X_0 + 10 \times \sigma_0 \quad (12)$$

X_0 : média aritmética do teor medido por uma série de brancos ou padrões vestígio.

σ_0 : desvio padrão de X_0 .

Quando o método em causa usa calibração linear, o LQ, vem da **equação 13**:

$$L. Q. = \frac{(10 \times s_{y/x})}{b} \quad (13)$$

$s_{y/x}$: desvio padrão residual da curva de calibração;

b : declive da curva de calibração.

É fazendo a razão entre Eq 13 e Eq 11 que se chega à aproximação prática de que o $LQ = 3 * LD$. A **figura 2** mostra como é feita a interpretação dos resultados usando os conceitos de LD e LQ.

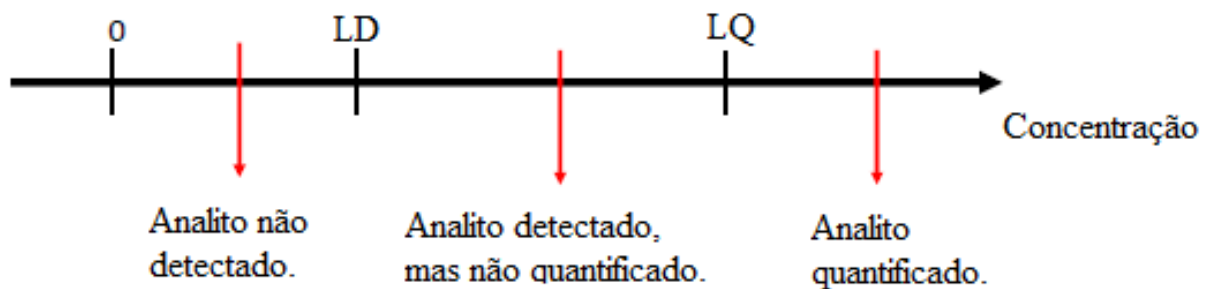


Figura 2: Interpretação dos resultados usando os conceitos de LD e LQ (figura própria).

2.3.3.3 Sensibilidade

É um parâmetro usado na avaliação da aptidão de um método ou equipamento em evidenciar pequenas diferenças de concentração de um analito, ou seja, em um método sensível a mínima alteração na concentração do analito implica em alteração relevante no sinal. A sensibilidade é definida como o quociente de ΔL (acréscimo do valor lido) e ΔC (variação da concentração) desse acréscimo, de acordo com a **equação 14**.

$$Sensib. = \frac{\Delta L}{\Delta C} \quad (14)$$

Além disso, a sensibilidade também é definida como a derivada de 1ª ordem da curva de calibração e na prática pelo controle do declive das curvas de calibração.

2.3.4 Precisão

Quando uma amostra é analisada várias vezes os resultados individuais variam de teste para teste, a precisão é uma medida dessa variação. Quanto mais próximos (menos dispersos) os resultados entre as análises individuais, mais precisos são (**figura 3**). É uma medida da dispersão dos resultados. A norma ISO 3534:2014 define a precisão como “a concordância entre os resultados obtidos por aplicação do mesmo procedimento de ensaio várias vezes em materiais idênticos, em condições definidas”, ela é avaliada através do estudo da repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade. É sempre importante salientar que precisão não implica em exatidão (**figura 4**) e trata acerca da componente aleatória dos erros.

• Resultados

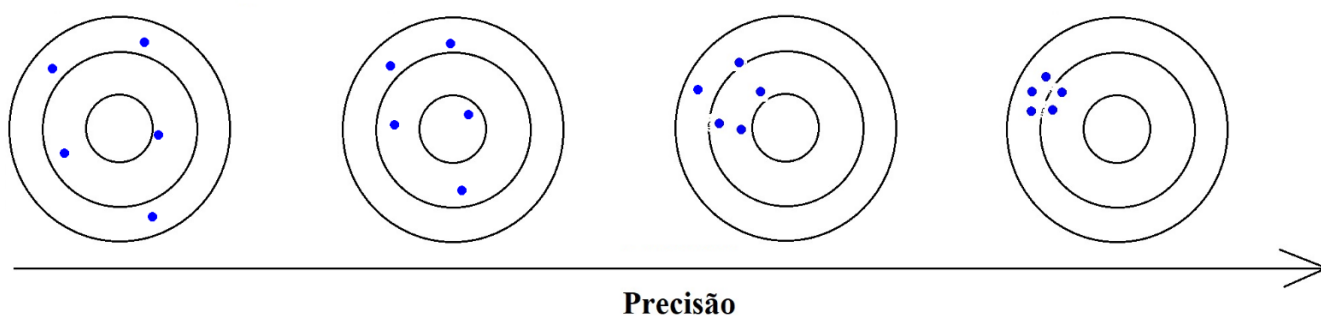


Figura 3: Precisão aumenta à medida que a dispersão entre os resultados diminui (fonte: figura adaptada do Guia RELACRE 3 - 1996).

• Resultados

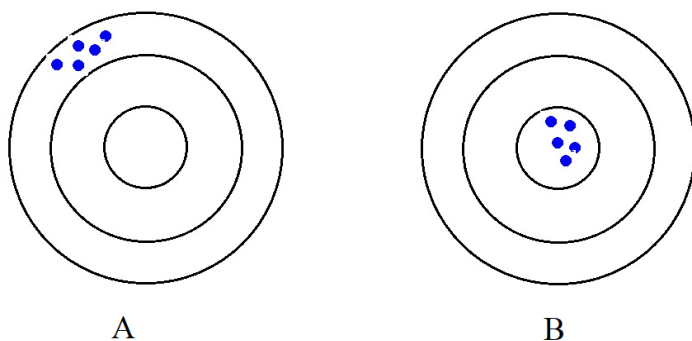


Figura 4: Na imagem A os resultados são precisos, porém com menor exatidão. Em B são precisos e com maior exatidão (fonte: figura adaptada do Guia RELACRE 3 - 1996).

2.3.4.1 Repetibilidade

A repetibilidade da medição expressa a proximidade dos resultados obtidos com a mesma amostra usando o mesmo procedimento de medição, mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo tipo de reagente e curtos intervalos de tempo. Esses fatores são chamados de condições de repetibilidade. De acordo com a ISO 3534 é simplesmente a precisão obtida “nas mesmas condições”.

O valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (usualmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i e X_{i-1}) obtidos nas condições de repetibilidade é chamado de limite de repetibilidade (r).

- Quando $|X_i \text{ e } X_{i-1}| \leq r$, os resultados das duas determinações são aceitos.
- No caso de ocorrer $|X_i \text{ e } X_{i-1}| > r$, é necessário realizar uma análise crítica e, caso seja preciso, repetir os ensaios como estabelecidos no procedimento interno PCQ.04 (procedimento relativo ao controle de qualidade da Silliker)

Uma das formas de determinar a repetibilidade é por meio de ensaios interlaboratoriais ou no próprio laboratório onde ocorre o estudo. Na determinação da repetibilidade de um método no próprio laboratório são necessárias uma série de medições (n) de um mesmo padrão ou amostra (em condições de repetibilidade). De acordo com o PCQ.34 da Silliker, para a implementação de um novo método analítico são necessárias $n \geq 7$ e para a revalidação desse mesmo método, $n \geq 3$. Já na avaliação da repetibilidade em ensaio interlaboratorial o número de medições é $n \geq 2$.

A **equação 15** expressa a estimativa da variação (S_r^2) do método calculando a média ponderada de todas as estimativas de variações de “w” séries de análises, todas obtidas em condições de repetibilidade. Assim, a variância associada à repetibilidade do método, para cada nível 1 de concentração vai ser:

$$S_{ri}^2 = \frac{\sum_{w=1}^p [(n_{wi}-1) \times S_{wi}^2]}{\sum_{w=1}^p (n_{wi}-1)} \quad (15)$$

Onde:

S_{ri}^2 é a variância da repetibilidade associada aos resultados de cada laboratório.

S_{wi}^2 é a variância associada aos resultados considerados, para cada laboratório.

$(n_{wi} - 1)$ representa os graus de liberdade da série de análises.

P é o número de laboratórios particulares ou a série de ensaios realizados no laboratório.

O cálculo do limite de repetibilidade (r), para um nível de confiança de 95%, é realizado como mostra a **equação 16**:

$$r = t \times \sqrt{2 \times S_{ri}^2} = 1.96 \times \sqrt{2 \times S_{ri}^2} = 2.8 \times \sqrt{S_{ri}^2} \quad (16)$$

Onde:

S_{ri} é o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados levados em consideração.

O cálculo do limite de repetibilidade (RSD) relativo em percentagem, para cada nível de concentração, é feito de acordo com a **equação 17**:

$$r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \times 2.8 \quad (17)$$

Em que:

$\bar{x}$ é a média dos valores.

S_{ri} é o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados.

O cálculo do coeficiente de variação de repetibilidade (CVr), também em percentagem, é dado pela **equação 18**:

$$CV_r = \frac{S_{ri}}{\bar{x}} \times 100 \quad (18)$$

Onde:

$\bar{x}$ é a média dos valores.

S_{ri} é o desvio padrão da repetibilidade associada aos resultados considerados.

2.3.4.2 Precisão Intermédia

Por precisão intermédia, entende-se a precisão medida sobre a mesma amostra ou amostras idênticas (padrões de controle ou MRCs, por exemplo), com o mesmo método, mesmo laboratório e variando uma ou mais condições:

- Analistas: pode ser qualquer analista do laboratório.
- Equipamentos: dentro de um laboratório podem existir mais de um equipamento para a mesma análise (por exemplo, balanças).
- Espaço de tempo: análises executadas em intervalos de tempo grandes o suficiente para serem afetadas pelas condições ambientais.
- Com/sem verificação da calibração.
- Etc.

Antes de proceder o cálculo da precisão intermédia é necessário eliminar os chamados valores aberrantes ou “outliers”, que pode ser feito através de uma análise gráfica ou aplicando o teste de Grubbs. Onde o teste é feito da seguinte forma, expressada pelas **equações 19, 20 e 21**.

onde $\bar{x}$:

$$\bar{x} = \frac{1}{p} \times \sum_{i=1}^p x_i \quad (19)$$

o S :

$$S = \sqrt{\left[\frac{1}{p-1} \times \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2 \right]} \quad (20)$$

Calcular o G_p :

$$G_p = \frac{(x_p - \bar{x})}{S} \quad (21)$$

Com o apoio de uma tabela de valores críticos para o teste de Grubbs, deve ser executada a seguinte análise:

- Se o valor absoluto de G_p é menor ou igual ao valor crítico a 5%, então o resultado testado é aceite como correto.

- Se o valor absoluto de G_p é maior do que o valor crítico a 5%, porém menor ou igual ao valor crítico para 1%, o resultado testado é chamado de “straggler” e é considerado.
- No caso do valor absoluto de G_p ser maior que o valor crítico a 1%, o resultado testado é excluído por ser estatisticamente um “outlier”. A medida a ser tomada é gerar outro resultado a fim de substituir o que foi excluído.

Após o tratamento estatístico dos valores com o teste de Grubbs os resultados analíticos obtidos são usados no cálculo da precisão intermédia, que pode ser realizado através de um método com ensaio único ou com duplicados.

No método simplificado (ensaio único) as amostras, preferencialmente, devem ser padrões de controle, MRCs ou a mesma amostra, para garantir que sejam o mais idênticas possível. Esse método é feito com $n \geq 15$ ensaios, onde uma ou mais condições de repetibilidade são alteradas. Assim o primeiro passo do cálculo é obter o desvio padrão de precisão intermédia de acordo com a **equação 22**:

$$\sigma_i = \sqrt{\left[\frac{1}{n-1} \times \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2 \right]} \quad (22)$$

Onde:

n : é o número de ensaios realizados por amostra.

y_k : é o resultado individual obtido.

$\bar{y}$: é a média aritmética dos resultados obtidos.

No método com ensaios duplicados o cálculo do desvio padrão da precisão intermédia é feito com o uso do número de amostras ensaiadas (t) e de ensaios realizados com cada amostra (n). No caso em que $n = 2$ (ou seja, dois ensaios por amostra), o desvio padrão é calculado pela **equação 23** a seguir.

$$\sigma_i = \sqrt{\left[\frac{1}{2 \times t} \times \sum_{j=1}^t (y_{j1} - y_{j2})^2 \right]} \quad (23)$$

Onde:

t : é o número de amostras ensaiadas.

n : é o número de ensaios realizados por amostra.

j: é o número da amostra (de 1 a t).

y_{j1} : é o primeiro resultado para a amostra j.

y_{j2} : é o segundo resultado para a amostra j.

Com o desvio padrão da precisão intermédia segue-se para o cálculo do coeficiente de variação intermédia (CV_{pi}), em percentagem, de acordo com a **equação 24**.

$$CV_{pi} = \frac{\sigma_i}{M} \times 100 \quad (24)$$

em que:

σ_i : desvio padrão da precisão intermédia previamente calculado.

M: média de todos os resultados obtidos.

O cálculo do limite da precisão intermédia é feito de acordo com a **equação 25**.

$$\text{Limite da precisão intermédia (\%)} = \frac{\sigma_i \times 100 \times 2.8}{M} \quad (25)$$

Onde:

σ_i : desvio padrão da precisão intermédia.

M: média dos resultados.

Em termos gerais: S_{repetibilidade} ≤ S_{precisão intermédia}

2.4 Avaliação direta

2.4.1 Exatidão

A norma ISO 3534:2014 define a exatidão de um método analítico como a concordância entre o valor obtido e o valor convencionalmente aceito como verdadeiro. É o quão próximo o resultado de um experimento está do resultado verdadeiro ou esperado.

A exatidão, geralmente, é avaliada com o uso de materiais de referência certificados (MRCs) e ensaios de comparação interlaboratoriais (o BIPEA Waste Water, neste caso específico da Silliker) e trata da componente sistemática dos erros.

2.4.1.1 Materiais de Referência Certificados (MRCs)

Definidos pelo Guia ISO 30:2015 como “material de referência em que o valor de uma (ou mais) propriedades foi certificado por um processo tecnicamente válido, sendo acompanhado ou rastreável a um certificado ou outro documento produzido pela entidade certificadora”, onde o termo “material de referência é definido por “material ou substância com uma (ou mais) propriedade bem estabelecida para ser usado na calibração de um equipamento, avaliação de um método de medida, ou atribuição de valores a materiais”. Cada MRC tem um valor bem estabelecido para o seu parâmetro em questão, assim como uma incerteza associada. São usados na avaliação, por meio de sua análise, dos métodos/análises do laboratório, de forma que o resultado de sua análise deve ser posto ao lado do seu valor certificado para fins de comparação e assim determinar o erro e a exatidão associada à análise. Se o valor obtido na análise estiver fora do intervalo determinado pela incerteza certificada no MRC, o correto a se fazer é tentar identificar o motivo do erro ao longo da cadeia do método para corrigi-lo, ou aceitá-lo justificando a decisão.

Os resultados da análise dos MRC podem ser avaliados com o cálculo do erro relativo, teste de hipótese (teste t), fator de desempenho Z (Z-score) e erro normalizado.

Erro relativo é calculado pela seguinte **equação 26**:

$$\text{Erro relativo} = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \times 100 \quad (26)$$

X_{lab} : valor obtido experimentalmente.

X_v : valor certificado pelo MRC.

Os requisitos para aceitar o resultado do erro relativo dependem do método utilizado.

Teste de hipótese é dado pela **equação 27**:

$$t = \frac{(X_{lab} - X_v) \times \sqrt{N}}{S_{xlab}} \quad (27)$$

X_{lab} : média dos valores experimentais obtidos pelo laboratório.

N: número de amostras ensaiadas.

S_{xlab} : desvio padrão da média dos valores do laboratório.

Em seguida o valor t é comparado ao valor tabelado, de forma que:

- $|t| \leq t_{tab}$: não há evidências de erros sistemáticos e o teste é aceite.
- $|t| \geq t_{tab}$: há evidências de erros sistemáticos e o teste não é aceite.

Fator de desempenho Z é obtido pela **equação 28**:

$$Z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{S} \quad (28)$$

S : incerteza certificada no MRC.

X_{lab} : média dos valores obtidos no laboratório.

X_v : valor certificado do MRC.

De acordo com a ISO/IEC 17043:2010, o Z -score é avaliado da seguinte forma:

- $|Z| \leq 2$: o desempenho é satisfatório.
- $2 < |Z| \leq 3$: o desempenho é questionável.
- $|Z| > 3$: o desempenho é insatisfatório.

Erro normalizado

Se a incerteza do resultado do laboratório (U_{lab}) for calculada e o valor verdadeiro (X_v) não ficar dentro do intervalo de incerteza de (X_{lab}), o erro normalizado deve ser calculado para avaliar o desempenho através da **equação 29**:

$$E_n = \frac{(X_{lab} - X_v)}{\sqrt{(U_{lab}^2 + U_{ref}^2)}} \quad (29)$$

U_{ref} : incerteza associada ao valor verdadeiro.

Se $|E_n| \leq 1$: então U_{lab} está bem estimado.

2.4.1.2 Ensaios de Comparação Interlaboratorial (ECI)

Os tipos de ensaios de comparação interlaboratorial, a depender do objetivo em causa, podem variar e geralmente são regulamentados por organismos acreditados ou certificados. Para os ensaios interlaboratoriais com águas residuais, a Silliker, participa do teste de proficiência do “Bureau Interprofessionnel d’Etudes Analytiques” BIPEA pelo “PT 52: Waste Waters, Physico chemical analysis”.

De acordo com a norma ISO/IEC 17043:2010 o ensaio interlaboratorial é a organização, realização e avaliação de um ensaio com a mesma amostra por mais de um laboratório, seguindo condições pré-estabelecidas. A NP ISO/IEC 17025:2005 trata os ECIs como requisito básico de garantia de qualidade dos resultados do método de um laboratório.

O Guia Relacre 7 divide os ECIs em 5, são eles:

- ECI de aptidão ou competência, que serve para determinar o desempenho do laboratório ou analista (em alguns países a aprovação nesse ensaio é pré-requisito para a acreditação do laboratório);
- ECI colaborativo, tem a função de determinar as características para a realização de uma metodologia de análise;
- ECI comparativo, que como o nome já diz, faz a comparação dos resultados obtidos (inclusive por métodos diferentes);
- ECI de consenso ou conformidade, tem por objetivo determinar as propriedades de um material por vários laboratórios;
- ECI de certificação, servem para estabelecer o “valor verdadeiro” de um possível MRC, assim como a sua incerteza.

2.5 Incerteza

A incerteza é definida pelo International Vocabulary of Metrology (VIM) como um “parâmetro, associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão dos valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos ao mensurando” e pelo Deutsches Institut Fur Normung (DIN) como a “quantidade estimada destinada a caracterizar um intervalo de valores que contém o valor de referência, em que este último pode ser o valor verdadeiro ou a expectativa, dependendo da definição ou do estabelecido”.

É importante, segundo o Guia CITAC CG 4 do EURACHEM, fazer a distinção entre erro e incerteza. Onde o erro é definido como sendo a diferença entre o resultado e seu valor verdadeiro e em princípio o valor de um erro conhecido pode ser aplicado com uma correção do resultado. Já a incerteza tem a forma de um intervalo e se for estimada para um procedimento analítico e tipo de amostra definido, pode ser aplicado a todas as determinações descritas e, em geral, seu valor não deve ser usado na correção de um resultado medido.

A incerteza tem várias fontes ao longo do processo de análise (ou até anteriores se forem computadas as incertezas associadas à amostragem, armazenamento etc.) como ambiente, analista, instrumentos, homogeneização etc. O ideal seria que a propagação da incerteza em todas essas fontes fossem quantificadas e contribuíssem no cálculo global da incerteza, mas como isso em contexto laboratorial é praticamente impossível, a ISO 11352:2012 especifica um conjunto de procedimentos que permitem aos laboratórios realizarem a estimativa global da incerteza utilizando os resultados obtidos durante a validação e controle de qualidade do método. Assim a conjugação da componente aleatória (precisão) com a componente sistemática (exatidão) dá origem a incerteza do método.

Para a estimativa da incerteza associada a componente aleatória, é feito o cálculo da reprodutibilidade interlaboratorial ($U_{(R_{w,relativo})}$), usando os resultados dos padrões de controle analisados durante os estudos da precisão intermédia e combinando-os de acordo com a **equação 30** a seguir.

$$u_{(R_{w,relativo,c})} = R_{w,relativo,c} = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^n \left(u_{(R_{w,relativo,i})} \right)^2}{n_{R_w}} \right)} \quad (30)$$

onde:

$u_{(R_{w,relativo,i})}$: desvio padrão da precisão intermédia de cada análise (%).

$R_{w,relativo,c}$: desvio padrão relativo combinado (%)

n: número de resultados

O cálculo do $u(bias)_{relativo}$, em que a veracidade do método (bias) corresponde a incerteza associada a componente sistemática pode ser realizado com a utilização de um ou mais MRCs (a forma de calcular varia se for um ou mais de um) e segue a sequência das **equações** abaixo até o seu cálculo e posteriormente o cálculo da incerteza padrão combinada (entre as componentes aleatórias e sistemáticas) e expandida (incerteza global).

$$bias_{relativo} = \frac{\overline{LV} - CV}{CV} \times 100. \quad (31)$$

$\overline{LV}$: média do valor obtido experimentalmente pelo laboratório.

CV: valor certificado do MRC.

O S_{bias} , desvio padrão associado aos resultados do MRC, é obtido:

$$S_{bias} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (LV_i - \overline{LV})^2}{n-1}} \quad (32)$$

n: número de resultados

$S_{bias\ relativo}$ é obtido:

$$S_{bias\ relativo} = \frac{S_{bias}}{\overline{LV}} \times 100 \quad (33)$$

Em seguida o $u(C_{ref})$ que é a componente da incerteza fornecida no certificado do MRC ou obtida da seguinte forma:

$$u(C_{ref}) = \frac{\frac{\overline{UCL} - LCL}{2}}{k} \quad (34)$$

$\overline{UCL}$: limite de controle superior.

LCL: limite de controle inferior.

k: fator de cobertura (geralmente 2)

Na sequência calcula-se o $u(C_{ref\ relativo})$:

$$u(C_{ref\ relativo}) = \frac{u(C_{ref})}{CV} \times 100 \quad (35)$$

Na situação onde apenas um MRC é utilizado os resultados dessas equações são suficientes para o cálculo do $u(bias)_{relativo}$ que é feito da seguinte forma:

$$u(bias)_{relativo} = \sqrt{(bias_{relativo})^2 + \left(\frac{S_{bias\ relativo}}{\sqrt{n}}\right)^2 + u(C_{ref})_{relativo}^2} \quad (36)$$

Caso mais de um MRC sejam usados o cálculo do $u(bias)_{relativo}$ tem mais alguns passos.

A raiz quadrada média ($RMS_{bias\ relativo}$) do $bias_{relativo}$:

$$RMS_{bias\ relativo} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (bias_{relativo,i})^2}{n_{MRC}}} \quad (37)$$

n_{MRC} : número de MRCs analisados.

A componente média da incerteza dos valores certificados dos MRCs utilizados,

$\overline{u(C_{ref})_{relativo}}$:

$$\overline{u(C_{ref})_{relativo}} = \frac{\sum_{i=1}^n u(C_{ref})_{relativo,i}}{n} \quad (38)$$

E finalmente:

$$u(bias)_{relativo} = \sqrt{(RMS_{bias,relativo})^2 + (\overline{u(C_{ref})_{relativo}})^2} \quad (39)$$

Com o $u(bias)_{relativo}$ em mãos o próximo passo é calcular a incerteza combinada e a expandida.

Incerteza padrão combinada:

$$u_{relativo} = \sqrt{u(R_{w,relativo})^2 + u(bias)_{relativo}^2} \quad (40)$$

Incerteza expandida para um nível de confiança de 95%:

$$U_{relativo} = k \times u_{relativo} \quad (41)$$

A **figura 5** mostra um quadro resumo dos “erros” e seus parâmetros de avaliação e quantificação.

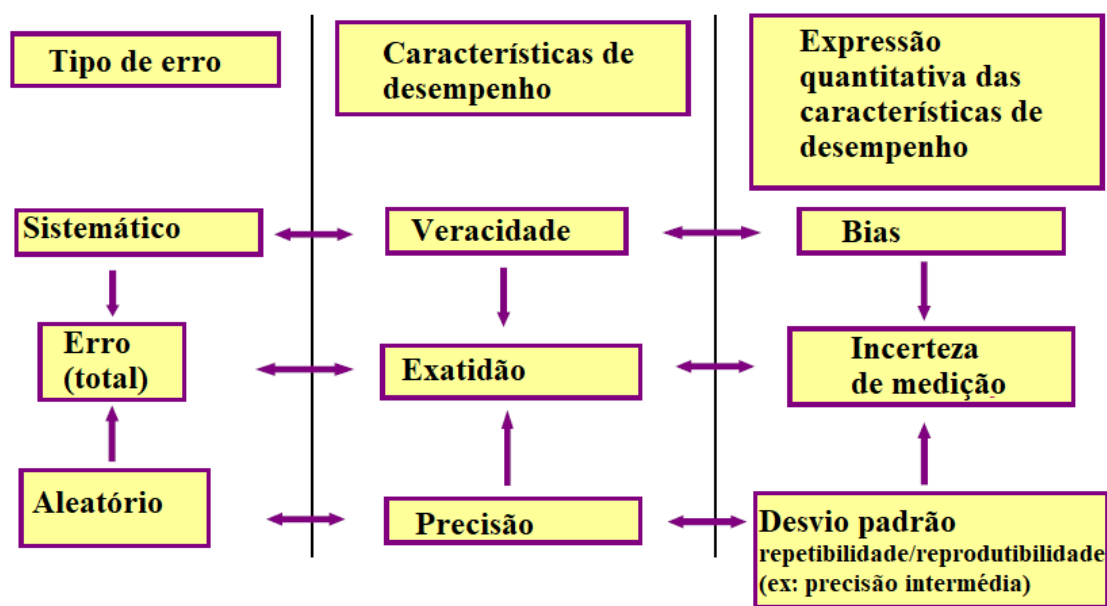


Figura 5: Quadro resumo dos erros, parâmetro de avaliação e quantificação. (fonte: adaptado de A. Menditto, et al Accred. Qual. Assur. 2006, 12, 45).

3 Não Conformidades

Ao longo da auditoria no método em validação realizada pelo IPAC, algumas não conformidades foram detectadas gerando a necessidade de ações corretivas durante o processo de validação. As não conformidade encontradas no cálculo da incerteza e no ensaio com os brancos são detalhadas a seguir.

3.1 Incerteza

De acordo com a nova versão da NP EN ISO/IEC 17025:2018 e devido às não conformidades detectas na auditoria do IPAC, o cálculo da incerteza baseado nos MRCs não pôde ser usado na validação final do método (segundo essa nova versão da NP EN ISO/IEC não é permitido o uso de MRCs que não sejam de entidades não acreditadas, caso dos produtos usados do laboratório Merck). Sendo assim, recorreu-se ao cálculo da incerteza a partir dos ensaios de recuperação realizados ao longo do processo de validação.

Esse cálculo foi efetuado com a estimação da incerteza combinada da incerteza associada à exatidão, no caso os ensaios de recuperação $u(R_m)$, e o desvio padrão da

precisão intermédia S_i (de preferência o encontrado com a precisão intermédia de ensaios duplicados), da seguinte forma **equação 42**.

$$u_{relativo} = \sqrt{\left((u_{(Rm)} \times vm)^2 + \left(\frac{S_i}{\sqrt{n}}\right)^2\right)} \quad (42)$$

$u_{(Rm)}$: incerteza associada aos ensaios de recuperação;

vm : valor medido no ensaio de recuperação;

S_i : desvio padrão da precisão intermédia;

n : quantidade de valores utilizados no cálculo.

Em seguida é calculada a incerteza expandida, **equação 43**.

$$U_{relativo} = k \times u_{relativo} \quad (43)$$

k : fator de cobertura (normalmente 2).

Para finalmente calcular a incerteza expandida relativa (%), **equação 44**.

$$U_{relativo,\%} = \frac{(U_{relativo} \times 100)}{vm} \quad (44)$$

3.2 Aceitação dos Ensaios Brancos

O IPAC constatou que os critérios de aceitação dos brancos nos ensaios de Azoto Total segundo o PAFQ.966.1 e do Fósforo Total pelo PAFQ.971.2 eram superiores aos valores das absorvâncias (Abs) dos padrões dos limites de quantificação dos respectivos métodos. Exemplo do Fósforo Total na gama baixa (LCK 349) onde o critério de aceitação do branco é de 0.1438 Abs e o do método 0.111 Abs e da gama alta (LCK 350) com critério de aceitação de 0.2144 Abs enquanto o do método é 0.170 Abs. Isso decorre do fato da Silliker usar de forma genérica como critério de aceitação $\pm 3x$ o desvio padrão, motivo pelo qual o critério de aceitação do branco tinha uma amplitude alargada.

Para investigar a não conformidade foram realizadas análises ao branco de reagente de cada um dos kits utilizados para determinação do Fósforo Total e do Azoto Total, ou seja, foi feito todo o processo de análise com os reagentes utilizados, não tendo sido feito a adição de água desionizada correspondente ao branco da série de

trabalho. Esse estudo foi executado em 2 lotes distintos e os resultados obtidos foram comparados com o valor do branco certificado no lote, como mostra a **tabela 1**:

Kit	Lote	Abs Lote	Abs Lida
Azoto Total (LCK 138)	19010	0.132	0.139
	19063	0.137	0.15
Azoto Total (LCK 238)	18298	0.134	0.141
	19059	0.133	0.141
Azoto Total (LCK 338)	18354	0.13	0.139
	19066	0.124	0.136
Fósforo Total (LCK 349)	19078	0.119	0.131
	19029	0.115	0.125
Fósforo Total (LCK 350)	19017	0.113	0.087
	19071	0.113	0.108

Em média a diferença entre a Abs do branco de reagentes e a Abs constante no certificado do lote é inferior a 10%. O valor médio dos brancos realizados com água desionizada é mostrado na **tabela 2**:

Kit	Abs
Azoto Total (LCK 138)	0.1365
Azoto Total (LCK 238)	0.1549
Azoto Total (LCK 338)	0.1622
Fósforo Total (LCK 349)	0.0979
Fósforo Total (LCK 350)	0.1005

Com os resultados obtidos nos testes o laboratório considerou que os valores de Abs dos brancos de rotina são característicos dos reagentes dos próprios kits de análises, não existindo dessa forma qualquer interferência da água utilizada pelo laboratório. Uma vez que o laboratório em cada série de trabalho analisa pelo menos dois padrões dos extremos da gama de trabalho, no início e no fim, e o resultado que é obtido é interpolado diretamente da reta de calibração gravada no equipamento, o laboratório não considera que os valores de Abs lidos sejam relevantes, já que por rotina o trabalho é feito diretamente em medidas de concentração e os resultados obtidos pelos padrões de concentração cumprem com os critérios de aceitação dos mesmo.

Assim, como medida corretiva para garantir o controle dos brancos, o laboratório passou a controlá-los da seguinte forma:

1. Sempre que for aberto um novo lote de reagente deverá ser efetuado o controle do branco do reagente sem a adição de água desionizada;
2. Os brancos do reagente e os brancos da série de trabalho (com água desionizada) passarão a ser avaliados de acordo com o valor do branco do certificado do lote e para o valor do branco ser aceito, o resultado obtido deverá estar dentro de um intervalo de $\pm 10\%$ do branco do lote.

4 Procedimento das Análises

O procedimento relativo às análises físico-químicas (PAFQ) da Silliker tem por objetivo detalhar o passo a passo da aplicação da metodologia para a determinação do composto em causa. São documentos detalhados que indicam os materiais usados nas análises, os aparelhos e utensílios, os reagentes, a técnica (como é feita a amostragem, as soluções padrão, as de verificação, o ensaio em branco e de recuperação) e como os resultados devem ser expressados e apresentados.

4.1 Azoto Total

O procedimento do azoto total está definido no PAFQ.966 intitulado de “Determinação de azoto total – método por cuvete” e estabelece a metodologia para a determinação do azoto total por espectrofotometria, fazendo uso dos kits de análise HACH LCK 138, LCK 238 e LCK 338, todos baseados na norma ISO 11905-1 “Water quality. Determination of nitrogen. Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate”. Esse método é aplicável tanto em águas residuais quanto naturais e as leituras são realizadas espectrofotometricamente a 345nm.

4.1.1 Reagentes

São todos de qualidade analítica e a água usada deve ser desionizada, são eles:

- Kit LCK 138 (**figura 6**), gama de trabalho 1 a 16 mgN/l;
- Kit LCK 238 (**figura 7**), gama de trabalho 5 a 40 mgN/l;
- Kit LCK 338 (**figura 8**), gama de trabalho 20 a 100 mgN/l;
- Solução A de hidróxido de sódio;
- Tablete B oxidante de peroxodissulfato potássio e metaborato de sódio;
- Solução D 2,6 dimetilfenol em ácido sulfúrico e ácido fosfórico;
- Solução padrão de glicina (H_2NCH_2COOH) 1000 mgN/l;

- Solução padrão de nitrato de potássio (KNO_3) 1000 mgN/l.

4.1.2 Aparelhos e utensílios

Os próprios materiais de uso comum no laboratório, são:

- Balança analítica, com capacidade de pesar com a aproximação de 0.1 mg;
- Termoreator HACH HT 200 S (**figura 9**);
- Fotómetro HACH DR 1900 (**figura 10**);
- Tubos de digestão.



Figura 6: Kit LCK 138.



Figura 7: Kit LCK 238.

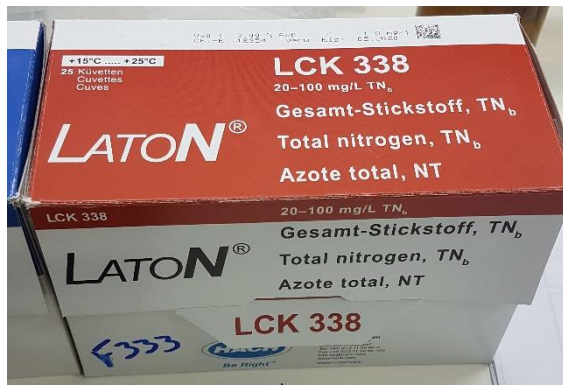


Figura 8: Kit LCK 338.



Figura 9: Termoreator HACH HT 200 S.

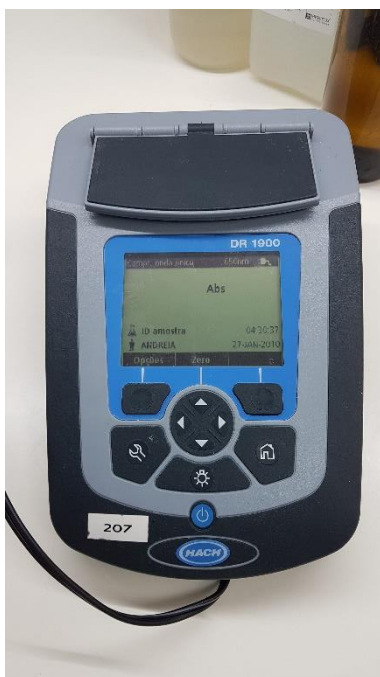
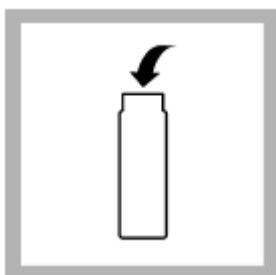


Figura 10: Fotómetro HACH DR 1900.

4.1.3 Técnica



Num tubo de digestão seco adicionar de forma sequencial e rápida:

LCK 138

1,3ml de amostra
1,3ml da solução A
1 Tablete oxidante B

LCK 238

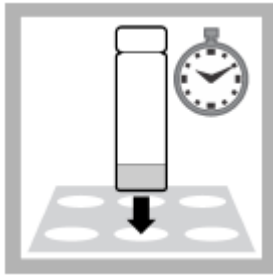
0,5ml de amostra
2,0ml da solução A
1 Tablete oxidante B

LCK 338

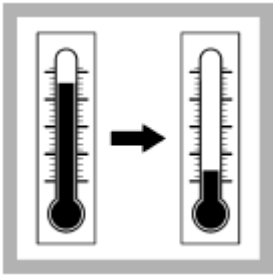
0,2ml de amostra
2,3ml da solução A
1 Tablete oxidante B



Fechar imediatamente o tubo de digestão não o invertendo.



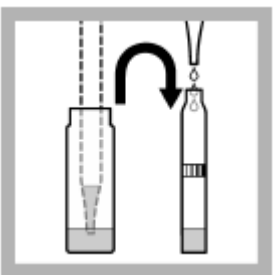
Colocar imediatamente de seguida o tubo no interior do termoreator, selecionando o programa standard HT durante 15 minutos.



Após terminar a digestão da amostra, deixar que o tubo arrefeça até atingir a temperatura ambiente.



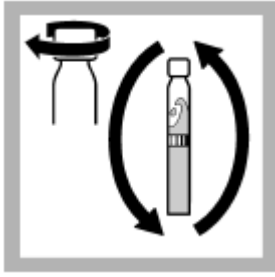
Inverter o tubo algumas vezes para uma total homogeneização do seu conteúdo.



Pipetar lentamente 0,5ml da amostra digerida para o interior de uma cuvete de ensaio (**figura 11**).



Pipetar lentamente 0,2 ml da Solução D.



Fechar imediatamente a cuvete e inverter algumas vezes até uma total homogeneização dos reagentes.



Após 15 minutos limpar o exterior da cuvete.



Inserir a cuvete no interior da câmara de leitura do fotómetro (**figura 12**), e seleccionar o programa adequado no equipamento.

Após seleção do programa carregar no botão READ, e registar o valor obtido.



Figura 11: Cuvetes de ensaio.



Figura 12: Cuvete de ensaio acoplado ao fotómetro para fazer a leitura.

4.2 Fósforo Total

O procedimento do fósforo total está definido no PAFQ.971 intitulado de “Determinação de fósforo total – método por cuvete” e estabelece a metodologia para a determinação do fósforo total por espectrofotometria, fazendo uso dos kits de análise HACH LCK 349 e LCK 350, todos baseados na norma ISO 6878:2004. Esse método é aplicável tanto em águas residuais quanto naturais e as leituras são efetuadas espectrofotometricamente a 880nm.

4.2.1 Reagentes

São todos de qualidade analítica e a água usada deve ser desionizada, são eles:

- Kit LCK 349, gama de trabalho 0,05-1,50 mg/L
- Kit LCK 350, gama de trabalho 2,0-20,0 mg/L
- Dosicap Zip, peroxidissulfato de sódio e metaborato de sódio;
- Solução B, ácido sulfúrico, heptamolibdato de amônio e tartarato de antimônio e potássio;
- Dosicap C, ácido ascórbico e metaborato de sódio;
- Solução padrão de dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) 500 mg PO_4 /l;

- Solução intermédia de dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4) 100 mg PO_4 /l

4.2.2 Aparelhos e utensílios

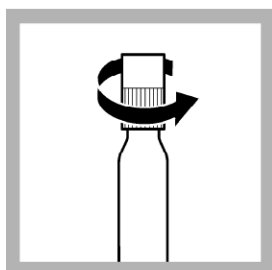
Os próprios materiais de uso comum no laboratório, são:

- Balança analítica, com capacidade de pesar com a aproximação de 0.1 mg;
- Termoreator HACH HT 200 S;
- Espectrofotômetro HACH DR 1900 VIS portátil, capaz de fazer medições de comprimento de onda no intervalo 340 – 800nm (intervalo do visível). Esse equipamento já vem carregado de fábrica com curvas de calibração para os diversos kits de análises.

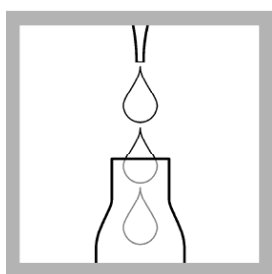
4.2.3 Técnica



Remover cuidadosamente película de alumínio do DosiCap Zip.



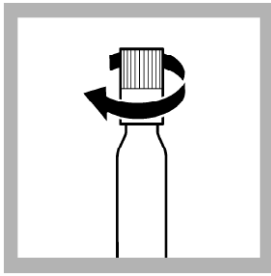
Desenroscar o DosiCap Zip da cuvete de digestão.



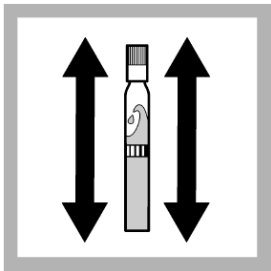
Pipetar cuidadosamente para o interior da cuvete de digestão o volume adequado de amostra:

2,0ml de amostra (LCK 349)

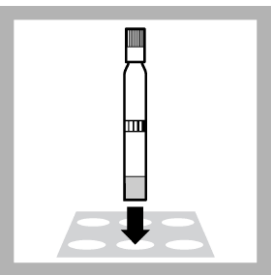
0,4ml de amostra (LCK 350)



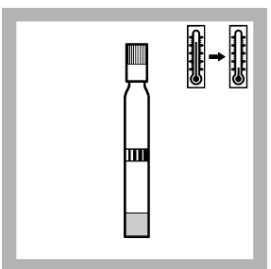
Logo de seguida enroscar com força o DosiCap Zip pela parte inversa, para que o reagente no seu interior se liberte para o interior da cuvete.



Agitar a cuvete vigorosamente para uma total homogeneização do seu conteúdo.

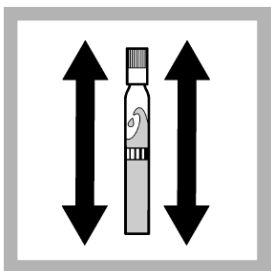


Colocar de seguida a cuvete no interior do termoreator, selecionando o programa standard HT durante 15 minutos.

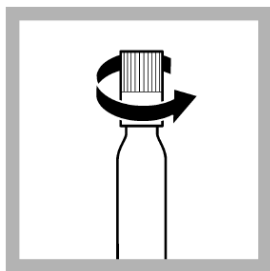


Deixar a cuvete arrefecer totalmente até atingir a temperatura ambiente.

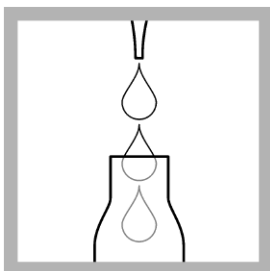
NOTA: Verificar se a DosiCap Zip se mantêm bem fechada após o período de arrefecimento.



Agitar a cuvete vigorosamente para uma total homogeneização do seu conteúdo.



Desenroscar o DosiCap Zip.

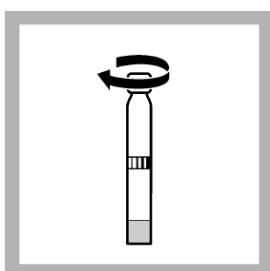


Pipetar para o interior da cuvete o volume adequado do Reagente B:

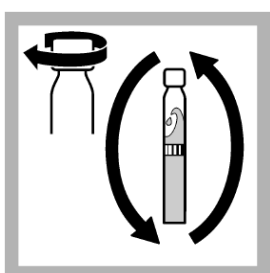
0,2ml (LCK 349)

0,5ml (LCK 350)

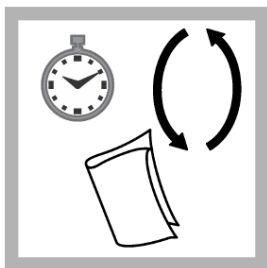
Fechar o frasco do Reagente B imediatamente após utilização.



Enroscar na cuvete de digestão uma DosiCap C (cor cinzenta).



Fechar a cuvete e inverter a mesma algumas vezes, até uma total dissolução dos reagentes adicionados pela DosiCap C.



Após 10 minutos, inverter a cuvete mais algumas vezes, e limpar o exterior da cuvete



Inserir a cuvete no interior da câmara de leitura do fotómetro (6.3.3), e seleccionar o programa adequado no equipamento.

Após seleção do programa carregar no botão READ, e registar o valor obtido.

5 Resultados e Discussão – Azoto Total

Inicialmente foi feita uma abordagem individual das 3 gamas de trabalho e posteriormente os resultados foram utilizados nas validações estatísticas do método como um todo.

5.1 Azoto LCK 138

5.1.1 Repetibilidade

Para a repetibilidade foram feitas 10 análises repetidas com a mesma amostra de água residual sob as mesmas condições (medições feitas no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, usando os mesmos tipos e lotes de reagentes e no mesmo intervalo de tempo), de acordo com o método PAFQ.966 conforme **tabela 1**.

Tabela 1: Cálculo da repetibilidade, 10 análises da mesma amostra.

Número de Medições	Data	Resultados (mg N/L)
1	22/03/2019	9.84
2	22/03/2019	9.51
3	22/03/2019	9.65
4	22/03/2019	9.43
5	22/03/2019	9.36
6	22/03/2019	9.14
7	22/03/2019	9.17
8	22/03/2019	9.42
9	22/03/2019	9.42
10	22/03/2019	9.40

Média = 9.43 mg N/L
Desvio padrão da repetibilidade = 0.21
CVR = 2.18 %
Limite da repetibilidade = 6.10

O desvio padrão da repetibilidade ficou em 0.21 mostrando que os dados estão pouco dispersos, o limite da repetibilidade foi de 6.10 e o seu coeficiente de variação foi 2.18%, apresentando uma boa repetibilidade para essa análise uma vez que o CVr é bem abaixo de 10%.

5.1.2 Precisão Intermédia

Ensaio Único

Na avaliação da precisão intermédia foram feitas 10 análises com cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC1 = 1 mg N/L e PC16 = 16 mg N/L), nas seguintes condições: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo método e mesmo equipamento, variando as datas e lotes de reagentes. Esses resultados foram submetidos ao Teste de Grubbs para identificar, e posteriormente eliminar, possíveis “outliers” conforme as **tabelas 2 e 3**.

Tabela 2: Teste de Grubbs para o PC 1.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	03/01/2019	0.98	0.92	Aceitável
2	03/01/2019	0.99	0.71	Aceitável
3	10/01/2019	1.05	0.45	Aceitável
4	22/01/2019	1.08	1.00	Aceitável
5	28/01/2019	0.93	1.90	Aceitável
6	15/03/2019	1.05	0.41	Aceitável
7	15/03/2019	1.05	0.41	Aceitável
8	18/03/2019	1.01	0.36	Aceitável
9	18/03/2019	0.99	0.74	Aceitável
10	22/03/2019	1.10	1.37	Aceitável
11	22/03/2019	1.08	0.98	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população

Média = 1.03

Desvio padrão = 0.05

p = 11

Valor crítico a 1% = 2.564

Valor crítico a 5% = 2.355

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs

Média = 1.03

Desvio padrão = 0.05

Limite da precisão intermédia (%) = 14.2

Tabela 3: Teste de Grubbs para o PC 16.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	03/01/2018	16.08	0.14	Aceitável
2	03/01/2019	15.28	1.71	Aceitável
3	10/01/2019	16.30	0.30	Aceitável
4	22/01/2019	15.76	0.77	Aceitável
5	28/01/2019	15.95	0.39	Aceitável
6	15/03/2019	16.48	0.65	Aceitável
7	15/03/2019	16.84	1.36	Aceitável
8	18/03/2019	15.68	0.93	Aceitável
9	18/03/2019	15.81	0.67	Aceitável
10	22/03/2019	16.72	1.13	Aceitável
11	22/03/2019	16.74	1.17	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população

Média = 16.15

Desvio padrão = 0.51

p = 11

Valor crítico a 1% = 2.564

Valor crítico a 5% = 2.355

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs

Média = 16.15

Desvio padrão = 0.51

Limite da precisão intermédia (%) = 8.8

Os valores absolutos de Gp foram menores que o valor crítico tabelado para 5 % em todas as medições (PC1 e PC16), sendo aceito como correto e excluindo a possibilidade de existir algum “outlier”. Ambos apresentaram baixo desvio padrão, 0.05 no PC 1 e 0.51 no PC 16, e os limites da precisão intermédia também ficaram dentro do aceitável, com 8.8 % para o PC 16 e 14.2 % para o PC 1.

Ensaio com replicados

Além dessas 2 análises também foi feito um estudo da precisão intermédia através de ensaios com duplicadas de 22 amostras de águas residuais conforme **tabela 4**.

Tabela 4: Estudo da precisão intermédia com 22 amostras em duplicato.

Data	Nº Amostra	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi²	X	A -X	B -X
03/12/2018	108580	AR	6.90	6.90	0.00	0.00	6.90	0.00	0.00
03/12/2018	108581	AR	2.35	2.57	0.22	0.05	2.46	-0.11	0.11
03/12/2018	108948	AR	1.24	1.30	0.06	0.00	1.27	-0.03	0.03
10/01/2019	113715	AR	11.91	11.63	0.28	0.08	11.77	0.14	-0.14
10/01/2019	113718	AR	5.42	5.46	0.04	0.00	5.44	-0.02	0.02
10/01/2019	117776	AR	13.95	13.73	0.21	0.04	13.84	0.11	-0.11
10/01/2019	112207	AR	1.73	1.69	0.04	0.00	1.71	0.02	-0.02
10/01/2019	114205	AR	11.61	11.61	0.00	0.00	11.61	0.00	0.00
22/01/2019	2331	AR	3.32	3.52	0.20	0.04	3.42	-0.10	0.10
22/01/2019	2699	AR	1.42	1.42	0.00	0.00	1.42	0.00	0.00
22/01/2019	4489	AR	1.04	1.04	0.00	0.00	1.04	0.00	0.00
22/01/2019	4954	AR	1.26	1.24	0.02	0.00	1.25	0.01	-0.01
22/01/2019	4953	AR	7.11	7.45	0.34	0.12	7.28	-0.17	0.17
22/01/2019	4958	AR	2.02	1.50	0.52	0.27	1.76	0.26	-0.26
15/03/2019	19262	AR	8.26	8.57	0.31	0.10	8.42	-0.15	0.16
16/03/2019	19084	AR	8.88	8.72	0.16	0.03	8.80	0.08	-0.08
17/03/2019	19082	AR	8.71	8.83	0.12	0.01	8.77	-0.06	0.06
18/03/2019	12046	AR	1.78	1.90	0.12	0.01	1.84	-0.06	0.06
19/03/2019	15853	AR	4.99	5.26	0.27	0.07	5.13	-0.14	0.14
20/03/2019	14366	AR	2.41	2.47	0.06	0.00	2.44	-0.03	0.03
21/03/2019	14365	AR	2.00	2.10	0.10	0.01	2.05	-0.05	0.05
22/03/2019	13853	AR	5.27	5.38	0.11	0.01	5.33	-0.05	0.06

População = 22

Desvio padrão da precisão intermédia (Si) = 0.14

Coeficiente de variação médio (Cvpi) = 2.69 %

Limite de precisão intermédia = 7.53 %

Resultando em baixos desvio padrão da precisão intermédia (Si) 0.14, coeficiente de variação médio (Cvpi) 2.69 % e limite de precisão intermédia 7.53 %.

5.1.3 Gama de Trabalho

Com medições executadas em condições de repetibilidade foram feitas 10 análises para cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC 1 de 1 mg N/L e PC 16 de 16 mg N/L) para através do Teste F de Fisher – Snedecor comparar a homogeneidade das variâncias e checar se a gama de trabalho está bem ajustada ou não conforme **tabela 5**.

Tabela 5: Análise da homogeneidade das variâncias com o uso do teste F.

Data	Padrão menor (1 mgN/L)	Padrão maior (16 mgN/L)
03/01/2019	0.99	15.28
03/01/2019	0.99	15.64
03/01/2019	0.99	15.38
03/01/2019	0.95	15.80
03/01/2019	1.13	15.58
03/01/2019	0.95	15.20
03/01/2019	0.95	15.74
03/01/2019	0.97	15.20
03/01/2019	1.03	15.30
03/01/2019	0.99	15.62

	PC 1 mg N/L)	PC 16 mg N/L)
Média	0.9958	15.4784
Variância	0.0029	0.0514
Desvio padrão	0.0539	0.2266
Variância relativa (%)	0.2917	0.3319
Desvio padrão relativo (%)	5.4119	1.4642

PGcal	1.1378
Ftab	3.18

Como o valor calculado é menor que o F tabelado (n_1/n_2), $PG_{cal} < F_{tab}$, podemos concluir que a gama de trabalho está bem ajustada.

5.1.4 Exatidão

No cálculo da exatidão foram realizadas análises com o material de referência certificado de concentração 2.53 mg N/L (MRC, o certificado encontra-se no **anexo I**) dentro da gama de trabalho do método e efetuados testes de Erro Relativo (Er), Teste T e Z-score, conforme **tabela 6**.

Tabela 6: Estudo da exatidão do método com uso de testes estatísticos (Erro Relativo, Teste T e Z-score).

Data	Resultados (mg N/L)
03/01/2019	2.489
03/01/2019	2.529
03/01/2019	2.589
03/01/2019	2.589
03/01/2019	2.509
03/01/2019	2.549
03/01/2019	2.569
03/01/2019	2.509
03/01/2019	2.589
03/01/2019	2.549

MRC	2.530
u : +/-	0.060

Média	2.547
Desvio padrão	0.037

Erro Relativo (Er %)	0.668%
----------------------	--------

Teste T (5%)	
T tab	1.833
T calc	1.445
T calc < T tab	

Z-score	0.282
---------	-------

Obtendo-se um Er de apenas 0.668%, Z-score 0.282 (abaixo de 2 é classificado como satisfatório) e $T_{cal} < T_{tab}$ de forma que não fica evidenciado estatisticamente a presença de erros sistemáticos, também classificando o resultado como satisfatório.

5.2 Azoto LCK 238

5.2.1 Repetibilidade

Para a repetibilidade foram feitas 10 análises repetidas com a mesma amostra de água residual sob as mesmas condições (medições feitas no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, usando os mesmos tipos e lotes de reagentes e no mesmo intervalo de tempo), de acordo com o método PAFQ.966 conforme **tabela 7**.

Tabela 7: Cálculo da repetibilidade, 10 análises da mesma amostra.

Número de Medições	Data	Resultados (mg N/L)
1	22/03/2019	19.63
2	22/03/2019	20.69
3	22/03/2019	20.68
4	22/03/2019	20.15
5	22/03/2019	19.00
6	22/03/2019	19.19
7	22/03/2019	19.79
8	22/03/2019	19.88
9	22/03/2019	20.15
10	22/03/2019	19.03

Média = 19.82 mg N/L
Desvio padrão da repetibilidade = 0.62
CVr = 3.12 %
Limite da repetibilidade = 8.74

O desvio padrão da repetibilidade ficou em 0.62 mostrando que os dados estão pouco dispersos, o limite da repetibilidade foi de 8.74 e o seu coeficiente de variação foi 2.18%, apresentando uma boa repetibilidade para essa análise uma vez que o CVr é bem abaixo de 10%.

5.2.2 Precisão Intermédia

Ensaio Único

Na avaliação da precisão intermédia foram feitas 10 análises com cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC5 = 5 mg N/L e PC40 = 40 mg N/L), nas seguintes condições: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo método e mesmo equipamento, variando as datas e lotes de reagentes. Esses resultados foram submetidos ao Teste de Grubbs para identificar, e posteriormente eliminar, possíveis “outliers” conforme **tabelas 8 e 9**.

Tabela 8: Teste de Grubbs para o PC 5.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	03/12/2018	4.72	1.11	Aceitável
2	04/01/2019	5.40	1.25	Aceitável
3	11/01/2019	5.36	1.13	Aceitável
4	22/01/2019	4.62	1.46	Aceitável
5	15/03/2019	5.10	0.21	Aceitável
6	15/03/2019	5.19	0.53	Aceitável
7	22/03/2019	4.85	0.66	Aceitável
8	22/03/2019	5.07	0.11	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população
Média = 5.03
Desvio padrão = 0.28

$p = 8$
Valor crítico a 1% = 2.274
Valor crítico a 5% = 2.126

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs
Média = 5.03
Desvio padrão = 0.28
Limite da precisão intermédia (%) = 16

Tabela 9: Teste de Grubbs para o PC 40.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	03/12/2018	40.26	0.99	Aceitável
2	04/01/2019	41.74	0.79	Aceitável
3	11/01/2019	40.36	0.88	Aceitável
4	22/01/2019	42.26	1.43	Aceitável
5	15/03/2019	41.51	0.52	Aceitável
6	15/03/2019	40.25	1.01	Aceitável
7	22/03/2019	40.49	0.72	Aceitável
8	22/03/2019	41.80	0.87	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população
Média = 41.08
Desvio padrão = 0.82

$p = 8$
Valor crítico a 1% = 2.274
Valor crítico a 5% = 2.126

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs
Média = 41.08
Desvio padrão = 0.82
Limite da precisão intermédia (%) = 5.6

Os valores absolutos de Gp foram menores que o valor crítico tabelado para 5 % em todas as medições (PC5 e PC40), sendo aceito como correto e excluindo a possibilidade de existir algum “outlier”. Ambos apresentaram baixo desvio padrão, 0.29 no PC5 e 0.82 no PC40, e os limites da precisão intermédia também ficaram dentro do aceitável, com 15.95 % para o PC5 e 5.61 % para o PC40.

Ensaio com replicados

Além dessas 2 análises também foi feito um estudo da precisão intermédia através de ensaios com duplicadas de 20 amostras de águas residuais conforme **tabela 10**.

Tabela 10: Ensaio com 20 amostras em duplicato para o estudo da precisão intermédia.

Data	Nº Amostra	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi²	X	A -X	B -X
03/12/2018	ECI	AR	32.66	31.81	0.86	0.73	32.23	0.43	-0.43
03/12/2018	108886	AR	25.49	24.63	0.86	0.73	25.06	0.43	-0.43
11/01/2019	117466	AR	24.84	25.03	0.20	0.04	24.93	-0.10	0.10
11/01/2019	114205	AR	12.29	12.15	0.15	0.02	12.22	0.07	-0.07
11/01/2019	112370	AR	13.12	13.86	0.73	0.54	13.49	-0.37	0.37
22/01/2019	1558	AR	28.46	28.17	0.28	0.08	28.31	0.14	-0.14
22/01/2019	1559	AR	16.73	17.47	0.73	0.54	17.10	-0.37	0.37
22/01/2019	4975	AR	6.14	7.27	1.13	1.27	6.70	-0.56	0.56
22/01/2019	4982	AR	14.93	14.48	0.45	0.20	14.71	0.23	-0.23
22/01/2019	4984	AR	15.66	14.99	0.68	0.46	15.33	0.34	-0.34
22/01/2019	4499	AR	5.13	5.91	0.79	0.62	5.52	-0.39	0.39
15/03/2019	19134	AR	11.71	10.89	0.82	0.67	11.30	0.41	-0.41
15/03/2019	19098	AR	10.97	11.27	0.30	0.09	11.12	-0.15	0.15
15/03/2019	19084	AR	13.51	13.99	0.48	0.23	13.75	-0.24	0.24
15/03/2019	19082	AR	10.53	10.83	0.30	0.09	10.68	-0.15	0.15
15/03/2019	17068	AR	17.28	17.60	0.32	0.10	17.44	-0.16	0.16
15/03/2019	14395	AR	17.05	16.67	0.38	0.14	16.86	0.19	-0.19
15/03/2019	14397	AR	19.00	18.89	0.11	0.01	18.95	0.05	-0.05
15/03/2019	14370	AR	32.68	34.75	2.07	4.28	33.72	-1.04	1.04
15/03/2019	14368	AR	9.65	10.10	0.45	0.20	9.88	-0.23	0.23

População = 20

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i) = 0.52Coeficiente de variação médio (Cv_{pi}) = 3.09 %

Limite de precisão intermédia = 8.67 %

Resultando em baixos desvio padrão da precisão intermédia (S_i) 0.53, coeficiente de variação médio (Cv_{pi}) 3.10 % e limite de precisão intermédia 8.68 %.

5.2.3 Gama de Trabalho

Com medições executadas em condições de repetibilidade foram feitas 10 análises para cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC5 de 5 mg N/L e PC40 de 40 mg N/L) para através do Teste F de Fisher – Snedecor comparar a homogeneidade das variâncias e checar se a gama de trabalho está bem ajustada ou não conforme **tabela 11**.

Tabela 11: Estudo da homogeneidade da variância com recurso ao teste F.

Data	Padrão menor (5 mgN/l)	Padrão maior (40 mgN/l)
04/01/2019	4.98	41.21
04/01/2019	4.93	42.83
04/01/2019	4.93	39.75
04/01/2019	5.24	40.64
04/01/2019	5.40	41.94
04/01/2019	5.50	39.69
04/01/2019	4.82	41.16
04/01/2019	4.82	41.74
04/01/2019	5.35	41.32
04/01/2019	4.93	41.00

	PC 5 mg N/L	PC 40 mg N/L
Média	5.0894	41.1278
Variância	0.0655	0.9133
Desvio padrão	0.2558	0.9557
Variância relativa (%)	1.2862	2.2207
Desvio padrão relativo (%)	5.0271	2.3237

PGcal	1.7266
Ftab	3.18

Como o valor calculado é menor que o F tabelado (n_1/n_2), $PG_{cal} < F_{tab}$, podemos concluir que a gama de trabalho está bem ajustada.

5.2.4 Exatidão

No cálculo da exatidão foram realizadas análises com o material de referência certificado de concentração 12.1 mg N/L (MRC, o certificado encontra-se no **anexo I**) dentro da gama de trabalho do método e efetuados testes de Erro Relativo (Er), Teste T e Z-score, conforme **tabela 12**.

Tabela 12: Estudo da exatidão do método com uso de testes estatísticos (Erro Relativo, Teste T e Z-score).

Data	Resultados (mg N/L)
04/01/2019	11.838
04/01/2019	11.995
04/01/2019	11.891
04/01/2019	12.100
04/01/2019	12.414
04/01/2019	11.838
04/01/2019	12.100
04/01/2019	12.310
04/01/2019	12.205
04/01/2019	12.153

MRC	12.1
u : +/-	0.3

Média	12.085
Desvio padrão	0.196

Erro Relativo (Er %)	0.128%
----------------------	--------

Teste T (5%)	
T tab	1.833
T calc	0.250
T calc < T tab	

Z-score	0.052
---------	-------

Obtendo-se um Er de apenas 0.128%, Z-score 0.052 (abaixo de 2 é classificado como satisfatório) e $T_{cal} < T_{tab}$ de forma que não fica evidenciado estatisticamente a presença de erros sistemáticos, também classificando o resultado como satisfatório.

5.3 Azoto LCK 338

5.3.1 Repetibilidade

Para a repetibilidade foram feitas 10 análises repetidas com a mesma amostra de água residual sob as mesmas condições (medições feitas no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, usando os mesmos tipos e lotes de reagentes e no mesmo intervalo de tempo), de acordo com o método PAFQ.966 conforme **tabela 13**.

Tabela 13: Cálculo da repetibilidade, com 10 ensaios repetidos.

Número de Medições	Data	Resultados (mg N/L)
1	22/03/2019	39.30
2	23/03/2019	40.80
3	24/03/2019	40.50
4	25/03/2019	41.80
5	26/03/2019	40.60
6	27/03/2019	40.00
7	28/03/2019	40.60
8	29/03/2019	41.20
9	30/03/2019	41.80
10	22/03/2019	39.70

Média = 40.63 mg N/L
Desvio padrão da repetibilidade = 0.83
CVr = 2.03 %
Limite da repetibilidade = 5.69 %

O desvio padrão da repetibilidade ficou em 0.83 mostrando que os dados estão pouco dispersos, o limite da repetibilidade foi de 5.69 e o seu coeficiente de variação foi 2.03%, apresentando uma boa repetibilidade para essa análise uma vez que o CVr é bem abaixo de 10%.

5.3.2 Precisão Intermédia

Ensaio Único

Na avaliação da precisão intermédia foram feitas 10 análises com cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC20 = 20 mg N/L e PC100 = 100 mg N/L), nas seguintes condições: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo método e mesmo equipamento, variando as datas e lotes de reagentes. Esses resultados foram submetidos ao Teste de Grubbs para identificar, e posteriormente eliminar, possíveis “outliers” conforme **tabelas 14 e 15**.

Tabela 14: Teste de Grubbs para o PC 20.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	27/11/2018	19.69	0.87	Aceitável
2	27/11/2018	21.33	0.98	Aceitável
3	28/11/2018	21.14	0.77	Aceitável
4	28/11/2018	21.14	0.77	Aceitável
5	07/01/2019	21.10	0.72	Aceitável
6	11/01/2019	19.25	1.36	Aceitável
7	22/01/2019	18.70	1.98	Aceitável
8	15/03/2019	20.40	0.07	Aceitável
9	15/03/2019	20.30	0.18	Aceitável
10	22/03/2019	21.00	0.61	Aceitável
11	22/03/2019	21.00	0.61	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população

Média = 20.46
Desvio padrão = 0.89

$p = 11$
Valor crítico a 1% = 2.564
Valor crítico a 5% = 2.355

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs

Média = 20.46
Desvio padrão = 0.89
Limite da precisão intermédia (%) = 12.15

Tabela 15: Teste de Grubbs para o PC 100.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	27/11/2018	99.90	0.38	Aceitável
2	27/11/2018	102.58	0.40	Aceitável
3	07/01/2019	96.79	1.29	Aceitável
4	11/01/2019	99.90	0.38	Aceitável
5	22/01/2019	106.79	1.63	Aceitável
6	29/01/2019	100.31	0.26	Aceitável
7	15/03/2019	101.35	0.04	Aceitável
8	15/03/2019	98.00	0.94	Aceitável
9	22/03/2019	99.40	0.53	Aceitável
10	22/03/2019	107.10	1.72	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população

Média = 101.21
Desvio padrão = 3.42

$p = 10$
Valor crítico a 1% = 2.482
Valor crítico a 5% = 2.29

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs

Média = 101.21
Desvio padrão = 3.42
Limite da precisão intermédia (%) = 9.45

Os valores absolutos de Gp foram menores que o valor crítico tabelado para 5 % em todas as medições (PC20 e PC100), sendo aceite como correto e excluindo a possibilidade de existir algum “outlier”. Ambos apresentaram baixo desvio padrão, 0.89 no PC20 e 3.42 no PC100, e os limites da precisão intermédia também ficaram dentro do aceitável, com 12.15 % para o PC20 e 9.45 % para o PC100.

Ensaio com replicados

Além dessas 2 análises também foi feito um estudo da precisão intermédia através de ensaios com duplicadas de 24 amostras de águas residuais conforme **tabela 16**.

Tabela 16: Estudo da precisão intermédia com uso de ensaios duplicatos de 24 amostras de águas residuais.

Data	Nº Amostra	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi²	X	A-X	B-X
28/11/2018	105547	AR	73.12	73.12	0.00	0.00	73.12	0.00	0.00
28/11/2018	106214	AR	66.83	71.07	4.24	17.94	68.95	-2.12	2.12
11/01/2019	113726	AR	58.66	62.32	3.67	13.44	60.49	-1.83	1.83
11/01/2019	117773	AR	59.84	57.74	2.09	4.39	58.79	1.05	-1.05
11/01/2019	117772	AR	72.27	71.36	0.92	0.84	71.82	0.46	-0.46
11/01/2019	113095	AR	71.62	73.45	1.83	3.36	72.54	-0.92	0.92
11/01/2019	112212	AR	41.11	42.55	1.44	2.07	41.83	-0.72	0.72
11/01/2019	117771	AR	37.45	37.71	0.26	0.07	37.58	-0.13	0.13
11/01/2019	117466	AR	25.93	26.84	0.92	0.84	26.39	-0.46	0.46
11/01/2019	117447	AR	78.82	77.64	1.18	1.39	78.23	0.59	-0.59
22/01/2019	2078	AR	58.85	60.94	2.08	4.34	59.90	-1.04	1.04
22/01/2019	2080	AR	70.66	72.19	1.53	2.34	71.43	-0.76	0.76
22/01/2019	2083	AR	90.53	86.92	3.61	13.05	88.73	1.81	-1.81
22/01/2019	2088	AR	75.67	74.55	1.11	1.24	75.11	0.56	-0.56
22/01/2019	27.6	AR	51.21	49.27	1.95	3.78	50.24	0.97	-0.97
22/01/2019	2504	AR	60.94	63.44	2.50	6.26	62.19	-1.25	1.25
22/01/2019	4987	AR	79.83	82.61	2.78	7.72	81.22	-1.39	1.39
29/01/2019	7032	AR	73.56	72.72	0.83	0.69	73.14	0.42	-0.42
29/01/2019	7032	AR	39.66	44.54	4.88	23.77	42.10	-2.44	2.44
15/03/2019	19245	AR	82.30	84.50	2.20	4.84	83.40	-1.10	1.10
15/03/2019	17106	AR	32.00	30.90	1.10	1.21	31.45	0.55	-0.55
15/03/2019	17063	AR	44.70	40.80	3.90	15.21	42.75	1.95	-1.95
15/03/2019	15770	AR	12.54	14.30	1.76	3.10	13.42	-0.88	0.88
15/03/2019	15328	AR	40.20	40.40	0.20	0.04	40.30	-0.10	0.10

População = 24

Desvio padrão da precisão intermédia (S_i) = 1.66Coeficiente de variação médio (Cv_{pi}) = 2.83 %

Limite de precisão intermédia = 7.93 %

Resultando em baixos desvio padrão da precisão intermédia (S_i) 1.66 , coeficiente de variação médio (Cv_{pi}) 2.83 % e limite de precisão intermédia 7.93 %.

5.3.3 Gama de Trabalho

Com medições executadas em condições de repetibilidade foram feitas 10 análises para cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC5 de 5 mg N/L e PC40 de 40 mg N/L) para através do Teste F de Fisher – Snedecor comparar a homogeneidade das variâncias e checar se a gama de trabalho está bem ajustada ou não conforme **tabela 17**.

Tabela 17: Estudo da homogeneidade das variâncias com recurso do teste F.

Data	Padrão menor (20 mgN/l)	Padrão maior (100 mgN/l)
04/01/2019	20.40	97.26
04/01/2019	20.17	95.62
04/01/2019	21.34	96.79
04/01/2019	20.28	100.89
04/01/2019	20.99	99.37
04/01/2019	22.16	98.43
04/01/2019	20.75	98.19
04/01/2019	22.04	97.26
04/01/2019	21.10	98.66
04/01/2019	20.40	92.69

	PC 20 mg N/L	PC 100 mg N/L
Média	20.9621	97.5148
Variância	0.5027	4.9989
Desvio padrão	0.7090	2.2358
Variância relativa (%)	2.3981	5.1263
Desvio padrão relativo (%)	3.3824	2.2928

PGcal	2.1376
Ftab	3.18

Como o valor calculado é menor que o F tabelado ($n1/n2$), $PGcal < Ftab$, podemos concluir que a gama de trabalho está bem ajustada.

5.3.4 Exatidão

No cálculo da exatidão foram realizadas análises com o material de referência certificado de concentração 100 mg N/L (MRC, o certificado encontra-se no **anexo I**) dentro da gama de trabalho do método e efetuados testes de Erro Relativo (Er), Teste T e Z-score, conforme tabela abaixo conforme **tabela 18**.

Tabela 18: Estudo da exatidão com análise de MRC e uso de testes estatísticos.

Data	Resultados (mg N/L)
07/01/2019	97.843
07/01/2019	99.249
07/01/2019	99.952
07/01/2019	101.006
07/01/2019	99.014
07/01/2019	97.960
07/01/2019	100.655
07/01/2019	100.069
07/01/2019	99.132

MRC	100.0
u : +/-	3.0

Média	99.431
Desvio padrão	1.098

Erro Relativo (Er %)	0.569%
----------------------	--------

Teste T (5%)	
T tab	1.859
T calc	1.639
T calc < T tab	

Z-score	0.19
---------	------

Obtendo-se um Er de apenas 0.569%, Z-score 0.19 (abaixo de 2 é classificado como satisfatório) e $T_{cal} < T_{tab}$ de forma que não fica evidenciado estatisticamente a presença de erros sistemáticos, também classificando o resultado como satisfatório.

5.4 Validação do Método

Os resultados das análises do Azoto LCK 138, 238 e 338 foram processados em conjunto visando a validação do método de determinação do Azoto Total.

5.4.1 Repetibilidade

Para testar repetibilidade do método 10 amostras de águas residuais, analisadas previamente nas 3 gamas de trabalho, foram submetidas ao teste C de Cochran, como mostra a **tabela 19**.

Tabela 19: Estudo da repetibilidade do método com recurso do Teste C de Cochran.

Grupo	Matriz	Teste da Repetibilidade																
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Limite da Repetibilidade	Limite da Repetibilidade e Relativo	
Águas	Águas Residuais	9.84	9.51	9.65	9.43	9.36	9.14	9.17	9.42	9.42	9.40	9.43	0.0423	0.2056	2.1793	0.5757	6.1022	
		19.63	20.69	20.68	20.15	19.00	19.19	19.79	19.88	20.15	19.03	19.82	0.3831	0.619	3.1232	1.7332	8.7449	
		39.30	40.80	40.50	41.80	40.60	40.00	40.60	41.20	41.80	39.70	40.63	0.6823	0.826	2.0331	2.3129	5.6926	
Teste C de Cochran	Nº matrizes 3	Maior Variância:			0.682		Valor crítico tabelado - C (5%):		0.6167		Avaliação:		Ccalc < Ctab5%		Conclusão:		Valor aceito	
	Nº ensaios 10	C de Cochran (calculado):			0.616													
	Valor do limite da repetibilidade (média dos resultados dos limites da repetibilidade):																1.5405	
Valor limite da repetibilidade relativa (média dos resultados dos limites de repetibilidade relativa):																6.8465		
Coeficiente de variação médio relativo (média dos resultados dos desvios padrões relativos):																2.4452		

No teste C de Cochran o resultado C calculado ficou em 0.6164 que é menor que o valor crítico tabelado para 5% de 0.6167, tendo seu valor aceito e resultando em um limite de repetibilidade de 1.5405 que foi minorado para 1.5 mg/L, limite de repetibilidade relativo majorado para 7% e um coeficiente de variação médio relativo minorado para 2%.

Posteriormente os valores limites desses mesmos ensaios foram submetidos ao teste de Grubbs, onde os resultados foram comparados ao valor tabelado de 1% para avaliar a existência de “outliers”, conforme **tabela 20**.

Tabela 20: Resultados submetidos ao teste de Grubbs para detecção de outliers.

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Águas Residuais	10	2.482	9.14	1.43	Aceitável	9.84	1.975	Aceitável
	10	2.482	19	1.323	Aceitável	20.69	1.407	Aceitável
	10	2.482	33.3	1.61	Aceitável	41.8	1.416	Aceitável

Todos os resultados foram confrontados com o valor crítico a 1% e resultaram em valores abaixo do tabelado, dessa forma os resultados ficaram dentro do aceitável.

5.4.2 Precisão Intermédia

No cálculo da precisão intermédia para o método foram utilizados os resultados dos ensaios de águas residuais em duplicados das 3 gamas (22 ensaios para o LCK 138, 20 para o LCK 238 e 24 para o LCK 338), obtendo-se os seguintes resultados conforme **tabela 21**. Para fins de validação do método é usada a precisão intermédia associada ao ensaio com as amostras em duplicado ao invés da precisão do ensaio com os padrões limites da gama de trabalho, isso é devido a maior representatividade (ao longo da gama) que as amostras reais têm em relação aos padrões, além de que são amostras reais de águas residuais que mostram na prática a devida eficiência do método e não padrões “fabricados”.

Tabela 21: Resultados do estudo da precisão intermédia do método.

Gama	Limite de precisão intermédia relativo (%)	Coefficiente de variação médio relativo (%)	Desvio Padrão da Precisão Intermédia (Si)
LCK 138	7,6	2,7	0,14
LCK 238	8,7	3,1	0,53
LCK 338	8,0	2,8	1,66

5.4.3 Veracidade

Para além dos testes realizados com os MRCs, a veracidade também é demonstrada pelos ensaios de comparação interlaboratorial (BIPEA Waste Water) efetuados com 2 amostras de águas residuais, os resultados estão expressos na **tabela 22**.

Tabela 22: Resultados do teste interlaboratorial para atestar a veracidade das análises.

Matriz	Valor medido	Valor certificado	Limite inferior	Limite superior	Avaliação da veracidade
BIPEA Waste Water	59	66,6	58,8	74,4	OK
BIPEA Waste Water	23	21,6	18,2	25,0	OK

Ambos os testes com as duas amostras ficaram dentro do intervalo de aceitação, atestando a veracidade dos resultados

5.4.4 Gama de Trabalho, Limite de Detecção e Quantificação

As gamas de trabalho e os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo fabricante HACH, em conformidade com a ISO 8466-2:2001 e a DIN 38402 A51 como podem ser observados nos certificados de qualidade no **anexo III**. Esses dados podem ser conferidos na **tabela** abaixo.

Tabela 23: Valores definidos para as Gamas de trabalho e Limites de detecção e quantificação.

Kit	Gama de trabalho	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Unidades
LCK 138	1,0 – 16	0.116	0.35	mg N/L
LCK 238	5,0 – 40	0.54	1.63	mg N/L
LCK 338	20 – 100	0.65	1.95	mg N/L

5.4.5 Incerteza

5.4.5.1 Cálculo com uso de MRCs

A componente aleatória da incerteza do método, ligada à precisão, foi calculada a partir das análises dos padrões de controle das 3 gamas de trabalho com base nos desvios padrões. Esses dados foram então combinados para estimar a componente de incerteza da precisão chegando a um $u(Rw, \text{relativo}, c)$ de 4,128%, conforme **tabela 24**:

Tabela 24: Cálculo da incerteza associada à precisão do método.

Referência	PC 1mg/l	PC 16mg/l	PC 5mg/l	PC 40mg/l	PC 20mg/l	PC 100mg/l
Rw	0.052	0.506	0.287	0.824	0.888	3.417
x	1.029	16.150	5.039	41.084	20.459	101.212
unidade	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
n	11	11	8	8	11	10
Rw, relativo	5.072	3.132	5.698	2.005	4.338	3.376

$u(Rw, \text{relativo}, c)$	4.128
-----------------------------	-------

Já de posse da incerteza da precisão o cálculo segue para a estimativa da componente sistemática da incerteza, ligada à exatidão, que foi realizada com o uso de análises duplicatas dos MRCs de 2.53 mg N/L, 12.10 mg N/L e 100.00 mg N/L, de acordo com a **tabela 25**:

Tabela 25: Cálculo da incerteza associada à exatidão do método.

Data	MRC	n	LV	CV	k	Intervalo (do certificado)	u(Rw,relativo,c)
18/03/2019	2.50 mg N/L	2	2.575	2.530	2	0.060	4.128
15/03/2019	12.00 mg N/L	2	12.260	12.100	2	0.300	
15/03/2019	100.00 mg N/L	2	102.150	100.000	2	3.000	

bias,relativo	S bias	S bias, relativo	u(Cref)	u(Cref), relativo	RMS bias,relativo	Média u(Cref)relativo	u(bias) relativo
1.779	0.005	0.194	0.030	1.186	1.783	1.308	2.211
1.322	0.055	0.449	0.150	1.240			
2.150	0.850	0.832	1.500	1.500			

Com a estimativa de incerteza atrelada à exatidão $u(\text{bias})_{\text{relativo}}$ de 2.211%, chega-se à incerteza padrão combinada através da **Eq 37**, resultando em U_{relativo} de 4.683 %. Finalmente, com todos esses dados é possível estimar a incerteza expandida para todo o método, pela **Eq 38**, chegando ao valor de $U_{\text{relativo}} = 9.366 \%$ que foi majorado para uma incerteza de 10%, valor aceitável.

5.4.5.2 Cálculo com Recuperações

Como visto nas não conformidades detectadas, o cálculo da incerteza para a validação do método foi realizado com o recurso dos ensaios de recuperação, ao invés do estudo da incerteza associada aos ensaios dos MRCs.

Azoto LCK 138

Foram realizados 10 ensaios de recuperação com a mesma amostra em condições de repetibilidade, os resultados estão expressos na **tabela 26**.

Tabela 26: Estudo da incerteza associada à exatidão a partir da análise de ensaios de recuperação.

Padrão inicial	mg/l	1		Conc da amostra	Conc fortificada (real)	Conc contaminada
Vol. Adicionado	ml	0.1		(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
Conc. Adição	mg/l	1	Média (m)	6.828	7.8142	1
			Desvio padrão (s)	0.062503333	0.168856152	0
			n.º de resultados (n)	10	10	10
u (Rm)	0.08220649		Recuperação média (Rm)	0.9862		

Data	Conc da amostra	Conc de amostra fortificada (real)	Conc de amostra contaminada (teórica)
	mg/l	(unidades)	(unidades)
15/05/2019	6.82	7.74	1
16/05/2019	6.75	7.74	1
17/05/2019	6.78	7.58	1
18/05/2019	6.83	7.74	1
19/05/2019	6.78	7.74	1
22/05/2019	6.95	8.13	1
23/05/2019	6.85	7.75	1
24/05/2019	6.91	8.05	1
25/05/2019	6.83	7.93	1
26/05/2019	6.78	7.74	1

Tendo como resultado uma recuperação média de 98%, sendo o aceitável entre 80% - 120%, e uma incerteza associada à recuperação $u(Rm)$ de 0,082.

Azoto LCK 238

O mesmo procedimento foi executado para o LCK 238, conforme **tabela 27**.

Tabela 27: Estudo da incerteza associada à exatidão a partir da análise de ensaios de recuperação.

Padrão inicial	mg/l	1000		Conc da amostra	Conc fortificada (real)	Conc contaminada
Vol. Adicionado	ml	0.5		(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
Conc. Adição	mg/l	5	Média (m)	25.199	30.421	5
			Desvio padrão (s)	0.48571711	0.715812669	0
			n.º de resultados (n)	10	10	10
u (Rm)	0.1071746		Recuperação média (Rm)	1.0444		

Data	Conc da amostra	Conc de amostra fortificada (real)	Conc de amostra contaminada (teórica)
	mg/l	(unidades)	(unidades)
15/05/2019	26.03	30.85	5
16/05/2019	24.79	30.33	5
17/05/2019	24.80	29.65	5
18/05/2019	26.03	31.30	5
19/05/2019	24.80	30.10	5
22/05/2019	25.19	30.87	5
23/05/2019	25.32	31.16	5
24/05/2019	24.93	29.05	5
25/05/2019	24.80	30.05	5
26/05/2019	25.30	30.85	5

Chegando-se a uma recuperação média de 104%, aceitável dentro do intervalo usado, e a sua incerteza associada $u(R_m)$ de 0.107.

Azoto LCK 338

Por último o LCK 338, conforme **tabela 28**.

Tabela 28: Estudo da incerteza associada à exatidão a partir da análise de ensaios de recuperação.

Padrão inicial	mg/l	1000		Conc da amostra	Conc fortificada (real)	Conc contaminada
Vol. Adicionado	ml	0.5		(mg/l)	(mg/l)	(mg/l)
Conc. Adição	mg/l	5	Média (m)	28.22	46.91	20
			Desvio padrão (s)	0.524510354	0.717170366	0
			n.º de resultados (n)	10	10	10
			Recuperação média (Rm)	0.9345		
u (Rm)	0.02857203					

Data	Conc da amostra	Conc de amostra fortificada (real)	Conc de amostra contaminada (teórica)
	mg/l	(unidades)	(unidades)
15/05/2019	28.7	47.30	20
16/05/2019	27.7	45.90	20
17/05/2019	28.7	47.20	20
18/05/2019	27.6	47.00	20
19/05/2019	28.7	45.90	20
22/05/2019	28.1	47.10	20
23/05/2019	27.7	46.10	20
24/05/2019	27.6	48.10	20
25/05/2019	28.7	47.20	20
26/05/2019	28.7	47.30	20

Onde foi obtido uma recuperação média de 93% com incerteza $u(R_m)$ de 0,028.

Esses resultados foram analisados em conjunto com o desvio padrão da precisão intermédia de cada uma das 3 gamas para chegar ao valor final da incerteza expandida relativa, como é mostrado na **tabela 29**.

Tabela 29: Cálculo final da incerteza expandida relativa do método.

Gama	Valor medido (mg/l)	Incerteza associada à exatidão	Desvio padrão precisão intermédia	Incerteza combinada	Incerteza expandida	Incerteza expandida relativa
1 - 16 mg/l (LCK 138)	6.83	0.08	0.14	0.58	1.16	16.94
5 - 40 mg/l (LCK 238)	25.20	0.11	0.53	2.75	5.50	21.84
20 - 100 mg/l (LCK 338)	28.22	0.03	1.66	1.84	3.69	13.07

Gerando incertezas de 17%, 22% e 13% para as gamas 1 – 16 mg/l, 5 – 40 mg/l e 20 – 100 mg/l, respectivamente. Esse método gera incertezas maiores que o cálculo executado com o uso dos MRC devido a maior manipulação dos ensaios, no sentido prático de mais etapas, de maior contato do analista com a preparação das amostras, que consequentemente aumentam as “oportunidades” de incremento da incerteza.

6 Resultados e Discussão – Fósforo Total

Inicialmente foi feita uma abordagem individual das 2 gamas de trabalho e posteriormente os resultados foram utilizados nas validações estatísticas do método como um todo.

6.1 Fósforo LCK 349

6.1.1 Repetibilidade

Para a repetibilidade foram feitas 10 análises repetidas com a mesma amostra de água residual sob as mesmas condições (medições feitas no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, usando os mesmos tipos e lotes de reagentes e no mesmo intervalo de tempo), de acordo com o método PAFQ.966 conforme **tabela 30**.

Tabela 30: Estudo da repetibilidade com a análise de uma amostra de água residual repetida 10 vezes.

Número de Medições	Data	Resultados (mg P/L)
1	22/03/2019	1.58
2	22/03/2019	1.58
3	22/03/2019	1.44
4	22/03/2019	1.57
5	22/03/2019	1.59
6	22/03/2019	1.49
7	22/03/2019	1.55
8	22/03/2019	1.58
9	22/03/2019	1.63
10	22/03/2019	1.63

Média = 1.5623 mg P/L
Desvio padrão da repetibilidade = 0.0595
CVr = 3.8064 %
Limite da repetibilidade = 10.66 %

O desvio padrão da repetibilidade ficou em 0.0595 mostrando que os dados estão pouco dispersos, o limite da repetibilidade foi de 10.66% e o seu coeficiente de variação foi 3.8064%, apresentando uma boa repetibilidade para essa análise uma vez que o CVr é bem abaixo de 10%.

Esses resultados foram submetidos ao Teste de Grubbs para identificar, e posteriormente eliminar, possíveis “outliers” conforme **tabelas 31**.

Tabela 31: Teste de Grubbs da análise de amostra de água residual em condições de repetibilidade.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	03/01/2019	1.58	0.30	Aceitável
2	03/01/2019	1.58	0.30	Aceitável
3	10/01/2019	1.44	2.06	Aceitável
4	22/01/2019	1.57	0.13	Aceitável
5	28/01/2019	1.59	0.47	Aceitável
6	15/03/2019	1.49	1.22	Aceitável
7	15/03/2019	1.55	0.21	Aceitável
8	18/03/2019	1.58	0.30	Aceitável
9	18/03/2019	1.63	1.14	Aceitável
10	22/03/2019	1.63	1.14	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população

Média = 1.5623

Desvio padrão = 0.0595

p = 10

Valor crítico a 1% = 2.482

Valor crítico a 5% = 2.290

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs

Média = 1.5623

Desvio padrão = 0.0595

Limite da repetibilidade (%) = 10.66

Os valores absolutos de Gp foram menores que o valor crítico tabelado para 5 % (e também para 1%) em todas as medições, sendo aceito como correto e excluindo a possibilidade de existir algum “outlier”.

6.1.2 Precisão Intermédia

Ensaio com replicados

Na avaliação da precisão intermédia foram feitas 25 análises com amostras reais de águas residuais nas seguintes condições: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo método e mesmo equipamento, variando as datas e lotes de reagentes. Os resultados estão na **tabela 32**.

Tabela 32: Estudo da precisão intermédia com a análise de 25 amostras de águas residuais em duplicato.

Data	Nº Amostra	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi²	X	A -X	B -X
04/12/2018	108581	AR	0.06	0.07	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00
04/12/2018	104171	AR	0.07	0.06	0.01	0.00	0.07	0.00	0.00
04/12/2019	105414	AR	0.20	0.20	0.00	0.00	0.20	0.00	0.00
12/12/2018	110971	AR	0.56	0.58	0.03	0.00	0.57	-0.01	0.01
12/12/2019	112370	AR	1.22	1.20	0.02	0.00	1.21	0.01	-0.01
11/01/2019	117776	AR	0.34	0.36	0.02	0.00	0.35	-0.01	0.01
11/01/2019	113718	AR	0.78	0.81	0.02	0.00	0.79	-0.01	0.01
23/01/2019	1559	AR	1.14	1.16	0.02	0.00	1.15	-0.01	0.01
23/01/2019	4499	AR	0.85	0.87	0.03	0.00	0.86	-0.01	0.01
23/01/2019	4953	AR	0.05	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
23/01/2019	4954	AR	1.09	1.12	0.03	0.00	1.11	-0.01	0.01
23/01/2019	4958	AR	0.24	0.23	0.01	0.00	0.23	0.00	0.00
23/01/2019	4975	AR	1.35	1.34	0.01	0.00	1.35	0.01	-0.01
30/01/2019	8057	AR	1.47	1.59	0.12	0.01	1.53	-0.06	0.06
30/01/2019	8063	AR	1.29	1.27	0.02	0.00	1.28	0.01	-0.01
30/01/2019	7582	AR	0.74	0.75	0.01	0.00	0.74	0.00	0.00
30/01/2019	8062	AR	0.94	0.95	0.01	0.00	0.94	0.00	0.00
15/03/2019	19262	AR	0.31	0.32	0.01	0.00	0.32	0.00	0.00
15/03/2019	19245	AR	0.09	0.08	0.01	0.00	0.08	0.00	0.00
15/03/2019	19245	AR	0.23	0.26	0.03	0.00	0.24	-0.01	0.01
15/03/2019	15853	AR	0.83	0.87	0.04	0.00	0.85	-0.02	0.02
15/03/2019	MRC	AR	0.12	0.12	0.01	0.00	0.12	0.00	0.00
16/03/2019	14366	AR	0.49	0.49	0.01	0.00	0.49	0.00	0.00
14/06/2019	47459	AR	0.99	0.98	0.01	0.00	0.98	0.01	-0.01
23/07/2019	70259	AR	0.28	0.28	0.00	0.00	0.28	0.00	0.00

População = 25

Desvio padrão da precisão intermédia (Si) = 0.0207522

Coeficiente de variação médio (Cvpi) = 3.2715 %

Limite de precisão intermédia = 9.1602 %

Resultando em baixos desvio padrão da precisão intermédia (Si) 0.0207, coeficiente de variação médio (Cvpi) 3.2715 % e limite de precisão intermédia 9.1602 % ficando abaixo dos 10%.

6.1.3 Gama de trabalho

Com medições executadas em condições de repetibilidade foram feitas 10 análises para cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC de 0.05 mg P/L e PC de 1.50 mg P/L) para através do Teste F de Fisher – Snedecor comparar a homogeneidade das variâncias e checar se a gama de trabalho está bem ajustada ou não conforme **tabela 33**.

Tabela 33: Avaliação da homogeneidade das variâncias com o teste F.

Data	Padrão menor (0.05 mgP/l)	Padrão maior (1.50 mgP/l)
30/07/2019	0.053	1.516
30/07/2019	0.052	1.539
31/07/2019	0.050	1.515
01/08/2019	0.052	1.547
02/08/2019	0.052	1.547
03/08/2019	0.055	1.545
04/08/2019	0.050	1.527
05/08/2019	0.054	1.521
06/08/2019	0.050	1.539
07/08/2019	0.050	1.524

	PC 0.05 mg P/L	PC 1.50 mg P/L
Média	0.0518	1.5320
Variância	0.000003	0.000164
Desvio padrão	0.0018	0.0128
Variância relativa (%)	0.0063	0.0107
Desvio padrão relativo (%)	3.5010	0.8348

PGcal	1.6815
Ftab	3.18

Como o valor calculado é menor que o F tabelado (n_1/n_2), $PG_{cal} < F_{tab}$, podemos concluir que a gama de trabalho está bem ajustada.

6.2 Fósforo LCK 350

6.2.1 Repetibilidade

Para a repetibilidade foram feitas 10 análises repetidas com a mesma amostra de água residual sob as mesmas condições (medições feitas no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, com o mesmo equipamento, usando os mesmos tipos e lotes de reagentes e no mesmo intervalo de tempo), de acordo com o método PAFQ.966 conforme **tabela 34**.

Tabela 34: Estudo da repetibilidade com uso de amostra de água residual repetida 10 vezes.

Número de Medições	Data	Resultados (mg P/L)
1	29/03/2019	9.11
2	29/03/2019	9.17
3	29/03/2019	8.99
4	29/03/2019	9.09
5	29/03/2019	8.99
6	29/03/2019	9.09
7	29/03/2019	8.99
8	29/03/2019	9.17
9	29/03/2019	9.25
10	29/03/2019	9.11

Média = 9.096 mg P/L
Desvio padrão da repetibilidade = 0.0875
CVr = 0.9615 %
Limite da repetibilidade = 2.6922 %

O desvio padrão da repetibilidade ficou em 0.0875 mostrando que os dados estão pouco dispersos, o limite da repetibilidade foi de 2.69% e o seu coeficiente de variação foi 0,9615%, apresentando uma boa repetibilidade para essa análise uma vez que o CVr é bem abaixo de 10%.

Esses resultados foram submetidos ao Teste de Grubbs para identificar, e posteriormente eliminar, possíveis “outliers” conforme **tabelas 35**.

Tabela 35: Teste de Grubbs da análise de amostra de água residual em condições de repetibilidade.

Número de Medições	Data	Resultados (mg/l)	Gp	Classificação
1	03/01/2018	9.11	0.16	Aceitável
2	03/01/2019	9.17	0.85	Aceitável
3	10/01/2019	8.99	1.21	Aceitável
4	22/01/2019	9.09	0.07	Aceitável
5	28/01/2019	8.99	1.21	Aceitável
6	15/03/2019	9.09	0.07	Aceitável
7	15/03/2019	8.99	1.21	Aceitável
8	18/03/2019	9.17	0.85	Aceitável
9	18/03/2019	9.25	1.76	Aceitável
10	22/03/2019	9.11	0.16	Aceitável

Média e Desvio Padrão de toda a população
Média = 9.096
Desvio padrão = 0.0875

p = 10
Valor crítico a 1% = 2.482
Valor crítico a 5% = 2.290

Média e Desvio Padrão após teste de Grubbs
Média = 9.096
Desvio padrão = 0.0875
Limite da repetibilidade (%) = 2.6922

Os valores absolutos de Gp foram menores que o valor crítico tabelado para 5 % (e também para 1%) em todas as medições, sendo aceito como correto e excluindo a possibilidade de existir algum “outlier”.

6.2.2 Precisão Intermédia

Ensaio com replicados

Na avaliação da precisão intermédia foram feitas 23 análises com amostras reais de águas residuais nas seguintes condições: mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo método e mesmo equipamento, variando as datas e lotes de reagentes. Os resultados estão na **tabela 36**.

Tabela 36: Estudo da precisão intermédia com a análise de 23 amostras de águas residuais em duplicatos.

Data	Nº Amostra	Matriz	Ensaio A	Ensaio B	Wi	Wi²	X	A -X	B -X
05/12/2018	106542	AR	8.33	8.37	0.04	0.00	8.35	-0.02	0.02
05/12/2018	102340	AR	7.78	6.96	0.82	0.67	7.37	0.41	-0.41
05/12/2018	102341	AR	7.89	7.41	0.48	0.23	7.65	0.24	-0.24
10/01/2019	1558	AR	6.85	6.78	0.08	0.01	6.82	0.04	-0.04
10/01/2019	1559	AR	2.10	1.98	0.12	0.01	2.04	0.06	-0.06
10/01/2019	1591	AR	6.35	6.16	0.19	0.04	6.25	0.10	-0.10
10/01/2019	117771	AR	4.38	4.07	0.31	0.10	4.23	0.15	-0.15
10/01/2019	117773	AR	2.22	2.14	0.08	0.01	2.18	0.04	-0.04
10/01/2019	112212	AR	7.28	7.70	0.42	0.18	7.49	-0.21	0.21
10/01/2019	112370	AR	3.57	3.53	0.04	0.00	3.55	0.02	-0.02
10/01/2019	113713	AR	4.77	4.46	0.31	0.10	4.61	0.15	-0.15
10/01/2019	117447	AR	7.90	7.51	0.39	0.15	7.70	0.19	-0.19
10/01/2019	113095	AR	12.57	13.35	0.77	0.60	12.96	-0.39	0.39
30/01/2019	7032	AR	7.55	7.30	0.25	0.06	7.43	0.13	-0.13
30/01/2019	8062	AR	9.77	10.11	0.34	0.12	9.94	-0.17	0.17
30/01/2019	8063	AR	2.21	2.53	0.32	0.10	2.37	-0.16	0.16
30/01/2019	8064	AR	8.95	8.76	0.19	0.04	8.85	0.10	-0.10
15/03/2019	19134	AR	9.63	9.57	0.06	0.00	9.60	0.03	-0.03
15/03/2019	19098	AR	7.80	7.95	0.15	0.02	7.88	-0.08	0.08
15/03/2019	17106	AR	6.96	6.84	0.12	0.01	6.90	0.06	-0.06
15/03/2019	17068	AR	15.81	16.20	0.39	0.15	16.01	-0.19	0.20
15/03/2019	15328	AR	14.64	16.38	1.74	3.03	15.51	-0.87	0.87
15/03/2019	14370	AR	15.12	15.75	0.63	0.40	15.44	-0.32	0.32

População = 23

Desvio padrão da precisão intermédia (Si) = 0.3616

Coeficiente de variação médio (Cvpi) = 4.5925%

Limite de precisão intermédia = 12.8589%

Resultando em baixos desvio padrão da precisão intermédia (Si) 0.3616, coeficiente de variação médio (Cvpi) 4.5925 % e limite de precisão intermédia 12.8589 %, acima dos 10% mas aceitável.

6.2.3 Gama de trabalho

Com medições executadas em condições de repetibilidade foram feitas 10 análises para cada um dos padrões de controle limites da gama de trabalho (PC de 2 mg P/L e PC de 20 mg P/L) para através do Teste F de Fisher – Snedecor comparar a homogeneidade das variâncias e checar se a gama de trabalho está bem ajustada ou não conforme **tabela 37**.

Tabela 37: Estudo da homogeneidade das variâncias com uso do teste F.

Data	Padrão menor (2 mgP/l)	Padrão maior (20 mgP/l)
08/01/2019	1.517	16.559
08/01/2019	1.506	16.976
08/01/2019	1.335	17.906
08/01/2019	1.410	17.307
08/01/2019	1.431	17.596
08/01/2019	1.228	17.200
08/01/2019	1.346	17.265
08/01/2019	1.506	17.265
08/01/2019	1.367	16.826
08/01/2019	1.421	17.425

	PC 1 mg N/L)	PC 16 mg N/L)
Média	1.4067	17.2325
Variância	0.008332	0.146223
Desvio padrão	0.0913	0.3824
Variância relativa (%)	0.5923	0.8485
Desvio padrão relativo (%)	6.4889	2.2190

PGcal	1.4326
Ftab	3.18

Como o valor calculado é menor que o F tabelado (n_1/n_2), $PG_{cal} < F_{tab}$, podemos concluir que a gama de trabalho está bem ajustada.

6.3 Validação do Método

Os resultados das análises do Fósforo LCK 349 e 350 foram processados em conjunto visando a validação do método de determinação do Fósforo Total.

6.3.1 Repetibilidade

Para testar repetibilidade do método 10 amostras de águas residuais, analisadas previamente nas 3 gamas de trabalho, foram submetidas ao teste C de Cochran, como mostra a **tabela 38**.

Tabela 38: Cálculo da repetibilidade do método, com avaliação usando o teste C de Cochran.

Grupo	Matriz	Teste da Repetibilidade															
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Ensaio 10	Média	Variância	Desvio Padrão	Desvio Padrão Relativo	Limite da Repetibilidade	Limite da Repetibilidade e Relativo
Águas	Águas Residuais	1.58	1.58	1.44	1.57	1.59	1.49	1.55	1.58	1.63	1.63	1.56	0.0035	0.0595	3.8064	0.1665	10.658
		9.11	9.17	8.99	9.09	8.99	9.09	8.99	9.17	9.25	9.11	9.10	0.0076	0.0875	0.9615	0.2449	2.6922
Teste C de Cochran	Nº matrizes	Maior Variância:			0.008	Valor critico tabelado - C (5%):		0.801	Avaliação:		Ccalc < Ctab5%		Conclusão:	Valor aceito			
	2	C de Cochran (calculado):		0.684													
	Nº ensaios																
	10	Valor do limite da repetibilidade (média dos resultados dos limites da repetibilidade):															
Valor limite da repetibilidade relativa (média dos resultados dos limites de repetibilidade relativa):																	6.6751
Coeficiente de variação médio relativo (média dos resultados dos desvios padrões relativos):																	2.3839

No teste C de Cochran o resultado C calculado ficou em 0.684 que é menor que o valor crítico tabelado para 5% de 0.6167, tendo seu valor aceite e resultando em um limite de repetibilidade de 0.2056 que foi minorado para 0.2 mg/L, limite de repetibilidade

relativo majorado para 7% e um coeficiente de variação médio relativo minorado para 2%.

Posteriormente os valores limites desses mesmos ensaios foram submetidos ao teste de Grubbs, onde os resultados foram comparados ao valor tabelado de 1% para avaliar a existência de “outliers”, conforme **tabela 39**.

Tabela 39: Avaliação pelo teste de Grubbs para detectar possíveis outliers.

Matriz	Teste de Grubbs							
	População	Valor crítico 1%	Valor mínimo	Gp Valor mínimo	Teste ao valor mínimo	Valor máximo	Gp Valor máximo	Teste ao valor máximo
Águas	10	2.482	1.44	2.09	Aceitável	1.63	1.206	Aceitável
Residuais	10	2.482	8.99	1.212	Aceitável	9.25	1.761	Aceitável

Todos os resultados foram confrontados com o valor crítico a 1% e resultaram em valores abaixo do tabelado, dessa forma os resultados ficaram dentro do aceitável.

6.3.2 Precisão Intermédia

No cálculo da precisão intermédia para o método foram utilizados os resultados dos ensaios de águas residuais em duplicados das 2 gamas (25 ensaios para o LCK 349 e 23 para o LCK 250), obtendo-se os seguintes resultados conforme **tabela 40**. Para fins de validação do método é usada a precisão intermédia associada ao ensaio com as amostras em duplicado ao invés da precisão do ensaio com os padrões limites da gama de trabalho, isso é devido a maior representatividade (ao longo da gama) que as amostras reais têm em relação aos padrões, além de que são amostras reais de águas residuais que mostram na prática a devida eficiência do método e não padrões “fabricados”.

Tabela 40: Resultados da precisão intermédia do método.

Gama	Limite de precisão intermédia relativo (%)	Coeficiente de variação médio relativo (%)
LCK 349	9.16	3.27
LCK 350	12.85	4.59

6.3.3 Veracidade

A veracidade para o fósforo total foi demonstrada pelos ensaios de comparação interlaboratorial (BIPEA Waste Water) efetuados com 2 amostras de águas residuais, os resultados estão expressos na **tabela 41**.

Tabela 41: Resultados dos testes interlaboratoriais avaliando a veracidade das análises.

Matriz	Valor medido	Valor certificado	Limite inferior	Limite superior	Avaliação da veracidade
BIPEA Waste Water	0.64	0.62	0.46	0.78	OK
BIPEA Waste Water	7.7	7.24	6.32	8.16	OK

Ambos os testes com as duas amostras ficaram dentro do intervalo de aceitação, atestando a veracidade dos resultados

6.3.4 Gama de Trabalho, Limite de Detecção e Quantificação

As gamas de trabalho e os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo fabricante HACH, em conformidade com a ISO 8466-2:2001 e a DIN 38402 A51 como podem ser observados nos certificados de qualidade no **anexo III**, esses dados podem ser conferidos na **tabela 42** abaixo.

Tabela 42: Valores definidos das Gamas de Trabalho e Limites de Detecção e Quantificação dos métodos.

Kit	Gama de trabalho	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Unidades
LCK 349	0.05 - 1.5	0.007	0.02	mg P/L
LCK 350	2.0 - 20	0.052	0.156	mg P/L

6.3.5 Incerteza

6.3.5.1 Cálculo com Recuperações

Como visto nas não conformidades detectadas, o cálculo da incerteza para a validação do método foi realizado com o recurso dos ensaios de recuperação, ao invés do estudo da incerteza associada aos ensaios dos MRCs, juntamente com a incerteza da precisão (obtida nos ensaios de precisão intermédia com duplicados), conforme a **tabela 43** abaixo.

Tabela 43: Resultados da incerteza expandida relativa calculados para os métodos.

Gama	Valor medido (mg/l)	Incerteza associada à exatidão	Desvio padrão precisão intermédia	Incerteza combinada	Incerteza expandida	Incerteza expandida relativa (%)
0.05 - 1.50 mg/l (LCK 349)	0.284	0.176	0.021	0.054	0.108	38.182
2.0 - 20.0 mg/l (LCK 350)	4.471	0.093	0.362	0.550	1.099	24.589

Gerando incertezas de 38% e 25% para as gamas 0.05 – 1.5 mg/l e 2.0 – 20.0 mg/l respectivamente. Esse método gera incertezas maiores que o cálculo executado com o uso dos MRC devido a maior manipulação dos ensaios, no sentido prático de mais etapas, de maior contato do analista com a preparação das amostras, que consequentemente aumentam as “oportunidades” de incremento da incerteza.

7 Conclusões

O objetivo do trabalho foi realizar a validação de métodos fotométricos em cuvete para uso em análises de rotina no âmbito das águas residuais no laboratório de ambiente da Silliker Portugal, S.A. seguindo os impressos de validação de métodos da empresa (VM.078 e VM.079). Para isso foram usados kits de análise da Hach Lange (azoto total LCK 138, 238 e 338 e fósforo total LCK 349 e 350) em conjunto com outros equipamentos, espectrofotômetro HACH DR 1900 VIS e termorreator HACH HT 200 S.

A primeira vantagem observada nessa metodologia é em relação à impactos ambientais, principalmente no que tange a geração de resíduos químicos, já que o método prima pelo uso de pequenas quantidades de reagentes em pequenos cuvetes de vidro. Além disso o laboratório Hach Lange oferece um serviço de coleta e armazenamento dos materiais envolvidos na análise (reagentes e cuvetes) para proporcionar a destinação correta desses resíduos. No entanto a Silliker optou por fazer a sua própria recolha e armazenamento e não aderiu a esse serviço da Hach Lange.

Esse método tem outra vantagem quando se trata de rapidez e praticidade de aplicação e análise, os kits vêm com um tutorial bastante fácil e intuitivo de usar, não deixando dúvidas sobre como deve ser realizado o processo de análise desde a mistura dos reagentes com as amostras até a leitura no espectrofotômetro no final. Também vale ressaltar que o método demonstrou-se bastante seguro de ser utilizado, com baixo risco de acidente decorrente do seu manuseio.

Como já referido anteriormente, esse trabalho visou validar métodos fotométricos em cuvete para análises em águas residuais de azoto total em 3 gamas (LCK 138 de 1.0 mgN/l – 16.0 mgN/l, LCK 238 de 5.0 mgN/l – 40.0 mgN/l e LCK 338 de 20.0 mgN/l –

100.0 mgN/l) e 2 gamas de fósforo total (LCK 349 de 0.05 mgP/l – 1.5 mgP/l e LCK 350 de 2.0 mgP/l – 20.0 mgP/l).

No caso da validação para as gamas do azoto total foram realizados estudos de repetibilidade com 10 análises repetidas de amostras de águas residuais, que pelo histórico da empresa estariam enquadradas nos intervalos corretos das gamas de trabalho, onde foram verificados limites de repetibilidade relativo individuais aceitáveis, valores abaixo dos 10%, e limite de repetibilidade relativo combinado de 7%, com um coeficiente de variação médio relativo também baixo, 2%, atestando para a baixa dispersão dessas análises realizadas em condições de repetibilidade. Os resultados das análises dessas amostras foram submetidos ao teste de Grubbs para identificação de possíveis outliers e nenhum valor aberrante foi constatado (para 1% e 5%).

Com o seguimento das análises foram realizados estudos da precisão intermédia, tanto com o uso dos padrões extremos de cada uma das gamas quanto com amostras reais de águas residuais. Para a validação final o último caso foi o escolhido já que demonstra maior representatividade ao longo da gama, foram 22 amostras estudadas em duplicado para o azoto LCK 138, 20 também em duplicado para o LCK 238 e 24 para o LCK 338. Os resultados do limite da precisão intermédia relativo para cada uma das gamas foram de 7.6% para LCK 138, 8.7% para LCK 238 e 8.0% para LCK 338 e os coeficientes de variação médio relativo de 2.7%, 3.1% e 2.8%, respectivamente. Bons valores, levando em conta que ficaram pouco acima dos encontrados para a repetibilidade e foram estudados em condições de precisão intermédia.

A veracidade do estudo foi posta à prova nos ensaios de comparação interlaboratorial que a Silliker participa pelo BIPEA Waste Water e que foram aprovados dentro do intervalo de aceitação.

A gama de trabalho e os limites de detecção e quantificação, como já mencionados em capítulos anteriores, são pré-definidas de fábrica de acordo com cada lote de kit e o estudo dos limites de detecção e quantificação de cada gama encontra-se no **anexo III**. Ainda assim foram realizados estudos da homogeneidade das variâncias para verificar o ajuste das gamas de trabalho, recorrendo-se ao teste F de Fisher – Snedecor, e nos 3 casos os PG calculados ficaram abaixo do valor crítico tabelado, demonstrando o bom ajuste das gamas de trabalho.

Com o uso de MRCs enquadrados em cada gama foram realizados estudos da exatidão com os recursos dos testes de erro relativo (Er), teste T e Z-score. Obtendo-se Er abaixo de 0.7% para os 3 casos, Z-scores bem abaixo de 2 e T calculados

menores que T tabelados, demonstrando a boa exatidão do método quando posto em comparação com MRCs.

Inicialmente o cálculo da incerteza associada ao método também foi realizado com o uso de análises de MRCs, para a componente sistemática, porém uma auditoria do IPAC detectou uma não conformidade em relação a essa forma de calcular a incerteza e o cálculo final teve que ser feito com o uso de ensaios de recuperação para a componente sistemática (a nova versão da ISO/IEC 17025:2018 não aceita cálculo da incerteza com o uso de MRCs de entidades não acreditadas, caso dos MRCs do laboratório Merck usados nas análises). Dessa forma as incertezas associadas a cada gama acabaram ficando em 17% para LCK 138, 22% para LCK 238 e 13% para LCK 338, resultados relativamente maiores que a incerteza feita a partir dos MRCs, que tinha ficado com uma incerteza expandida relativa de 10%, que são justificados pela maior relação analista/análise durante ensaios de recuperação.

Na validação para as gamas do fósforo total também foram realizados estudos de repetibilidade com 10 análises repetidas de amostras de águas residuais, que pelo histórico da empresa estariam enquadradas nos intervalos corretos das gamas de trabalho, onde foram verificados limites de repetibilidade relativos individuais aceitáveis, 10% para o LCK 349 e 3% para o LCK 350, e limite de repetibilidade relativo combinado de 7%, com um coeficiente de variação médio relativo também baixo, 2%, atestando para a baixa dispersão dessas análises realizadas em condições de repetibilidade. Os resultados das análises dessas amostras foram submetidos ao teste de Grubbs para identificação de possíveis outliers e nenhum valor aberrante foi constatado (para 1% e 5%).

No decorrer das análises foram realizados estudos da precisão intermédia com ensaios duplicados de amostras reais de águas residuais, foram 17 amostras estudadas fósforo LCK 349 e 18 para o LCK 350. Os resultados do limite da precisão intermédia relativo para cada uma das gamas foram de 5.7 % para LCK 349 e 9.8 % para LCK 350 e os coeficientes de variação médio relativo de 2.0% e 3.5% respectivamente. Bons valores, abaixo de 10%, demonstrando a baixa dispersão dos valores em condições de precisão intermédia.

A veracidade do estudo foi posta à prova nos ensaios de comparação interlaboratorial que a Silliker participa pelo BIPEA Waste Water e que foram aprovados dentro do intervalo de aceitação.

A gama de trabalho e os limites de detecção e quantificação, como já mencionados em capítulos anteriores, são pré-definidas de fábrica de acordo com cada lote de kit e o estudo dos limites de detecção e quantificação de cada gama encontra-se no **anexo III**. Ainda assim foram realizados estudos da homogeneidade das variâncias para verificar o ajuste das gamas de trabalho, recorrendo-se ao teste F de Fisher – Snedecor, e nos 2 casos os PG calculados ficaram abaixo do valor crítico tabelado, demonstrando o bom ajuste das gamas de trabalho.

Já a par das não conformidades detectadas pelo IPAC em relação ao cálculo da incerteza através dos MRCs, o estudo para o fósforo total foi realizado diretamente com o uso de ensaios de recuperação, chegando a incertezas expandidas relativas de 38% para o LCK 349 e 25% para o LCK 350. Esses resultados refletiram diretamente a dificuldade que foi a validação do fósforo por esse método, já que ao longo dos trabalhos as medições mostraram-se bastante instáveis, onde foram necessárias algumas tentativas até o correto enquadramento do método.

Outra não conformidade que foi tratada ficou a cargo dos ensaios dos brancos, pois o IPAC constatou que os critérios de aceitação dos mesmos eram superiores aos valores das Abs dos padrões dos limites de quantificação dos métodos. A princípio pensou-se que a água desionizada usada nas análises poderia ser a responsável pela discrepância, porém com a realização de testes comparativos entre Abs de branco dos reagentes, Abs certificada no lote e Abs dos brancos com água desionizada, ficou constatado que os valores de Abs dos brancos com água desionizada são característicos dos próprios kits de análises.

No geral, os métodos mostraram resultados satisfatórios para a realização da validação e assim incluir esses tipos de análises nas atividades de rotina do laboratório de ambiente da Silliker.

8 Bibliografia

[1] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

[2] Sawyer, C. And Mc Carty, P. And Parkin, G. 2003 Chemistry For Environmental Engineering And Science

- [3] Guia Relacre 3 - Validação de Resultados em Laboratórios Químicos, Relacre (1996).
- [4] Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Relacre (2000).
- [5] Guia Relacre 7 – Ensaio Interlaboratoriais em Química, Relacre (1996)
- [6] Handbook, 1979 – Handbook for analytical quality control in water and wastewater laboratories.
- [7] Decreto-Lei nº 236/98, de 01 de Agosto, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território.
- [8] ISO 11352:2012 Water quality — Estimation of measurement uncertainty based on validation and quality control data.
- [9] NP EN ISO/IEC 17025:2018 - Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração.
- [10] NP EN ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração, 2ª Edição, IPQ (2005).
- [11] González, A. Gustavo, and M. Ángeles Herrador. "A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles." TrAC Trends in Analytical Chemistry 26.3 (2007).
- [12] B. Magnusson and U. Ornemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org
- [13] Deutsches Institut Fur Normung E.V. (German National Standard DIN 1319-1
- [14] ISO 8466-1:1990 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.
- [15] ISO 8466-2:2001 Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics — Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions.

- [16] ISO 3534-4:2014 Statistics — Vocabulary and symbols — Part 4: Survey sampling.
- [17] ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment — General requirements for proficiency testing.
- [18] ISO 6878:2004 Water quality — Determination of phosphorus — Ammonium molybdate spectrometric method.
- [19] ISO 11905-1 “Water quality. Determination of nitrogen. Part 1: Method using oxidative digestion with peroxodisulfate”.
- [20] ISO (1993) Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). Geneva (2nd printing 1995).
- [21] NP EN ISO 9000:2005 - Sistemas de Gestão da Qualidade - Fundamentos e Vocabulário.

9 Anexos

9.1 Anexo I

Certificados dos MRCs usados no processo de validação dos métodos.



Chargenzertifikat

Lot Certificate / Certificado del lote

Standardlösungen (CRM) für photometrische Anwendungen,
verdünnt und gebrauchsfertig, rückführbar auf SRM von NIST

Gesamtstickstoff Standard 2.50 mg/l N

Standard solutions (CRM) for photometric applications, diluted and
ready for use, traceable to SRM from NIST

Total nitrogen Standard 2.50 mg/l N

Las soluciones estándar (CRM) para aplicaciones fotométricas,
diluido y listo para usar, trazable a SRM de NIST

Nitrógeno total Patrón 2.50 mg/l N

zur Qualitätsprüfung photometrischer Anwendungen / for quality check of photometric applications /
para comprobar la calidad de aplicaciones fotométricas

Art.Nr. / Cat.No. / Art. Nro.	1.25043.0100
Charge-Nr. / Lot no. / Lote nro.	HC85762643
Verwendbarkeit / Expiry date / Fecha de caducidad	2021/03/31
Photometer / Photometer / Fotómetro	Referenz / Reference / Referencia
Prüfer / Tester / Verificador	Fr. Brandner
Datum / Date / Fecha	2018/03/29
Datei / File / Fichero	1250430100_HC85762643_EN

Parameter / Parameter / Parámetro	Messergebnis / Result / Resultado (Standard / Standard / Patrón) mg/l N	Erweiterte Messunsicherheit VB* 95% / Expanded uncertainty CI** 95% / incertidumbre expandida IC*** 95% (Standard / Standard / Patrón) mg/l N
Gesamtstickstoff / Total nitrogen / Nitrógeno total	2.53	± 0.06

* VB = Vertrauensbereich; ** CI = Confidence interval; *** IC = Intervalo de confianza

Merck KGaA

Qualitätskontrolle /
Quality Control / Control de calidad

Laborleiter / Head of Lab. /
Jefe de laboratorio



Chargenzertifikat

Lot Certificate / Certificado del lote

Standardlösungen (CRM) für photometrische Anwendungen,
verdünnt und gebrauchsfertig, rückführbar auf SRM von NIST

Gesamtstickstoff Standard 100 mg/l N

Standard solutions (CRM) for photometric applications, diluted and
ready for use, traceable to SRM from NIST

Total nitrogen Standard 100 mg/l N

Las soluciones estándar (CRM) para aplicaciones fotométricas,
diluido y listo para usar, trazable a SRM de NIST

Nitrógeno total Patrón 100 mg/l N

zur Qualitätsprüfung photometrischer Anwendungen / for quality check of photometric applications /
para comprobar la calidad de aplicaciones fotométricas

Art.Nr. / Cat.No. / Art. Nro.	1.25045.0100
Charge-Nr. / Lot no. / Lote nro.	HC87401845
Verwendbarkeit / Expiry date / Fecha de caducidad	2021/10/31
Photometer / Photometer / Fotómetro	Referenz / Reference / Referencia
Prüfer / Tester / Verificador	Fr. Brandner
Datum / Date / Fecha	2018/10/29
Datei / File / Fichero	1250450100_HC87401845_EN

Parameter / Parameter / Parámetro	Messergebnis / Result / Resultado (Standard / Standard / Patrón) mg/l N	Erweiterte Messunsicherheit VB* 95% / Expanded uncertainty CI** 95% / incertidumbre expandida IC*** 95% (Standard / Standard / Patrón) mg/l N
Gesamtstickstoff / Total nitrogen / Nitrógeno total	100	± 3

* VB = Vertrauensbereich; ** CI = Confidence interval; *** IC = Intervalo de confianza

Merck KGaA

Qualitätskontrolle /
Quality Control / Control de calidad

Laborleiter / Head of Lab. /
Jefe de laboratorio



Chargenzertifikat

Lot Certificate / Certificado del lote

Standardlösungen (CRM) für photometrische Anwendungen,
verdünnt und gebrauchsfertig, rückführbar auf SRM von NIST

Gesamtstickstoff Standard 12.0 mg/l N

Standard solutions (CRM) for photometric applications, diluted and
ready for use, traceable to SRM from NIST

Total nitrogen Standard 12.0 mg/l N

Las soluciones estándar (CRM) para aplicaciones fotométricas,
diluido y listo para usar, trazable a SRM de NIST

Nitrógeno total Patrón 12.0 mg/l N

zur Qualitätsprüfung photometrischer Anwendungen / for quality check of photometric applications /
para comprobar la calidad de aplicaciones fotométricas

Art.Nr. / Cat.No. / Art. Nro.	1.25044.0100
Charge-Nr. / Lot no. / Lote nro.	HC71681544
Verwendbarkeit / Expiry date / Fecha de caducidad	2020/01/31
Photometer / Photometer / Fotómetro	Referenz / Reference / Referencia
Prüfer / Tester / Verificador	Hr. Maly
Datum / Date / Fecha	2017/01/05
Datei / File / Fichero	1250440100_HC71681544_EN

Parameter / Parameter / Parámetro	Messergebnis / Result / Resultado (Standard / Standard / Patrón) mg/l N	Erweiterte Messunsicherheit VB* 95% / Expanded uncertainty CI** 95% / incertidumbre expandida IC*** 95% (Standard / Standard / Patrón) mg/l N
Gesamtstickstoff / Total nitrogen / Nitrógeno total	12.1	± 0.3

* VB = Vertrauensbereich; ** CI = Confidence interval; *** IC = Intervalo de confianza

Merck KGaA

Qualitätskontrolle /
Quality Control / Control de calidad

Laborleiter / Head of Lab. /
Jefe de laboratorio

9.2 Anexo II

Certificados de qualidade dos lotes dos kits usados na validação do método.

Quality certificate Technical data for Validation of LCK238; LatoN (TNb) (5.0 - 40.0 mg/L N)

Quality certificate
Rev. 15-May-2018

Technical data for cuvette test LCK238

Sensitivity	0.0204 Abs./mg/L
Ordinate intercept	0.145 Abs.
Residual standard deviation	0.0079 Abs.
Method variation coefficient	1.76 %
Method standard deviation	0.39 mg/L
Confidence interval (95%)	0.94 mg/L
Correlation coefficient (r^2)	0.9995

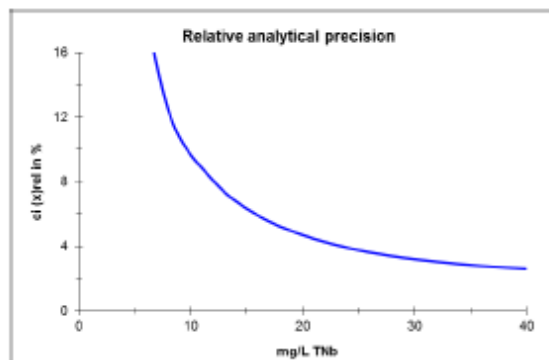
The technical data for cuvette test LCK238 were determined in conformity with ISO 8466-2 and DIN 38402 A51 „Calibration of analysis methods“.

The series of the smallest and largest calibration standards exhibit normal distribution and are outlier- and trend-free.
The calibration gives a linear function.

Technical data in conformity with DIN 32645

Detection limit	0.54 mg/L
Quantitation limit	1.63 mg/L

The detection and the quantitation limits were determined in conformity with DIN 32645.



Result	Confidence interval (95%)
8 mg/L	± 1.00 mg/L
16 mg/L	± 0.95 mg/L
24 mg/L	± 0.94 mg/L
32 mg/L	± 0.97 mg/L
40 mg/L	± 1.03 mg/L

HACH LANGE GmbH
Product Management

Dr. Ralf Kloos

HACH LANGE GmbH
Wiltstätterstraße 11
D-40549 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211-52 88-320
Fax +49 (0)211-52 88-210
Info-export@hach.com
www.hach.com



Quality certificate
Technical data for Validation of
LCK338; LatoN (TNb)
(20 - 100 mg/L N)

Quality certificate
Rev. 17-May-2018

Technical data for cuvette test LCK338

Sensitivity	0.0081 Abs./mg/L
Ordinate intercept	0.147 Abs.
Residual standard deviation	0.0048 Abs.
Method variation coefficient	1.09 %
Method standard deviation	0.60 mg/L
Confidence interval (95%)	1.45 mg/L
Correlation coefficient (r^2)	0.9997

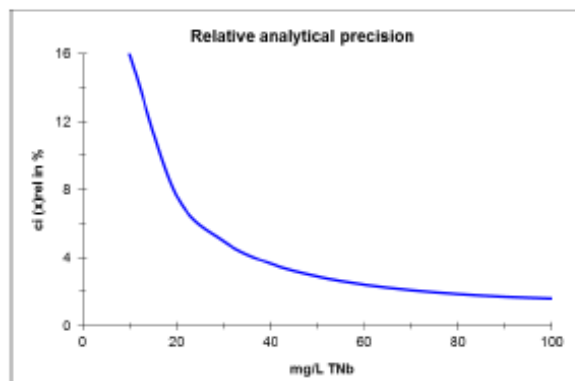
The technical data for cuvette test LCK338 were determined in conformity with ISO 8466-2 and DIN 38402 A51 „Calibration of analysis methods“.

The series of the smallest and largest calibration standards exhibit normal distribution and are outlier- and trend-free.
The calibration gives a linear function.

Technical data in conformity with DIN 32645

Detection limit	0.65 mg/L
Quantitation limit	1.95 mg/L

The detection and the quantitation limits were determined in conformity with DIN 32645.



Result	Confidence interval (95%)
20 mg/L	± 1.5 mg/L
40 mg/L	± 1.5 mg/L
60 mg/L	± 1.4 mg/L
80 mg/L	± 1.5 mg/L
100 mg/L	± 1.6 mg/L

HACH LANGE GmbH
Product Management

Dr. Ralf Kloos

HACH LANGE GmbH
Willstätterstraße 11
D-40549 Düsseldorf
Tel.+49 (0)211-52 88-320
Fax+49 (0)211-52 88-210
Info-export@hach.com
www.hach.com



Quality certificate
Technical data for Validation of
LCK138; LatoN (TNb)
(1.0 - 16.0 mg/L N)

Quality certificate
Rev. 15-May-2018

Technical data for cuvette test LCK138

Sensitivity	0.0507 Abs./mg/L
Ordinate intercept	0.150 Abs.
Residual standard deviation	0.0048 Abs.
Method variation coefficient	1.08 %
Method standard deviation	0.095 mg/L
Confidence interval (95%)	0.229 mg/L
Correlation coefficient (r^2)	0.9998

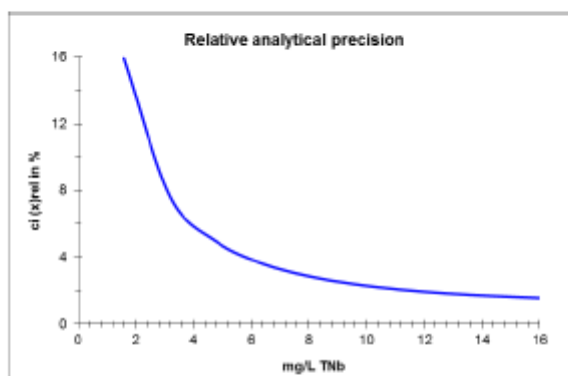
The technical data for cuvette test LCK138 were determined in conformity with ISO 8468-2 and DIN 38402 A51 „Calibration of analysis methods“.

The series of the smallest and largest calibration standards exhibit normal distribution and are outlier- and trend-free.
The calibration gives a linear function.

Technical data in conformity with DIN 32645

Detection limit	0.116 mg/L
Quantitation limit	0.350 mg/L

The detection and the quantitation limits were determined in conformity with DIN 32645.



Result	Confidence interval (95%)
3.2 mg/L	± 0.25 mg/L
6.4 mg/L	± 0.23 mg/L
9.6 mg/L	± 0.23 mg/L
12.8 mg/L	± 0.24 mg/L
16.0 mg/L	± 0.25 mg/L

HACH LANGE GmbH
Product Management

Dr. Ralf Kloos

HACH LANGE GmbH
Willstätterstraße 11
D-40549 Düsseldorf
Tel. +49 (0)211-52 88-320
Fax +49 (0)211-52 88-210
Info-export@hach.com
www.hach.com



Quality certificate
Technical data for Validation
of LCK350 (2-20 mg/l Ptot,
Total Phosphor)

Quality certificate

Technical data for cuvette test LCK350
(Results as $\text{PO}_4\text{-P}$)

Sensitivity	0.049 Abs./(mg/l)
Ordinate intersect	0.107 Abs.
Residual standard deviation	0.0045 Abs.
Method variation coefficient	0.83 %
Method standard deviation	0.091 mg/l
Confidence interval (95%)	± 0.221 mg/l

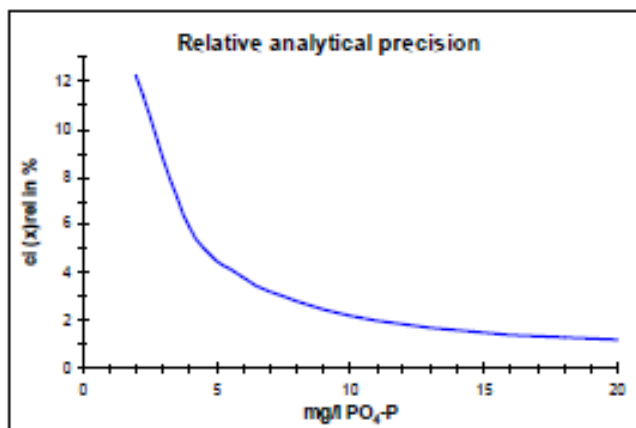
The technical data for cuvette test LCK350 were determined in conformity with ISO 8466-1 and DIN 38402 A51 „Calibration of analysis methods“.

The series of the smallest and largest calibration standards exhibit normal distribution and are outlier- and trend-free.
The calibration gives a linear function.

Technical data in conformity with DIN 32645

Detection limit	0.052 mg/l
Quantitation limit	0.156 mg/l

The detection and the quantitation limits were determined in conformity with DIN 32645.



Result	Confidence interval (95%)
4.0 mg/l	± 0.235 mg/l
8.0 mg/l	± 0.224 mg/l
12.0 mg/l	± 0.221 mg/l
16.0 mg/l	± 0.228 mg/l
20.0 mg/l	± 0.245 mg/l

HACH LANGE GmbH
Quality Management


Dr. Ralf Kloos

Quality certificate

Technical data for Validation of LCK349 (0.05-1.5 mg/l P_{tot}, Total Phosphor)

Quality certificate

Technical data for cuvette test LCK349
(Results as PO₄-P)

Sensitivity	0.605 Abs./ (mg/l)
Ordinate intersect	0.110 Abs.
Residual standard deviation	0.0025 Abs.
Method variation coefficient	0.59 %
Method standard deviation	0.004mg/l
Confidence interval (95%)	± 0.010 mg/l

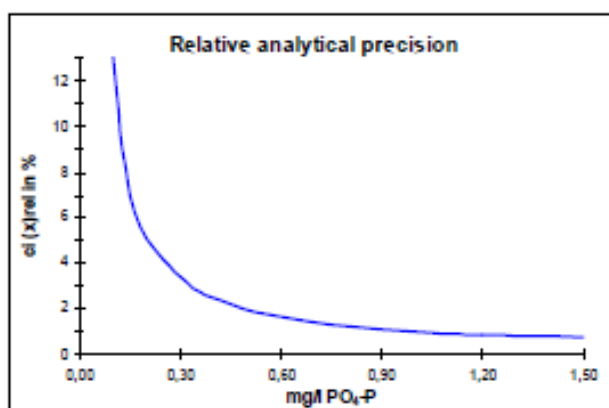
The technical data for cuvette test LCK349 were determined in conformity with ISO 8466-1 and DIN 38402 A51 „Calibration of analysis methods“.

The series of the smallest and largest calibration standards exhibit normal distribution and are outlier- and trend-free.
The calibration gives a linear function.

Technical data in conformity with DIN 32645

Detection limit	0.007 mg/l
Quantitation limit	0.020 mg/l

The detection and the quantitation limits were determined in conformity with DIN 32645.



Result	Confidence interval (95%)
0.3 mg/l	± 0.0102 mg/l
0.6 mg/l	± 0.0099 mg/l
0.9 mg/l	± 0.0099 mg/l
1.2 mg/l	± 0.0104 mg/l
1.5 mg/l	± 0.0112 mg/l

HACH LANGE GmbH
Quality Management


Dr. Ralf Kloos

9.3 Anexo III

Anexos XVIII e XXII, respectivamente, do Decreto-Lei nº 236/98.

ANEXO XVIII

Valores limite de emissão (VLE) na descarga de águas residuais

Parâmetros	Expressão dos resultados	VLE ⁽¹⁾
pH (0)	Escala de Sorensen	6,0-9,0 ⁽²⁾
Temperatura (0)	°C	Aumento de 3°C ⁽³⁾
CBO ₅ , 20°C (20) (0)	mg/l O ₂	40
CQO (0)	mg/l O ₂	150
SST (0)	mg/l	60
Alumínio	mg/l Al	10
Ferro total	mg/l Fe	2,0
Manganés total	mg/l Mn	2,0
Cheiro	—	Não detectável na diluição 1:20
Cor (0)	—	Não visível na diluição 1:20
Cloro residual disponível:		
Livre	mg/l Cl ₂	0,5
Total	mg/l Cl ₂	1,0
Fenóis	mg/l C ₆ H ₅ OH	0,5
Óleos e gorduras	mg/l	15
Sulfuretos	mg/l S	1,0
Sulfitos	mg/l SO ₃	1,0
Sulfatos	mg/l SO ₄	2000
Fósforo total	mg/l P	10 3 (em águas que alimentem lagoas ou albufeiras) 0,5 (em lagoas ou albufeiras)
Azoto amoniacal	mg/l NH ₄	10
Azoto total	mg/l N	15
Nitratos	mg/l NO ₃	50
Aldeídos	mg/l	1,0
Arsénio total	mg/l As	1,0
Chumbo total	mg/l Pb	1,0
Cádmio total	mg/l Cd	0,2

ANEXO XXII

Métodos analíticos de referência para descarga de águas residuais

Parâmetros	Expressão dos resultados	Limite de detecção — % valor paramétrico	Precisão — % valor paramétrico	Exactidão — % valor paramétrico ±	Métodos analíticos de referência ⁽¹⁾
<i>pH</i>	Escala de Sorensen	10	10	10	Electrometria.
Cor (após filtração simples)	mg/l, escala <i>Pt-Co</i>				Método fotométrico, após filtração simples, com padrões da escala <i>Pt-Co</i> .
Sólidos suspensos totais	mg/l	10	10	10	Centrifugação (tempo mínimo de cinco minutos. Aceleração média de 2800 g a 3200 g), secagem a 105°C e pesagem. Filtração através de membrana filtrante de 0,45 µm, secagem a 105°C e pesagem.
Temperatura	°C	10	10	10	Termometria.
Condutividade	µS/cm, 20°C	10	10	10	Electrometria.
Nitratos	mg/l <i>NO₃</i>	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular. Cromatografia iónica. Eléctrodos específicos.
Nitritos	mg/l <i>NO₂</i>	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular. Cromatografia iónica.
Fluoretos	mg/l <i>F</i>	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular. Eléctrodos específicos. Cromatografia iónica.
Cloro orgânico total extraível.	mg/l <i>Cl</i>				
Substâncias tensoactivas (que reagem com o azul-de-metileno).	mg/l, sulfato de laurilo e sódio	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular.
Fósforo total	mg/l <i>P</i>	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular.
Fenóis	mg/l <i>C₆H₅OH</i>	10	10	10	Espectrometria de absorção molecular . Método da 4-aminoantipirina . Método da paranitranilina .
Carência química de oxigénio (CQO).	mg/l <i>O₂</i>	25	25	10	Método do dicromato de potássio.
Oxigénio dissolvido	% saturação de <i>O₂</i>				Método de Winkler . Método electroquímico .
Carência bioquímica de oxigénio (CBO ₅ , 20°C).	mg/l <i>O₂</i>	25	25	10	Determinação de <i>O₂</i> dissolvido antes e após cinco dias de incubação a 20°C ± 1°C ao abrigo da luz, com adição de um inibidor da nitrificação.
Azoto Kjeldahl (não inclui o azoto de <i>NO₂</i> e <i>NO₃</i>).	mg/l <i>N</i>	10	10	10	Mineralização, destilação segundo o método Kjeldahl e determinação do amónio por espectrometria de absorção molecular ou volumetria.