

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

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

Uma das características cosmogónicas da água no planeta Terra, que é importante realçar desde o início, é o facto do seu quantitativo ser, por um lado, limitado, e, por outro, praticamente constante desde a sua formação. Os quantitativos recebidos do espaço exterior desde então são, com efeito, negligenciáveis em termos absolutos.

A água existente no planeta Terra não constitui uma realidade estática, integrando-se em complexos ciclos biogeoquímicos, que a mantêm numa circulação permanente. Importa realçar o movimento contínuo da água entre a superfície do planeta e a atmosfera, através dos processos de evaporação da água superficial (oceanos, lagos e rios, glaciares e zonas geladas, solo, etc.), e de transpiração da biomassa [1].

Sendo a água doce um recurso renovável, é também finito e limitado. Cerca de dois terços da água total não é aproveitada pelo Homem, chegando ao mar sem ter sido usada, dado que volumes consideráveis se encontram fora do alcance de populações necessitadas. Por outro lado, o recurso às reservas de água subterrânea, em geral de boa qualidade, continua a ser exagerado. O uso abusivo da água tem como consequência o facto de alguns dos maiores rios do planeta não terem água suficiente para manter o seu curso normal.

O corpo humano e as células vivas são maioritariamente constituídos por água. O corpo humano contém entre 65 e 75 % de água, de tal modo que, quando perde cerca de 15 % desse total, entra numa situação de desidratação que conduz inevitavelmente à morte, a não ser que um processo correctivo seja rapidamente desencadeado, de forma atempada. Para além do papel estruturante que a água tem no organismo humano, também intervém em numerosos metabolismos como por exemplo digestão, depuração renal, evolução celular e asseguramento do equilíbrio iónico. As necessidades diárias do Homem em relação à água cifram-se assim em dois a três litros, fornecidos sob a forma de água e outros líquidos, ou contidos nos alimentos que ingerimos.

Na composição química da maioria das águas destinadas ao consumo humano destacam-se alguns compostos químicos presentes: cálcio, sódio, potássio, magnésio, bicarbonatos, sulfatos, cloretos e nitratos. Estes e outros constituintes inorgânicos da água estão na origem do seu sabor e valor alimentar. Interessa que a sua concentração não seja demasiado baixa (o que poderia originar deficiências), nem demasiado alta (o que poderia provocar problemas para a saúde e afectar a sua qualidade) [1].

A água, sendo um bem essencial, deve ser usada de forma racional e sustentável. A sua abundância e qualidade têm sido postas em causa ao longo das últimas décadas.

No capítulo seguinte, são abordados alguns temas tais como o conceito de qualidade da água bem como a importância da garantia dessa qualidade, que pode ser conseguida através da realização de análises quantitativas periódicas. É feita uma descrição do Decreto-Lei actualmente em vigor, que rege a qualidade das águas destinadas ao consumo humano, o D.L. 306/2007 [2], onde são estabelecidos valores paramétricos para um conjunto de parâmetros a controlar, baseados em conhecimentos científicos e no princípio da acção preventiva, de modo a garantir que a água destinada ao consumo humano possa ser usada com segurança pelo consumidor, com vista à protecção da sua saúde de acordo com a Directiva 98/83/CE [3].

A lei recomenda que os métodos usados na determinação dos parâmetros garantam que os resultados sejam fiáveis e comparáveis. O laboratório, para garantir os pressupostos anteriores, deve demonstrar, através da validação, que o método conduz a resultados credíveis e adequados à utilização pretendida. A garantia da sua adequabilidade pode ser conseguida através da utilização de normas internacionais [4].

No presente trabalho, o principal documento normativo usado como referência foi a norma internacional ISO 17294: "Qualidade da Água - Aplicação da espectrometria de massa acoplada a plasma indutivo (ICP-MS)" [5, 6]. O equipamento usado neste trabalho, o Espectrómetro de Massa Acoplado a Plasma Indutivo é descrito em pormenor no capítulo 2.

A técnica de ICP-MS possibilita uma análise rápida multi-elemento, com elevada produtividade e com limites de detecção e quantificação muito baixos em águas para consumo humano. O objectivo do trabalho consistiu na implementação e validação de um método interno de ensaio, para determinação simultânea dos elementos constantes do Decreto-Lei, bem como outros habitualmente determinados no laboratório de Águas e Efluentes do CITEVE, em águas para consumo humano. A norma ISO 17294 foi adaptada à realidade diária do laboratório, nomeadamente, ao tipo de amostras em ensaio no que diz respeito, por exemplo, ao tipo de interferências existentes nas matrizes em análise. Neste sentido, foi efectuado um estudo de possíveis interferentes, susceptíveis de causarem sobreposições espectrais nos analitos de interesse, descrito no capítulo 4.

O método foi validado com base em dois tipos de avaliação: directa e indirecta de acordo com o Guia nº 13 da RELACRE [4] (Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal): "Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química", que estabelece linhas de orientação a seguir pelos Laboratórios Químicos que pratiquem métodos internos de ensaio.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

2.1.1- QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO

A água, enquanto composto dotado de características físico-químicas próprias que afectam e condicionam o seu uso, não se encontra no estado puro na natureza: não aparece como um composto incolor, inodoro e insípido, que, teoricamente, poderia ser. Encontra-se na natureza, em todas as circunstâncias, associada a substâncias estranhas, existentes em solução e/ou em suspensão, que afectam as suas capacidades potenciais de aplicação e que condicionam os seus usos possíveis. Daí a necessidade de associar, à sua quantificação, a indicação da **qualidade**, qualidade essa que é definida como sendo aquilo que a caracteriza, ou melhor ainda, a sua adaptabilidade ao uso para determinados fins, bem especificados.

A presença de substâncias estranhas pode gerar problemas ao nível da saúde pública, e tendo em conta os seus diferentes usos, problemas económicos e a criação de disfunções ambientais.

Numa perspectiva orientada para o uso da água, nas suas vertentes de saúde pública, a OMS (Organização Mundial de Saúde), propôs em 1971, a seguinte definição sistemática de poluição da água: "Uma água considera-se poluída quando a composição ou o seu estado tenham sido alterados, de tal forma que se torne menos adequada para todas ou para algumas funções e fins para as quais pode ser adequada, no seu estado natural".

Numa aproximação de cariz ambiental do problema, a UNESCO, no Relatório do Programa Hidrológico Internacional (1982), propôs uma outra definição:

"Poluição da água será uma qualquer modificação, quer natural quer artificial, que directa ou indirectamente modifique a qualidade da água e altere ou destrua o equilíbrio dos ecossistemas e dos recursos naturais, de tal modo que:

- Provoque perigos para a saúde pública;
- Diminua a sua adequabilidade ou eficiência e o bem-estar do Homem e das suas comunidades;
- Reduza os usos benéficos da água;

A evolução destas aproximações conceptuais do conceito de poluição da água é óbvia. Da definição de poluição decorrerá a de poluente, referenciado como qualquer substância que provoque poluição. Dado que é necessária uma avaliação quantitativa do poluente, chega-se à definição de parâmetros indicativos das concentrações admissíveis desses poluentes, ou seja, à definição das concentrações recomendadas (ou desejáveis) dessas substâncias e dos limites a partir dos quais sejam previsíveis processos, ou reacções indesejáveis.

Para avaliar a qualidade da água para consumo humano é necessário recorrer a técnicas analíticas, físico-químicas e microbiológicas, cujo número e complexidade tem vindo a crescer ao longo das últimas décadas [1].

2.1.2- LEGISLAÇÃO

Na Comunidade Europeia, a água encontra-se sujeita a uma pressão crescente, devido ao contínuo aumento da procura de quantidades suficientes de água de boa qualidade para diversos fins, surgindo a necessidade de estabelecimento de acções de protecção das águas em termos qualitativos e quantitativos [7].

Os Estados Membros da União Europeia estabeleceram programas de controlo para verificar se a qualidade da água destinada ao consumo humano respeita os requisitos da lei em vigor. Tais programas devem ser adequados às necessidades locais e respeitar os requisitos de controlo mínimos estabelecidos de acordo com a Directiva 98/83/CE. A directiva 2000/60/CE, também designada por Directiva Quadro da Água, entrou em vigor em Dezembro de 2000 e estabelece um quadro de acção comunitária da política da água, reflectindo uma mudança de paradigma da política da respectiva gestão, centrando-se na protecção do ambiente. Define igualmente um enquadramento para a protecção das águas de superfície interiores, das águas de transição, das águas costeiras e das águas subterrâneas [3, 7].

Com a entrada de Portugal na Comunidade Económica Europeia, passaram a ser aplicáveis ao nosso país todas as directivas comunitárias respeitantes à qualidade da água, incluindo, necessariamente, a destinada ao consumo humano.

O documento jurídico que actualmente legisla a qualidade da água de abastecimento para consumo humano em Portugal é o Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto.

Este decreto-lei estabelece o regime da qualidade da água destinada ao consumo humano, procedendo à revisão do Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro, que transpôs para o ordenamento jurídico interno a Directiva nº 98/83/CE, de 3 de Novembro, tendo por objectivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal da água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição. Estabelece ainda os critérios de repartição da responsabilidade pela gestão de um sistema de abastecimento público de água para consumo humano, quando a mesma seja partilhada por duas ou mais entidades gestoras [2, 3].

De acordo com o actual decreto-lei [2] entende-se por *água destinada ao consumo humano*:

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

Fora do âmbito deste Decreto-lei destacam-se as águas minerais naturais e as águas de nascente abrangidas por legislação específica (Decreto-lei nº 156/98 de 6 de Julho e portaria 1220/2000 de 29 de Dezembro), as águas que constituam produtos medicinais na acepção dada a medicamentos pela alínea ee) do nº 1 do artigo 3º do Decreto-lei nº 176/2006 de 30 de Agosto, e as águas destinadas à produção de água para consumo humano, as águas de rega e as balneares (abrangidas pelo Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto) [2].

A legislação não é uma realidade imutável, prevendo-se, mesmo a nível comunitário, que, sendo justificável e necessário, algumas adaptações sejam introduzidas, de modo a torná-la mais realista [1].

O Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro, manteve aspectos fundamentais do anterior diploma, o Decreto-Lei nº 236/98, de 1 de Agosto. Este definia já o essencial das obrigações das entidades gestoras, nomeadamente a apresentação do programa de controlo da qualidade da água para consumo humano, a frequência de amostragem de acordo com a população servida, a comunicação dos incumprimentos dos **valores paramétricos** (valores máximos fixados para cada um dos parâmetros a controlar) e de outras situações que comportassem risco para a saúde humana, a publicação trimestral dos resultados obtidos nas análises de demonstração de conformidade, a comunicação, até 31 de Março de cada ano, dos dados analíticos da implementação do programa de controlo da qualidade da água relativos ao ano transacto, a realização de análises preferencialmente em laboratórios de ensaio credenciados e os métodos analíticos de referência.

Relativamente ao anterior diploma legal, o Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro, modificou a lista de parâmetros a realizar, alterou alguns valores paramétricos, abordou de uma forma mais racionalizada o controlo dos pesticidas, estabeleceu que o controlo de qualidade da água passava a ser feito na torneira do

consumidor e definiu a necessidade de regulamentação das situações em que a gestão e a exploração de um sistema de abastecimento público de água estão sob a responsabilidade de duas ou mais entidades gestoras. Contudo, a alteração mais significativa foi a criação de uma autoridade competente, o Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), responsável pela coordenação da implementação do diploma. Este organismo possibilitou a concentração de um conjunto de atribuições, anteriormente dispersas por várias entidades públicas.

Passados cinco anos sobre a publicação daquele diploma, e após um balanço rigoroso sobre a sua implementação existia um conjunto de aspectos que importava rever, sendo o principal, a repartição de responsabilidades entre entidades gestoras quanto ao controlo da qualidade da água para consumo humano. Há, no entanto, um conjunto de razões que justificaram a revisão do Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro. Por um lado, a necessidade de proceder à definição de uma abordagem mais racionalizada para as zonas de abastecimento com volumes médios diários inferiores a 100 m³, nomeadamente no que concerne à frequência de amostragem. Acresce a necessidade de garantir a desinfecção como processo de tratamento para a redução da ainda elevada percentagem de incumprimentos dos valores paramétricos relativos aos parâmetros microbiológicos. Torna-se ainda indispensável a definição e a implementação de um programa de controlo operacional para controlo regular e frequente de todos os componentes do sistema de abastecimento, de modo a otimizar a qualidade da água no consumidor. Surgiu também a necessidade de introdução de novos parâmetros no controlo de qualidade de água, tendo em conta a existência, em algumas zonas do país, de águas com dureza elevada ou agressivas, ou com frequente aparecimento de florescências de cianobactérias, razões pelas quais deverão ser controladas através da análise de parâmetros específicos [2, 8].

A água destinada ao consumo humano deve respeitar os valores paramétricos dos parâmetros constantes das partes I (parâmetros microbiológicos), II (parâmetros químicos) e III (parâmetros indicadores) do anexo I do Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de Agosto.

Os ensaios relativos à verificação do cumprimento da legislação só podem ser realizados por laboratórios de ensaios considerados aptos pela autoridade competente, o IRAR. Os laboratórios de ensaio devem manter um sistema de controlo da qualidade analítica devidamente documentado e actualizado.

A verificação do cumprimento dos valores paramétricos é feita:

- No caso da água fornecida a partir de uma rede de distribuição, no ponto em que, no interior de uma instalação ou estabelecimento, sai das torneiras normalmente utilizadas para consumo humano;

- No caso da água fornecida a partir de fontanários não ligados à rede de distribuição, no ponto de utilização;
- No caso da água fornecida por entidades gestoras em alta, nos pontos de amostragem dos pontos de entrega aos respectivos utilizadores;
- No caso da água fornecida a partir de camiões, navios- cisterna e reservatórios não ligados à rede de distribuição, no ponto de utilização;
- No caso da água destinada à venda em garrafas e outros recipientes, com ou sem fins comerciais, no fim da linha de enchimento;
- No caso da água utilizada numa empresa da indústria alimentar, no ponto de utilização [2].

Os valores paramétricos, no que respeita aos metais, para a água destinada ao consumo humano fornecida por redes de distribuição, por fontanários não ligados à rede de distribuição, por pontos de entrega, por camiões ou navios-cisterna, por reservatórios não ligados à rede de distribuição, utilizada numa empresa da indústria alimentar ou posta à venda em garrafas ou outros recipientes, são os seguintes:

Tabela 2.1: Valores paramétricos dos parâmetros químicos e indicadores de acordo com o anexo I do D.L. nº 306/2007.

Parâmetro		Valor Paramétrico (VP)	Unidade
Parâmetros Químicos	Arsénio	10	µg As/L
	Antimónio	5,0	µg Sb/L
	Boro	1,0	mg B/L
	Cádmio	5,0	µg Cd/L
	Crómio	50	µg Cr/L
	Cobre	2,0	mg Cu/L
	Chumbo	25 *	µg Pb/L
	Mercúrio	1	µg Hg/L
	Níquel	20	µg Ni/L
	Selénio	10	µg Se/L
Parâmetros Indicadores	Alumínio	200	µg Al/L
	Cálcio	---	mg Ca/L
	Dureza Total	---	mg CaCO ₃ /L
	Ferro	200	µg Fe/L
	Magnésio	---	mg Mg/L
	Manganês	50	µg Mn/L
	Sódio	200	mg Na/L

* Valor de 25 µg Pb/L de 25 de Dezembro de 2003 até 25 de Dezembro de 2013; 10 µg Pb/L após 25 de Dezembro de 2013.

Nota: Não é desejável que a concentração de cálcio seja superior a 100 mg Ca/L e que a concentração de magnésio seja superior a 50 mg Mg/L. É desejável que a dureza total em carbonato de cálcio esteja compreendida entre 150 e 500 mg CaCO₃/L.

No anexo II do Decreto-lei nº 306/2007 de 27 de Agosto, são definidos os controlos de rotina e de inspecção, bem como as respectivas frequências mínimas de amostragem para a análise da água destinada ao consumo humano.

O controlo de rotina tem como objectivo fornecer regularmente informações sobre a qualidade organoléptica e microbiológica da água destinada ao consumo humano e a eficácia dos tratamentos existentes, especialmente a desinfecção, e inclui os parâmetros Alumínio, Ferro e Manganês (por vezes, o Alumínio e o Ferro são incluídos no controlo de inspecção).

O controlo de inspecção tem como objectivo obter informações necessárias para verificar o cumprimento dos valores paramétricos do Decreto-lei, e inclui os parâmetros Antimónio, Arsénio, Boro, Cádmio, Cálcio, Chumbo, Cobre, Crómio, Dureza Total, Magnésio, Mercúrio, Níquel, Selénio e Sódio.

A determinação dos parâmetros correspondentes ao controlo de inspecção implica, em simultâneo, a determinação dos parâmetros contidos no controlo de rotina [2].

No anexo III do Decreto-lei nº 306/2007, são especificadas as características de desempenho dos métodos analíticos utilizados na determinação dos parâmetros da tabela 2.2. De acordo com o decreto-lei, os métodos utilizados devem, no mínimo, ser capazes de medir concentrações iguais ao valor paramétrico com a exactidão, a precisão e os limites de detecção especificados.

A **exactidão** corresponde ao erro sistemático e é igual à diferença entre o valor médio de um grande número de medições repetidas e o valor real.

A **precisão** corresponde ao erro aleatório que é obtido geralmente a partir do desvio padrão (no interior de cada lote e entre lotes) da dispersão dos resultados em torno da média. Uma precisão aceitável é igual a duas vezes o desvio padrão relativo.

O **limite de detecção** é igual a três vezes o desvio padrão relativo no interior de cada lote de uma amostra experimental contendo uma baixa concentração do parâmetro, ou cinco vezes o desvio padrão relativo no interior de cada lote da amostra de controlo [2].

Tabela 2.2: Valores de percentagem do valor paramétrico de exactidão, precisão e respectivos limites de detecção para alguns parâmetros de acordo com o anexo III do D.L. nº 306/2007.

Parâmetro	<i>Percentagem do valor paramétrico (%)</i>		
	Exactidão	Precisão	Limite de Detecção
Alumínio	10	10	10
Antimónio	25	25	25
Arsénio	10	10	10
Boro	10	10	10
Cádmio	10	10	10
Cálcio	10	10	10
Crómio	10	10	10
Cobre	10	10	10
Chumbo	10	10	10
Dureza Total	10	10	10
Ferro	10	10	10
Magnésio	10	10	10
Manganês	10	10	10
Mercúrio	20	10	10
Níquel	10	10	10
Selénio	10	10	10
Sódio	10	10	10

2.2- ESPECTROMETRIA DE MASSA ACOPLADA A PLASMA INDUTIVO

A Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo é uma técnica analítica multi-elementar, rápida, precisa e exacta para a quantificação de elementos vestigiários em amostras líquidas e sólidas. Conseguem-se analisar em simultâneo cerca de 20 a 30 elementos numa amostra.

Na figura 2.1 apresentam-se os elementos químicos que podem ser determinados por esta técnica analítica. Os elementos a cores podem ser analisados por ICP-MS com limites de detecção na gama dos ppt (partes por trilhão).

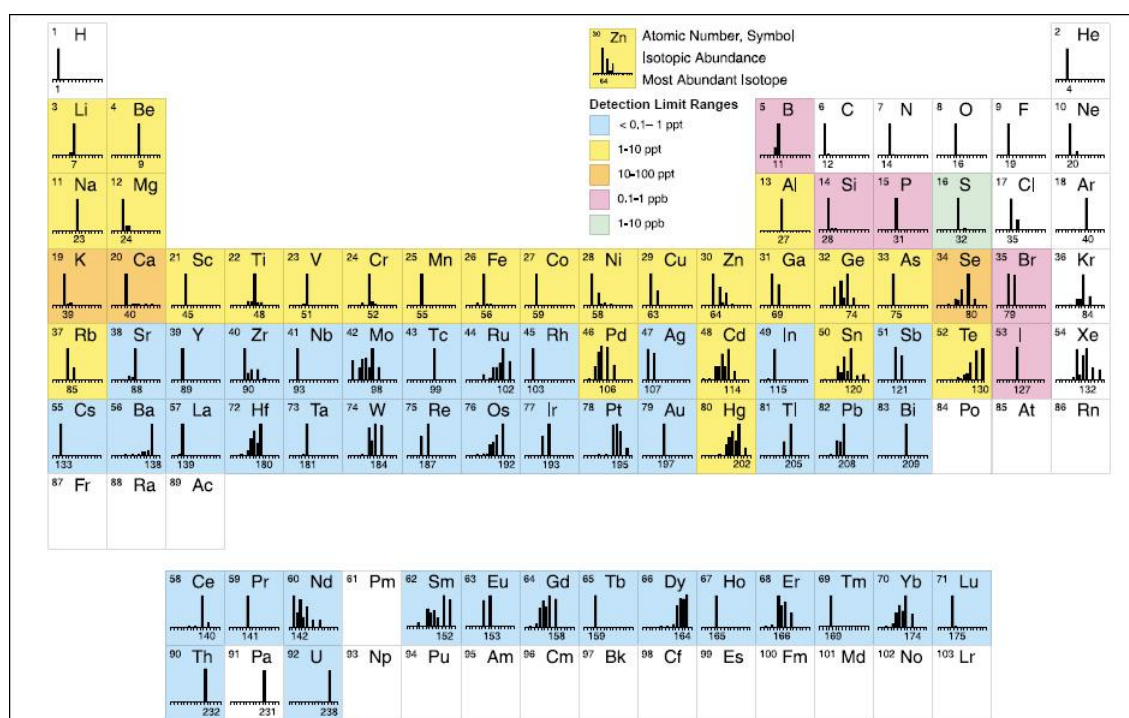


Figura 2.1- Elementos que podem ser determinados por ICP-MS e capacidade de detecção aproximada [9].

O espectrómetro de massa acoplado a plasma indutivo, ICP-MS, foi desenvolvido no final dos anos oitenta com a finalidade de aliar a simplicidade de um sistema de introdução de amostra e rapidez de análise de um ICP, à exactidão e baixos limites de detecção de um espectrómetro de massa. Desta combinação resultou um equipamento capaz de efectuar uma análise de vestígios multi-elementar [9].

A técnica encontra aplicações em diversas áreas incluindo efluentes, materiais geológicos, nas indústrias alimentar e farmacêutica, e na área da medicina (análises clínicas e biológicas como sangue e urina, e ainda no campo da medicina forense). O ICP-MS tem vindo a ser acoplado a uma larga variedade de técnicas de separação

incluindo a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), electroforese capilar e cromatografia gasosa para algumas aplicações especiais tais como a determinação de Se (IV) e Se (VI), metil mercúrio, As (III) e As (V). Uma aplicação muito importante desta técnica, na área da geologia e em aplicações nucleares, é o cálculo de razões isotópicas, dado que se podem determinar em simultâneo os diferentes isótopos de um elemento [9, 10, 11].

Os principais componentes de um espectrómetro de massa acoplado a plasma indutivo estão representados na figura seguinte:

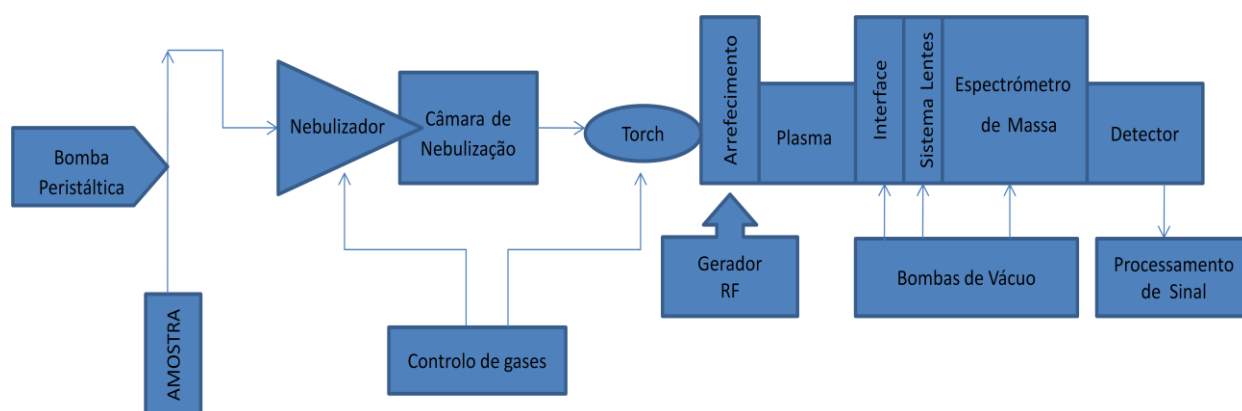


Figura 2.2 – Diagrama de blocos esquemático de um Espectrómetro de Massa Acoplado a Plasma Indutivo [5].

O método consiste na introdução da amostra a analisar, por acção de uma bomba peristáltica, num plasma de uma determinada radiofrequência. Os processos de transferência de energia causam dissolução, atomização e ionização dos elementos. A extracção dos iões do plasma é feita através de uma interface em vácuo com um sistema de iões integrado e a sua separação é feita com base na razão massa/ carga por um espectrómetro de massa (quadropolo) [6].

2.2.1 - PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UM ICP-MS

2.2.1.1- Sistema de Introdução da Amostra

O sistema de introdução da amostra de um ICP-MS é constituído por uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de nebulização, como ilustrado na figura 2.3. A amostra é introduzida no nebulizador por acção da bomba peristáltica que assegura uma velocidade constante de fluxo, normalmente a cerca de 1 mL/min. No nebulizador, a solução líquida é convertida num *aerosol* (figura 2.4) por acção de um fluxo de gás constante (por exemplo árgon a $\sim 1\text{L/min}$); na câmara de nebulização (arrefecida a cerca de 4°C pelo efeito de *Peltier*), as pequenas partículas de *aerosol* passam para o plasma por intermédio do gás de arraste, o árgon, e as partículas de maior dimensão são drenadas para o esgoto [12, 13].

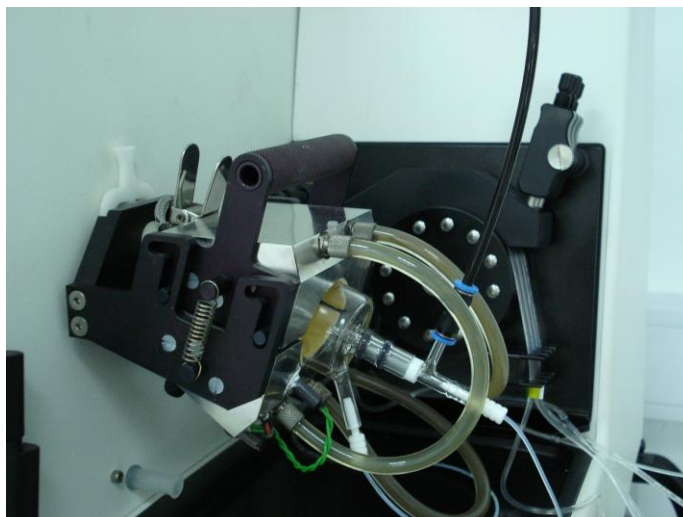


Figura 2.3 – Sistema de introdução da amostra: bomba peristáltica, nebulizador e câmara de nebulização.

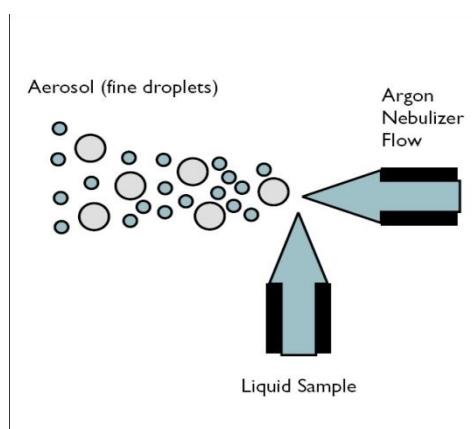


Figura 2.4 – Processo de formação do *aerosol* num nebulizador para ICP-MS [13].

2.2.1.2- Fonte de excitação – O PLASMA

A "torch" gera o plasma que funciona como fonte de iões do ICP-MS. O plasma gerado promove uma zona de elevada temperatura que iguala a temperatura da superfície solar. O plasma é uma pequena nuvem quente de gás árgon, composto por uma mistura de átomos, iões e electrões a uma temperatura muito elevada, entre 6000 e 10000 K. O gás encontra-se parcialmente ionizado (aproximadamente 1 %). É gerado fazendo passar o árgon através de uma série de tubos concêntricos (a "torch") e acondicionados no final por uma radiofrequência (RF) "coil" [5, 9].

A "torch", indicada na figura 2.5, é composta por três tubos concêntricos, normalmente feitos de quartzo: o tubo mais externo, o tubo do meio e o tubo injector da amostra.

O árgon é normalmente usado como gás nebulizador (gás de introdução da amostra), gás auxiliar e gás do plasma, e deve ter preferencialmente uma pureza superior a 99,995 %. O gás auxiliar circula entre o tubo de introdução da amostra e o tubo do meio a um caudal entre 0 e 3 L/min. Este gás tem como função o aumento da separação entre o plasma e a "torch", reduzindo assim a temperatura na extremidade do tubo injector, o que evita a deposição de matéria dissolvida no mesmo. O gás do plasma circula entre o tubo do meio e o tubo mais externo com um caudal de cerca de 12 a 20 L/min (figura 2.6). A sua função é manter o plasma e arrefecer o tubo mais externo da "torch". O gás nebulizador transporta a amostra sob a forma de um fino *aerosol* desde o tubo injector da amostra, e circula a cerca de 1 L/min. [5, 14].

Em volta do topo da "torch" encontra-se um "coil" arrefecido a água ou árgon, normalmente feito de cobre, com dois até cinco enrolamentos. Uma corrente de alta frequência circula no "coil" e excita o plasma. Um gerador distribui uma corrente alternada com uma frequência entre 27 e 56 MHz e uma potência de 0,6 a 2 KW que sustenta o plasma. A radiofrequência (RF) aplicada ao "coil" produz um campo magnético dentro do plasma, originando um movimento anular dos iões e electrões [5, 9].

Durante o seu percurso no plasma, as gotículas de líquido contendo a matriz da amostra e os elementos a determinar são secas (remoção das moléculas de água), convertidas em pequenas partículas sólidas, e em seguida aquecidas até ao estado gasoso. À medida que os átomos viajam pelo plasma, tendem a absorver mais energia do plasma e, eventualmente, podem libertar um electrão para formar um ião com carga unitária que sai do plasma e entra na região da interface. O processo de conversão das gotículas em iões encontra-se esquematizado na figura 2.7 [9, 14].

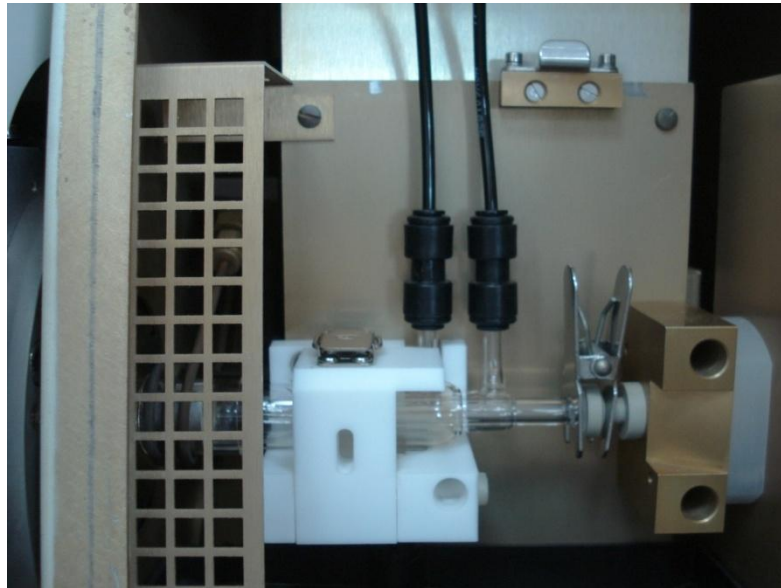


Figura 2.5 – A "Torch": gerador de iões; é formada por três tubos concêntricos de quartzo.

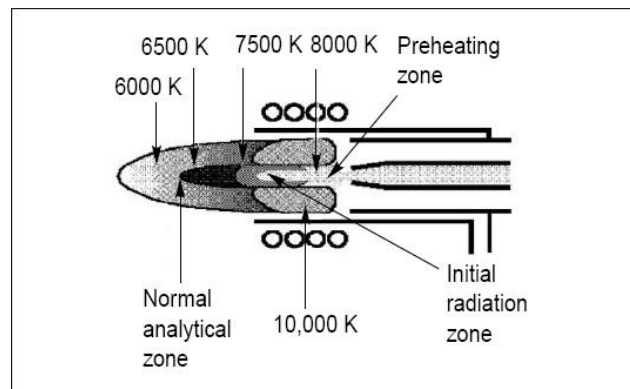


Figura 2.6 – Diferentes zonas de temperatura no plasma [14].

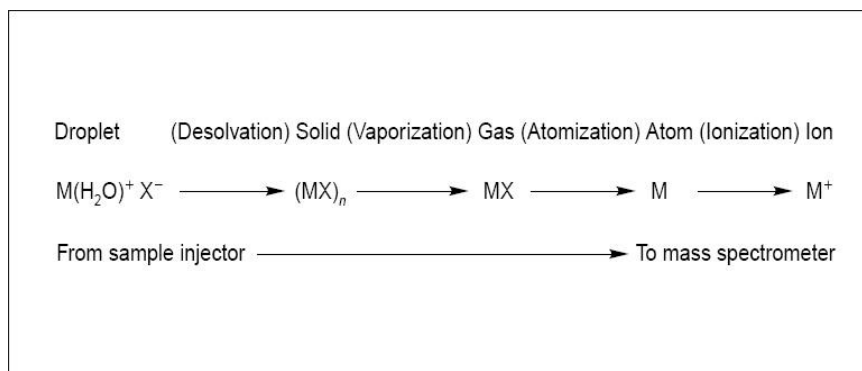


Figura 2.7 – Mecanismo de conversão de uma gotícula a um ião positivo no ICP-MS [14].

2.2.1.3- Interface

Os iões produzidos no plasma são extraídos do ambiente de alta temperatura e à pressão atmosférica (760 Torr) para uma "caixa" de alto vácuo (a $\sim 10^{-6}$ Torr) através de uma interface constituída por duas aberturas milimétricas sequenciais, os cones: "sampler" e "skimmer" [9, 15].

O "sampler" posiciona-se perto da fonte do plasma e é tipicamente feito de níquel devido à sua elevada condutividade térmica e relativa resistência à corrosão. O diferencial de pressão criado por este cone é tal que os iões provenientes do plasma bem como o gás do plasma são direccionados para a região de baixa pressão através do pequeno orifício do cone, com cerca de 0,8 a 1,2 mm de diâmetro. A região por detrás do "sampler" é mantida a uma pressão moderada de $\sim 2,5$ mbar usando uma bomba de vácuo mecânica. O segundo cone, o "skimmer", é colocado a uma curta distância do "sampler" e tem normalmente um orifício com um diâmetro entre 0,4 a 0,8 mm, sendo também normalmente feito de níquel. A pressão por detrás deste cone é mantida a $\sim 10^{-4}$ mbar [10, 15].

Para reduzir os efeitos da elevada temperatura do plasma nos cones, o compartimento onde se encontra a interface é arrefecido com água e feito de um material que dissipa o calor com facilidade, tal como o cobre ou o alumínio [15]. A figura 2.8 mostra uma vista detalhada dos cones.

Dado que os processos de atomização/ ionização ocorrem à pressão atmosférica, a interface torna-se crucial no processo de criação de um ambiente de vácuo para o sistema MS. É formado um jacto supersónico e os iões passam para o sistema MS a alta velocidade expandindo-se no sistema de vácuo. A expansão tem lugar à medida que os iões passam do "sampler" para o "skimmer", tal como representado na figura 2.9 [15]. Colimados por um conjunto de lentes iónicas e separados de acordo com a sua razão massa/ carga no espectrómetro de massa (quadropolo), os iões são detectados por um detector [9].

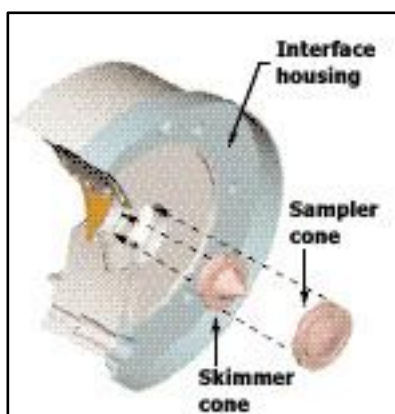


Figura 2.8 – Vista detalhada dos cones: "sampler" e "skimmer" [15].

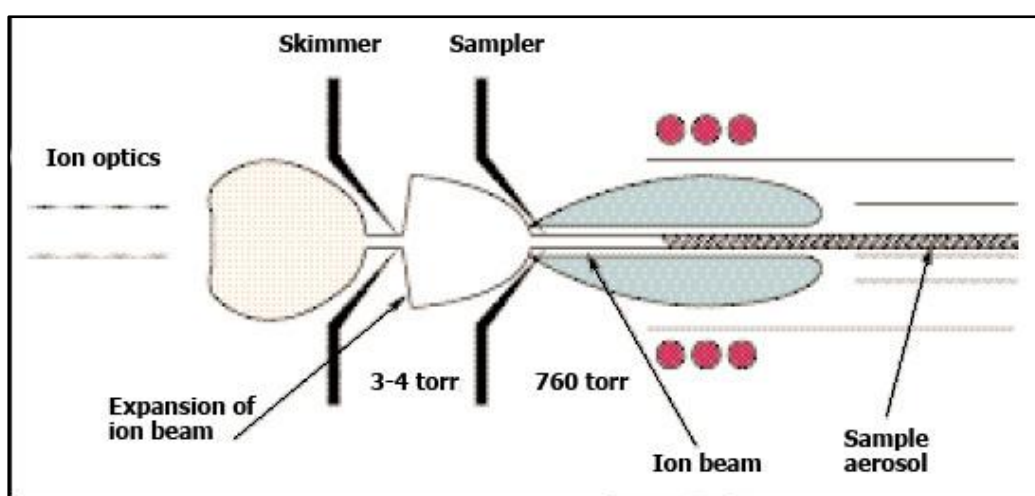


Figura 2.9 – Diagrama esquemático da interface de um ICP-MS [15].

2.2.1.4- Sistema de Lentes

O sistema de lentes representa uma parte crucial do equipamento, na medida em que é neste sistema que o feixe iónico é focado antes de entrar no espectrómetro de massa. O problema inerente reside no facto de o ICP-MS ser relativamente ineficiente: apenas um em cada milhão de iões gerados no plasma atinge o detector. Um dos factores que mais contribui para esta baixa eficiência é a elevada concentração de elementos de matriz comparativamente com os analitos, provocando assim um desvio dos iões na sua trajectória e alterando as características de transmissão do feixe iónico. Este fenómeno é por vezes designado por **efeito de carga espacial**, e pode ser particularmente severo nos casos em que os iões de matriz possuam uma massa bastante mais pesada que a dos iões do analito [5, 16]. Quando ocorre a expansão do

feixe iónico, os iões mais leves migram para o exterior do plasma, sendo deste modo menos eficientemente focados para o espectrómetro de massa. De um modo geral, os problemas mais graves dos efeitos de matriz são os que ocorrem quando estamos em presença de uma matriz de amostra com um excesso de iões de massa pesada ou elementos facilmente ionizáveis, que causam normalmente supressão do sinal dos analitos, embora possa ocorrer em alguns casos o efeito contrário, ou seja, um aumento do sinal [17].

O sistema óptico está localizado entre o "skimmer" e o espectrómetro de massa (figura 2.10), e consiste numa lente de iões controlada electrostaticamente, por exemplo um cilindro metálico ou uma chapa metálica com um orifício, ou numa série de lentes iónicas unidas. A sua função principal é a de remover os iões do ambiente do plasma à pressão atmosférica através da interface, e transmiti-los eficientemente para o espectrómetro de massa que se encontra em alto vácuo. Tem também a função de evitar que as espécies neutras e fotões atinjam o detector. Este tipo de partículas, removidas pelas bombas de vácuo, causaria um aumento da instabilidade do sinal, o que contribuiria para um aumento do ruído de fundo e a consequente degradação da capacidade de detecção do detector. A selecção das espécies positivas é feita por aplicação de um potencial ao conjunto de lentes [5, 16].

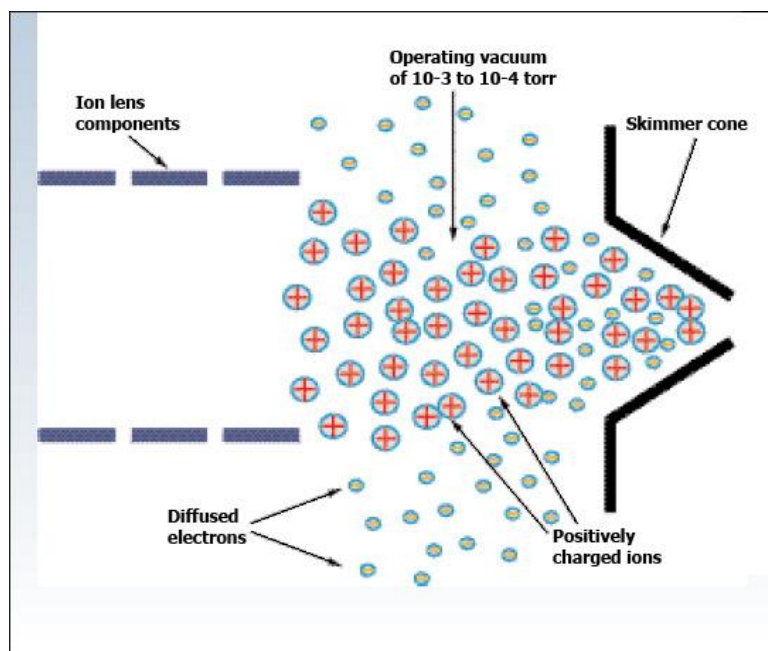


Figura 2.10 – A queda de pressão no sistema óptico produz uma difusão dos electrões, resultando num feixe iónico com carga positiva [16].

2.2.1.5- Espectrómetro de Massa (MS) – QUADROPOLO

O espectrómetro de massa separa os iões de interesse através da sua razão massa/ carga, actuando como um filtro de massas. O quadropolo é o tipo mais usado em instrumentos analíticos de rotina e está localizado num compartimento em vácuo ($< 2 \times 10^{-3}$ Pa). É constituído por quatro "rods" paralelas de aproximadamente 20 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro onde é aplicada uma corrente contínua (DC) e um potencial de radiofrequência (RF) [5, 9].

Os iões são introduzidos no eixo central e no início dos "rods". O princípio de actuação do quadropolo baseia-se numa combinação específica de determinada corrente (DC) e amplitude de radiofrequência (RF) adequadas de modo a permitir a passagem dos iões com uma determinada massa/ carga e com determinada largura de banda. Todos os iões com valor mais baixo ou mais elevado de m/z são desviados, batendo nos "rods" e neutralizados [9]. Na figura 2.11 apresenta-se um exemplo simplificado do modo de actuação do quadropolo. O analito (a preto) e quatro outros iões (coloridos) chegam à entrada dos quatro "rods" do quadropolo, e, quando uma determinada voltagem RF-DC é aplicada, os iões positivos e negativos constituintes dos "rods" vão direccionar electrostaticamente o ião do analito em interesse por entre os quatro "rods", mantendo a sua trajectória ao longo do quadropolo, onde será posteriormente convertido em pulsos eléctricos no detector. Os restantes iões com diferentes razões massa/ carga, para aquela voltagem aplicada, vão passar pelos espaços entre os "rods" e vão ser desviados do quadropolo. Este processo de "scan" é repetido para os restantes analitos com outras razões massa/ carga até ser efectuada uma análise multielementar da amostra [18].

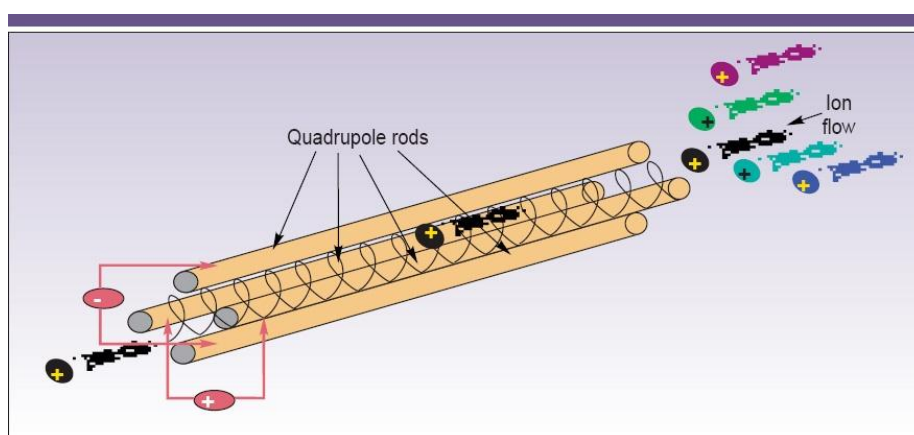


Figura 2.11 – Princípio de separação de massa do quadropolo do ICP-MS [18].

Uma característica importante do quadropolo é a sua capacidade de separar o pico de um analito de uma interferência espectral, a que se dá o nome de **resolução** (R) e que é traduzida pela seguinte equação:

$$R = m / \Delta m$$

Onde m é a massa nominal à qual o pico ocorre e Δm é a diferença de massa entre dois picos. No quadropolo, a resolução é tipicamente definida como a largura do pico a 10% da sua altura. Este valor é tipicamente de 0,7 amu (unidades de massa atómica). Uma outra característica é a **sensibilidade**, que é definida como a contribuição do sinal de um pico adjacente a um valor de massa mais alto (M+1) ou mais baixo (M-1) que o pico do analito (M) [5, 18]. Esta característica assume um papel muito importante em ICP-MS, já que a análise de traços tem lugar num elevado ruído de fundo (background), as impurezas maioritárias, ou seja, os componentes da matriz da amostra [9]. Valores de 10^4 para as massas mais baixas e 10^6 para as mais pesadas são frequentemente obtidos em análises de rotina [5].

2.2.1.6- Detector

O sistema de detecção de um ICP-MS efectua a contagem dos iões que emergem do espectrómetro de massa. O detector converte os iões em pulsos eléctricos, que são posteriormente contabilizados pelo circuito integrado. A magnitude dos pulsos eléctricos corresponde ao número de iões de analito presentes na amostra [19].

O tipo de detector mais usado na análise de elementos traço em ICP-MS é o multiplicador de iões devido à sua elevada eficiência de conversão iónica em sinais eléctricos. O sistema de detecção deste tipo de detectores consiste num eléctrodo (conversor diánodo), num multiplicador de electrões com diánodos discretos e num pré-amplificador. À superfície activa do detector dá-se o nome de diánodo [5, 9]. O multiplicador de electrões deve operar em condições de vácuo ($< 5 \times 10^{-5}$ Torr) [10].

Sob a influência de uma voltagem negativa elevada, os iões que abandonam o espectrómetro de massa atingem a superfície do diánodo conversor resultando assim na libertação de electrões, que são duplicados quando são libertados. Os iões positivos atraídos ao primeiro diánodo originam um rápido aumento de electrões, iniciando assim um processo de amplificação. Os electrões libertados do primeiro diánodo atingem a superfície do segundo onde são libertados mais electrões, e assim sucessivamente. Os sucessivos diánodos apresentam voltagens progressivamente mais baixas. Um ião resulta num pulso de aproximadamente 10^8 electrões [5, 9]. O pulso de electrões é

processado usando um rápido pré-amplificador e contabilizado em termos de número de iões ou “contagens por segundo” [9, 10].

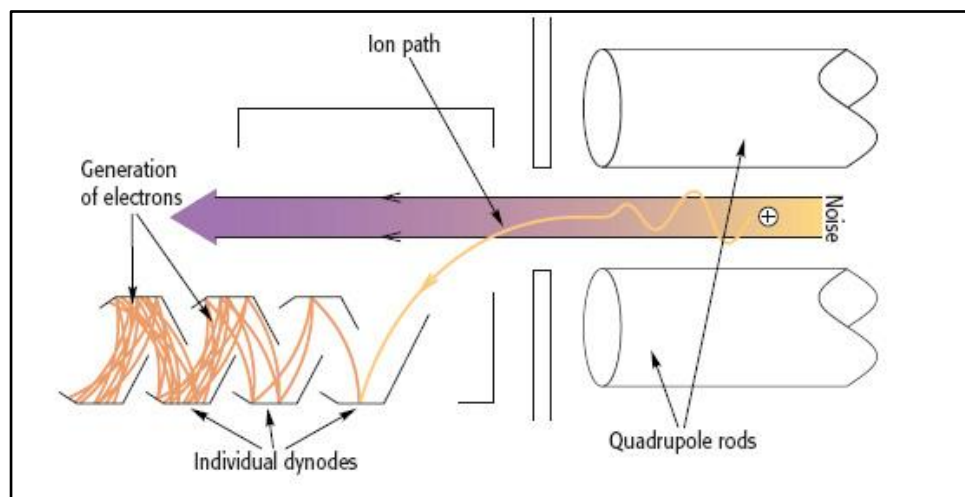


Figura 2.12 – Representação esquemática de um diânode multiplicador de electrões [19].

O multiplicador de electrões tem um tempo de vida limitado, determinado pelo total de carga acumulado [10]. O máximo de contagens no sistema é de entre 2×10^6 a 4×10^6 cps (contagens ou pulsos por segundo) e é determinado por dois factores: o fluxo de corrente que o detector consegue suportar, e que é limitado, e o “*dead time*” do mesmo, isto é, o intervalo de tempo durante o qual após um registo de sinal o detector não está disponível para um novo pulso [5].

O ruído de fundo deste tipo de detector é muito baixo, normalmente 1 cps ou inferior. O tempo de vida do detector é de aproximadamente 1 a 2 anos. Durante este período a sensibilidade vai diminuindo lentamente, sendo necessário um aumento progressivo da voltagem de forma a restabelecer a sensibilidade original [5].

O sinal do detector é medido em dois locais diferentes: no modo “*analog*” para amostras concentradas e no modo “*pulse-counting*” para amostras de baixa concentração. No modo “*analog*” é aplicada uma voltagem mais baixa de modo a reduzir a sensibilidade do detector, aumentando conseqüentemente a gama de concentrações em que o sinal dos iões pode ser medido. No modo “*pulse-counting*” é aplicada uma voltagem que promove uma maior sensibilidade de detecção para elementos presentes a baixos níveis de concentração. O modo “*pulse-counting*” é tipicamente linear do zero até cerca de 10^6 cps, e o modo “*analog*” é linear de 10^4 até 10^9 cps. Para normalizar estas duas gamas, é necessário efectuar uma “*cross calibration*” do detector ao longo de todo o espectro de massa de modo a cobrir estes dois níveis de concentrações [19].

2.2.1.7- Registo de Dados

O equipamento possui um computador integrado que controla e monitoriza o instrumento e processa os resultados. O processamento de dados inclui a obtenção da recta de calibração, concentração *versus* contagens por segundo, para cada um dos elementos analisados, sendo a concentração das amostras obtida por interpolação linear. O software do equipamento disponibiliza também o espectro de massa para cada amostra analisada desde o ${}^6\text{Li}$ até ao ${}^{238}\text{U}$.

2.2.2- PARÂMETROS DE AQUISIÇÃO

No quadropolo as medições são feitas em pontos discretos da gama de massas, desde o ${}^6\text{Li}$ ao ${}^{238}\text{U}$. A gama completa de massas está dividida em 5000 pontos ou canais (20 pontos por massa), e normalmente é efectuado um "scan", ao longo do intervalo de massas, na análise de uma amostra. Durante um "scan", algumas partes da gama de massas podem não ser lidas, sendo apenas analisadas as massas de interesse por meio do modo "peak- jump". Este modo é usado em análise quantitativa, onde se passa de uma leitura de uma massa seleccionada para a massa seleccionada seguinte. O modo de leitura em que se faz o varrimento de todas as massas do espectro é designado por "scanning", que é normalmente usado para obter informação relativa à composição da amostra (análise qualitativa), sobretudo no que diz respeito a possíveis interferências presentes, tais como os componentes maioritários da matriz [5, 20].

O modo "peak- jump" tem quatro parâmetros essenciais a otimizar:

- Sweep: número de vezes em que se faz o varrimento das massas seleccionadas (da mais leve para a mais pesada).
- Dwell Time: é o tempo gasto em ms (mili- segundos) na recolha de contagens (cps) na massa do analito; pode ser diferente de massa para massa, consoante a abundância do analito.
- Settling Time: é o tempo de estabilização do quadropolo antes de efectuar a aquisição.
- Channels: diferentes pontos em torno do centro nominal do pico em que pode ser feita a aquisição num determinado pico de massa.

O *tempo total de aquisição* numa determinada massa é a soma dos tempos gastos no número de *sweeps*, no *dwell time* e no número de canais lidos nessa massa [5, 20, 21].

2.2.3 – INTERFERÊNCIAS

A presença de elementos concomitantes nas amostras pode causar interferências, como por exemplo erros sistemáticos na medida do sinal. As interferências podem ser classificadas em dois grupos: espectrais e não- espectrais.

As interferências espectrais têm influência no sinal do analito, causando um desvio positivo paralelo na sua função analítica quando não são separadas do pico de massa do analito. São causadas por iões mono ou poliatômicos que possuam a mesma razão massa/ carga (m/z) que os iões do analito. As interferências não- espectrais, normalmente designadas por efeitos de matriz, alteram o declive da função analítica, o que resulta em alterações na sensibilidade devido a variações na composição das soluções [5].

De um modo geral, no sentido de diminuir interferências físicas e espectrais, o teor de matéria dissolvida não deve exceder 2 g/L [6].

2.2.3.1- Interferências Espectrais

2.2.3.1.1- Poliatómicas ou Moleculares

As sobreposições espectrais são provavelmente o tipo de interferências mais problemáticas em ICP-MS. Entre elas destacam-se as *poliatômicas* ou *moleculares* que são produzidas pela combinação de dois ou mais iões monoatômicos. São causadas por uma variedade de factores, mas estão normalmente associadas quer ao plasma quer ao gás nebulizador usado, aos componentes de matriz presentes na amostra e no solvente, a outros analitos presentes na amostra ou ao oxigénio e ao nitrogénio proveniente de uma possível entrada do ar circundante.

Num plasma de árgon as sobreposições espectrais causadas pelos iões de árgon e pelas suas combinações com outras espécies são bastante comuns. O isótopo mais abundante do árgon é o da massa 40, que interfere dramaticamente com o isótopo mais abundante do cálcio na mesma massa. A combinação do árgon com o oxigénio numa amostra aquosa gera o interferente óxido de árgon, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$, que tem influência significativa no isótopo mais abundante do ferro na massa 56 [22]. A complexidade deste tipo de problemas espectrais é demonstrada na figura 2.13.

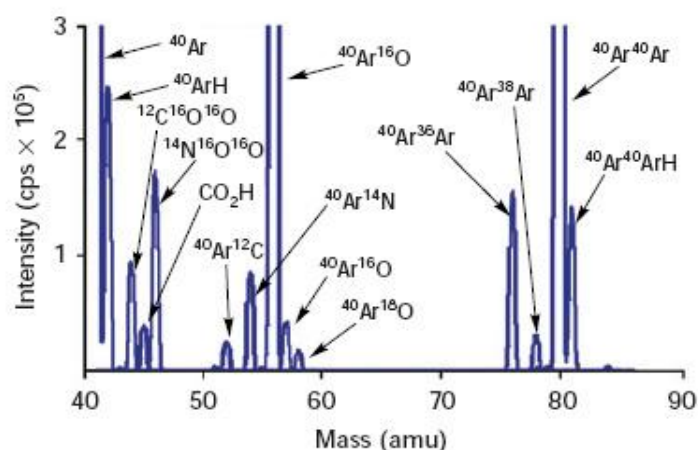


Figura 2.13- Espectro de massa da água desionizada desde a massa 40 até à 90 [22].

De modo semelhante, o árgon pode formar interferências poliatômicas com alguns elementos presentes nos ácidos usados na dissolução das amostras. Por exemplo, em meio clorídrico, o ^{40}Ar combina-se com o isótopo mais abundante do Cloreto na massa 35 para formar o $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ que interfere com o único isótopo existente do arsénio na massa 75. Em matrizes com solventes orgânicos, o árgon e o carbono combinam-se para formar o $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ que interfere no isótopo mais abundante do crómio, o ^{52}Cr . Por vezes, as espécies presentes nas matrizes e nos solventes combinam-se entre si, não necessitando portanto da ajuda do árgon, para formar interferências espectrais como no caso do isótopo ^{32}S que se combina com dois iões de oxigénio para formar o ião molecular $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$, que interfere no isótopo mais abundante do zinco na massa 64. Na análise de amostras contendo altas concentrações de sódio, como no caso das águas do mar, o isótopo mais abundante do cobre na massa 63 não pode ser usado devido à interferência do ião molecular $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$. Alguns exemplos deste tipo de interferências poliatômicas e moleculares estão representados na tabela 2.3:

Tabela 2.3: Exemplos de Interferências Poliatômicas encontradas em ICP-MS [22].

Elemento/ Isótopo	Matriz/ Solvente	Interferente
³⁹ K	H ₂ O	³⁸ ArH
⁴⁰ Ca	H ₂ O	⁴⁰ Ar
⁵⁶ Fe	H ₂ O	⁴⁰ Ar ¹⁶ O
⁸⁰ Se	H ₂ O	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar
⁵¹ V	HCl	³⁵ Cl ¹⁶ O
⁷⁵ As	HCl	⁴⁰ Ar ³⁵ Cl
²⁸ Si	HNO ₃	¹⁴ N ¹⁴ N
⁴⁴ Ca	HNO ₃	¹⁴ N ¹⁴ N ¹⁶ O
⁵⁵ Mn	HNO ₃	⁴⁰ Ar ¹⁵ N
⁴⁸ Ti	H ₂ SO ₄	³² S ¹⁶ O
⁵² Cr	H ₂ SO ₄	³⁴ S ¹⁶ O
⁶⁴ Zn	H ₂ SO ₄	³² S ¹⁶ O ¹⁶ O
⁶³ Cu	H ₃ PO ₄	³¹ P ¹⁶ O ¹⁶ O
²⁴ Mg	Orgânica	¹² C ¹² C
⁵² Cr	Orgânica	⁴⁰ Ar ¹² C
⁶⁵ Cu	Mineral	⁴⁸ Ca ¹⁶ OH
⁶⁴ Zn	Mineral	⁴⁸ Ca ¹⁶ O
⁶³ Cu	Água do Mar	⁴⁰ Ar ²³ Na

2.2.3.1.2- Óxidos, Hidróxidos, Hidretos e Espécies com Dupla Carga

Outro tipo de interferência espectral é a produzida por elementos existentes na amostra e que se combinam com H, ¹⁶O ou ¹⁶OH (proveniente da água ou do ar) para formar iões hidreto (H), óxidos (¹⁶O) e hidróxidos (¹⁶OH) moleculares, que ocorrem em unidades de massa 1, 16 e 17 mais elevadas do que as respectivas massas dos elementos.

Estas interferências são normalmente produzidas nas regiões mais frias do plasma, mesmo antes da interface. São mais problemáticas quando estão presentes elementos raros ou refractários na amostra, já que muitos deles formam rapidamente espécies moleculares, sobretudo óxidos, criando assim sobreposições espectrais noutros elementos do mesmo grupo.

Associadas às sobreposições de óxidos estão as interferências espectrais com dupla carga. Estas espécies são formadas quando um ião é gerado com dupla carga positiva. Tal como a formação de óxidos, o nível de espécies com dupla carga está relacionado com as condições de ionização no plasma, e podem ser minimizadas pela optimização do caudal de gás do nebulizador e "RF power" [22]. Alguns exemplos preocupantes deste tipo de interferência, incluem a formação de espécies com dupla carga de Ce, La, Sr, Th e Ba [10].

Na tabela 2.4 estão representados alguns elementos que formam rapidamente óxidos, hidróxidos, hidretos e espécies com dupla carga em conjunto com os analitos que são afectados por eles [22].

Tabela 2.4: Alguns elementos que formam óxidos, hidróxidos, hidretos ou espécies com dupla carga no plasma e respectivos analitos afectados [22].

Óxido/ Hidróxido/ Hidreto/ Espécie com dupla carga	Analito
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$	^{56}Fe
$^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}$	^{64}Zn
$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$	^{114}Cd
$^{138}\text{Ba}^{16}\text{O}$	$^{154}\text{Sm}, ^{154}\text{Gd}$
$^{139}\text{La}^{16}\text{O}$	^{155}Gd
$^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}$	$^{156}\text{Gd}, ^{156}\text{Dy}$
$^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}$	^{57}Fe
$^{31}\text{P}^{18}\text{O}^{16}\text{OH}$	^{66}Zn
^{79}BrH	^{80}Se
$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2\text{H}$	^{64}Zn
$^{138}\text{Ba}^{2+}$	^{69}Ga
$^{139}\text{La}^{2+}$	^{69}Ga
$^{140}\text{Ce}^{2+}$	$^{70}\text{Ge}, ^{70}\text{Zn}$

2.2.3.1.3- Interferências Isobáricas

As interferências isobáricas são causadas por isótopos de diferentes elementos com a mesma razão massa/ carga nominal e que não podem ser separados devido a uma resolução insuficiente do espectrómetro de massa em causa (por exemplo ^{114}Cd e ^{114}Sn) [6, 23].

2.2.3.1.4- Estratégias de Redução de Interferências Espectrais

Algumas estratégias de eliminação de iões poliatómicos incluem:

- A redução da quantidade de água do plasma possibilita uma redução do nível de óxidos, o que pode ser atingido por meio do arrefecimento da câmara de nebulização entre 2 a 5 °C (*efeito de Peltier*).
- A minimização da concentração de cloretos na solução a analisar passa pela eliminação do uso do HCl. A acidificação das amostras e as suas digestões devem ser feitas com HNO_3 .

- Optimização de algumas condições instrumentais tais como: "RF power", caudal do gás de introdução da amostra (gás nebulizador), velocidade de introdução da amostra, distância entre a "torch" e os cones ("sampler"), no sentido de maximizar a razão sinal do analito/ sinal do interferente.
- Uso de equações elementares para correcção de interferências.
- Uso de uma célula de colisão.
- Uso de um ICP-MS de alta resolução [5].

Um modo de compensar interferências isobáricas e algumas poliatómicas menos severas, sempre que não exista um isótopo alternativo para quantificação do elemento, é o uso de equações matemáticas de correcção de interferentes [22].

O uso de equações elementares para correcção de interferências baseia-se no princípio de que o número de iões moleculares (e com dupla carga) formado é uma fracção fixa do número de iões precursores ⁽¹⁾ presentes no plasma, independentemente de variações da composição da solução e de pequenas variações das condições do plasma. Por exemplo, o número de iões ClO⁺ (que interferem com o ⁵¹V⁺ e ⁵³Cr⁺) formados é uma fracção fixa do número de iões Cl⁺ (o ião precursor). Medindo o sinal do ião ClO⁺ na massa 51, e o dos iões Cl⁺ na massa 35 de uma solução padrão de cloretos, e dividindo os dois valores, podemos calcular o factor de interferentes *f*. Para uma amostra desconhecida, a interferência do iões ClO⁺ pode ser calculada medindo o sinal do ³⁵Cl⁺ e multiplicando por *f*. Para obtenção do sinal corrigido do ⁵¹V, a interferência do ClO⁺ é subtraída ao sinal da massa 51 de acordo com a equação seguinte:

$$I_{(51V)} = I_{(51)} - f \times I_{(35Cl)}$$

onde *I* é a intensidade do sinal para a massa ou isótopo mencionado [5].

No caso de interferências isobáricas, como a do interferente ¹¹⁴Sn com o ¹¹⁴Cd, o factor de correcção pode ser calculado a partir das abundâncias dos isótopos envolvidos [5]. O isótopo mais sensível do cádmio é o de massa 114. Contudo, existe um isótopo de estanho com baixa percentagem de abundância na mesma massa, o que significa que se houver algum estanho na amostra, a quantificação do cádmio na massa 114 só pode ser efectuada com o uso da correcção feita para o ¹¹⁴Sn. Como o Sn tem um total de dez isótopos, existe uma grande probabilidade de um deles estar livre de interferências espectrais. Deste modo, medindo a intensidade de um dos seus isótopos mais abundantes, o ¹¹⁸Sn, e relacionando-o com o ¹¹⁴Sn, podemos encontrar uma equação de correcção do seguinte modo:

$$\text{Total de contagens na massa 114} = {}^{114}\text{Cd} + {}^{114}\text{Sn}$$

$$^{114}\text{Cd} = \text{total de contagens na massa 114} - ^{114}\text{Sn}$$

Para determinar a contribuição do ^{114}Sn , é medida a interferência no isótopo livre do ^{118}Sn e uma correção da razão $^{114}\text{Sn}/^{118}\text{Sn}$ é aplicada:

$$^{114}\text{Cd} = \text{total de contagens na massa 114} = (^{114}\text{Sn}/^{118}\text{Sn}) \times (^{118}\text{Sn})$$

A razão ($^{114}\text{Sn}/^{118}\text{Sn}$) é a relação das abundâncias naturais destes dois isótopos (0,65%/24,23%) e é sempre constante. Então:

$$^{114}\text{Cd} = \text{total de contagens na massa 114} - (0,65\%/24,23\%) \times (^{118}\text{Sn})$$

$$^{114}\text{Cd} = \text{total de contagens na massa 114} - (0,0268) \times (^{118}\text{Sn})$$

Este é um exemplo relativamente simples, mas que explica os princípios básicos do processo [22].

Na tabela 2.5 apresentam-se alguns exemplos de equações de correção para alguns isótopos de acordo com a norma ISO 17294-2.

Tabela 2.5: Equações de correção para alguns isótopos recomendados pela ISO 17294-2 [6].

ELEMENTO	ISÓTOPO RECOMENDADO	EQUAÇÃO DE CORRECÇÃO
As	^{75}As	-3,127 (^{77}Se - 0,815 ^{82}Se) ou -3,127 (^{77}Se + 0,3220 ^{78}Se)
Ba	^{138}Ba	-0,0009008 ^{139}La - 0,002825 ^{140}Ce
Cd	^{114}Cd	-0,02684 ^{118}Sn
Ge	^{74}Ge	-0,1385 ^{82}Se
In	^{115}In	-0,01486 ^{118}Sn
Mo	^{98}Mo	-0,1106 ^{101}Ru
Ni	^{58}Ni	-0,04825 ^{54}Fe
Pb	^{208}Pb	+ ^{207}Pb + ^{206}Pb
Se	^{82}Se	-1,009 ^{83}Kr
Sn	^{120}Sn	-0,01344 ^{125}Te
V	^{51}V	-3,127(^{53}Cr - 0,1134 ^{52}Cr)
W	^{184}W	-0,001242 ^{189}Os

2.2.3.2- Interferências Não- Espectrais

As interferências não- espectrais, ou efeitos de matriz, podem ter origem em diferentes processos ou localizações: no processo de nebulização, no plasma, na região da interface ou na área das lentes. O efeito resultante é uma perda de sensibilidade nalguns elementos, isto é, uma supressão do sinal do analito. Este tipo de interferências inclui o entupimento do nebulizador, do tubo injector da tocha, e dos cones ("*sampler*") causados por uma elevada concentração de matéria dissolvida ou pela nebulização de solventes orgânicos [5, 10].

No caso da matéria orgânica, este tipo de interferências deve-se normalmente a diferenças de viscosidade das amostras e do solvente aspirado [22]. As diferenças de viscosidade, tensão superficial e densidade entre as amostras e as soluções de calibração, causadas por diferenças na quantidade e tipo de matéria dissolvida, tipo ou concentração de ácidos, podem produzir alterações na velocidade de introdução da amostra, eficiência da nebulização e na distribuição de partículas por tamanho do aerossol. As diferenças de temperatura entre diferentes soluções podem produzir efeitos semelhantes. O uso de uma bomba peristáltica pode reduzir os efeitos causados por diferenças na velocidade de distribuição das soluções [5].

No plasma, as matrizes podem causar uma alteração no grau de ionização de alguns elementos, sobretudo no caso de elementos como por exemplo o Cd, Zn, As, Se, Hg, etc., que possuem uma elevada energia de 1ª ionização, e que são incompletamente ionizados no plasma. Elementos com um potencial de ionização inferior a 8 eV são quase completamente ionizados (mais do que 90%) e irão, por conseguinte, sofrer menos efeitos de matriz. Na maioria dos casos observa-se uma supressão do sinal do analito [5].

Na região das lentes ocorre a separação de partículas com cargas positivas e negativas (iões positivos e electrões negativos). Os iões positivos são focados pelo sistema de lentes, mas repelem-se entre si e alguns deles vão sofrer desvios na sua trajectória normal nas lentes e não atingirão o detector (efeito de carga espacial). Os iões dos elementos mais leves na presença de um elevado número de iões de elementos mais pesados vão ser mais repelidos do que na situação inversa, sofrendo deste modo mais de efeitos de matriz [5].

No sentido de reduzir as interferências não espectrais, podem ser usadas várias estratégias, como a seguir se descreve:

- A concentração e o tipo de ácido usado devem ser os mesmos nas soluções de calibração, nas amostras a analisar e na solução de lavagem aspirada entre as medições.

-
- As soluções devem ser equilibradas à temperatura ambiente sempre que sejam armazenadas a uma temperatura inferior.
 - A diluição das amostras é também uma forma de redução de interferências.
 - A optimização das condições do plasma tais como o caudal de gás nebulizador, a profundidade da "torch" e a velocidade de introdução da amostra podem reduzir os efeitos de matriz.
 - O uso da técnica do **padrão interno** constitui outro modo de redução de efeitos de matriz: uma concentração fixa de um elemento de referência, ou padrão interno, é adicionada a todas as soluções e o sinal do analito é dividido pelo sinal do elemento de referência. O princípio desta técnica assenta no facto de o sinal do padrão interno ser afectado de modo semelhante ao sinal do analito, resultando numa razão estável [5]. Esta técnica é também usada para compensar o "drift" do sinal do analito ao longo do tempo produzido pelo entupimento dos componentes da matriz que vão entupindo lentamente os orifícios dos cones. Na escolha dos padrões internos devem ter-se em conta os seguintes critérios:
 - O padrão interno não deve estar presente na amostra;
 - A matriz da amostra e o padrão interno não devem interferir um com o outro em termos de espectros;
 - Não podem ser considerados contaminantes ambientais;
 - Devem ter energia de ionização semelhante às dos elementos para se comportarem de modo semelhante no plasma;
 - Alguns exemplos de padrões internos incluem ^9Be , ^{45}Sc , ^{59}Co , ^{74}Ge , ^{89}Y , ^{103}Rh , ^{115}In , ^{169}Tm , ^{175}Lu , ^{187}Re e ^{232}Th [22].

2.3- VALIDAÇÃO DE MÉTODOS INTERNOS DE ENSAIO

O termo **validação**, de acordo com a norma ISO 9000, é a confirmação através de evidência objectiva, de que foram satisfeitos os requisitos para uma utilização ou aplicação específicas [25].

Um método de ensaio é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo assim, em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objectivos, para demonstrarem, através da validação, que os métodos de ensaio que executam, conduzem a resultados credíveis e adequados à qualidade pretendida [4].

Um método interno é por definição um método de ensaio adaptado ou modificado, cujo conteúdo técnico deriva de Normas (nacionais ou internacionais), mas que não as segue na íntegra [4].

O laboratório pode utilizar métodos internos, adaptados, desenvolvidos e adoptados pelo próprio laboratório desde que sejam adequados à utilização pretendida e devidamente validados [26].

Os requisitos mínimos para a validação de métodos internos de ensaio dependem do tipo de método em causa e compreendem o estudo e conhecimento da gama de trabalho, linearidade, limiares analíticos (detecção e quantificação), sensibilidade, precisão e exactidão. Cabe ao laboratório analisar quais os parâmetros a incluir no seu plano de validação, perante o tipo de metodologia em questão.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros por **avaliação directa** e por **avaliação indirecta** e deverá abranger pelo menos as partes ou alterações cuja validação não tenha sido feita por um organismo reconhecido (organismo de normalização ou outra organização com reconhecida credibilidade internacional no sector técnico em causa) [4].

2.3.1- AVALIAÇÃO INDIRECTA

Este tipo de validação é efectuado por determinação e evidência dos seus parâmetros característicos.

2.3.1.1- Especificidade/ Selectividade

A Selectividade é a capacidade de um método identificar e distinguir um analito em particular, numa mistura complexa, sem interferência dos outros componentes.

Um método é específico quando se pretende discriminar o analito relativamente a outras substâncias, eventualmente presentes na amostra a analisar, ou seja, quando oferece garantias que a grandeza medida provém apenas do analito. Deste modo, torna-se necessário averiguar a possível interferência de outras substâncias presentes na amostra, utilizando para o efeito uma amostra complexa (multi-componente).

A avaliação das interferências poderá ser efectuada através da utilização de testes de recuperação, utilizando uma série de amostras, com a mesma matriz, em que apenas varia a concentração do analito em proporções bem conhecidas e ao longo de toda a gama de trabalho. Um método analítico pode ser considerado aplicável (específico e selectivo) quando na prática, e após a realização de testes de recuperação, se verificar que as percentagens de recuperação são próximas de 100 %.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{massa (amostra + padrão)} - \text{massa (amostra)}}{\text{massa padrão}} \times 100$$

O êxito das percentagens de recuperação depende do tipo de metodologia praticada, isto é, se para alguns métodos se podem admitir intervalos de recuperação mais alargados, devido às próprias características dos mesmos, para outros não poderão ser tolerados grandes intervalos. Cabe ao laboratório definir critérios de aceitação relativos às percentagens de recuperação conseguidas, baseadas em dados e factos credíveis [4].

2.3.1.2- Quantificação

O analista deve apoiar-se no cálculo de vários parâmetros, entre os quais se destacam as curvas de calibração, os limiares analíticos do método de ensaio e a sensibilidade.

2.3.1.2.1- Curvas de Calibração

Numa análise quantitativa, a calibração indica um processo pelo qual a resposta de um sistema de medida se relaciona com uma concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Por preparação de uma série de soluções padrão de concentração conhecida do analito a determinar, e pela medição do sinal correspondente no equipamento analítico nas mesmas condições das amostras a analisar, estabelece-se um gráfico de calibração, sinal do equipamento em função da concentração, e determina-se a concentração do analito nas amostras por interpolação.

No caso de se usar o método dos mínimos quadrados para a regressão linear, o eixo vertical (eixo y) representa sempre a resposta instrumental do equipamento, e o eixo horizontal (eixo x) representa sempre as concentrações dos padrões, uma vez que se assume que os erros associados aos valores de x são desprezáveis face aos de y.

Os padrões de calibração devem ser distribuídos equitativamente pela gama de trabalho. O branco da calibração (solução com todos os reagentes com excepção do analito a analisar) é muitas vezes diferente de zero e deve ser incluído na curva de calibração, quando aplicável.

A forma algébrica da equação de uma recta é dada por:

$$y = a + b x$$

onde **a** representa a ordenada na origem e **b** o declive da recta.

O cálculo do coeficiente de correlação pode ser usado como um dos parâmetros a avaliar numa calibração analítica. Em análise química as rectas de calibração, dependendo do método analítico e dos critérios de aceitação internos estabelecidos pelo laboratório, devem ter valores de coeficientes de correlação superiores a 0,995 [4].

Gama de Trabalho

Quando se utiliza uma metodologia que envolve o traçado de uma curva de calibração, a gama de trabalho pode ser avaliada pelo teste de homogeneidade de variâncias. Recomenda-se o uso da ISO 8466-1 para modelos lineares e a norma ISO 8466-2 para modelos polinomiais de 2º grau [4].

Linearidade

A linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, de acordo com a norma ISO 8466-1. A partir de um conjunto de pares ordenados, calcula-se a função de calibração linear e os respectivos desvios-padrão residuais, $S_{y/x}$ e S_y , das funções de calibração linear e não linear, respectivamente:

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

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-3}} \quad \text{onde} \quad \hat{y}_i = a + b \cdot x_i + c \cdot x_i^2$$

em que:

x_i = concentração da amostra padrão;

y_i = variável de resposta para uma concentração x_i ;

\hat{y}_i = variável de resposta para o padrão de concentração x_i calculado a partir da função de calibração

N = é o número de padrões de calibração [4, 27, 28].

A variância dos valores determinados a partir dos valores das soluções padrão seleccionados, devem ser homogêneos e independentes da concentração.

A diferença de variâncias (DS^2) é calculada pela equação seguinte:

$$DS^2 = (N-2) \cdot S_{y/x}^2 - (N-3) \cdot S_{y_2}^2$$

As concentrações x_1 e x_{10} são usadas para calcular as variâncias $S_{y_1}^2$ e $S_{y_{10}}^2$ através da equação:

$$S_{y_i}^2 = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad \text{com} \quad \bar{y}_i = \frac{\sum_{j=1}^{n_i} y_{i,j}}{n_i}$$

onde $y_{i,j}$ é o valor de resposta da variável j para uma determinada concentração x_i .

Calcula-se o valor teste, PG:

$$PG = DS^2 / S_{y_2}^2$$

Compara-se este valor de PG com o valor tabelado da distribuição F de Snedecor / Fisher de modo a verificar diferenças significativas:

Se $PG \leq F$: a função de calibração é linear

Se $PG > F$: a função de calibração é não linear

No caso de $PG > F$, deve-se avaliar a possibilidade de reduzir a gama de trabalho de modo a que a função de calibração seja linear. Para avaliação da linearidade poder-se-á também recorrer a uma representação gráfica da função juntamente com o cálculo e análise do coeficiente de correlação. No entanto, é necessário algum cuidado na interpretação deste teste de linearidade pois os coeficientes de correlação são bons indicadores de correlação, mas não necessariamente de linearidade [4, 27, 28].

2.3.1.2.2- Limite de Detecção (L.D.)

O limite de detecção é o teor mínimo medido, a partir do qual é possível detectar a presença do analito com uma certeza estatística razoável. Este limiar analítico corresponde à mais pequena quantidade de substância a analisar que pode ser detectada numa amostra, mas não necessariamente quantificada como valor exacto. Em termos qualitativos, o conceito de limite de detecção corresponde à concentração mínima que é possível distinguir do branco:

$$L.D. = X_0 + 3,3 \sigma_0$$

em que X_0 é a média aritmética do teor medido de uma série de brancos ou padrões de concentração vestigiária (entre 10 e 20 ensaios), preparados de forma independente e lidos ao longo de vários dias de trabalho, isto é, reproduzindo o melhor possível a situação de rotina e σ_0 representa o desvio padrão associado a X_0 [4].

2.3.1.2.3- Limite de Quantificação (L.Q.)

O limite de quantificação corresponde à menor concentração medida a partir da qual é possível a quantificação do analito, com uma determinada exactidão e precisão. Este limiar, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exactidão e precisão é satisfatória. Este teste pode ser realizado através da passagem, em

condições de precisão intermédia, de uma série de padrões internos, cuja concentração é próxima ou igual ao limiar de quantificação. Segundo as recomendações da IUPAC, o coeficiente de variação (desvio padrão a dividir pela média dos valores encontrados) para estes padrões não deve exceder 10 %. Quantitativamente, o limite de quantificação é determinado pela equação seguinte:

$$\text{L.Q.} = X_0 + 10 \sigma_0$$

Este limiar pode também ser estimado usando um conjunto de padrões vestígio ou brancos fortificados, independentes, testados em condições de precisão intermédia, e sobre os quais forem efectuados estudos de exactidão e precisão (erro relativo em relação ao padrão vestígio e coeficiente de variação, respectivamente). Neste caso, adopta-se como estimativa do L.Q. a concentração utilizada, desde que os parâmetros citados revelem níveis aceitáveis (por exemplo, inferiores ou iguais a 10 %) [4].

2.3.1.2.4- Sensibilidade

A sensibilidade é definida como o quociente entre o acréscimo do valor lido ΔL e a variação da concentração ΔC correspondente aquele acréscimo.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\Delta L}{\Delta C}$$

Esta característica avalia a capacidade de um método (ou equipamento) para distinguir pequenas diferenças de concentração de um analito. A sensibilidade é assim definida como sendo a derivada de primeira ordem da curva de calibração nessa zona de concentração. Se a curva de calibração for definida por um modelo linear, a sensibilidade será constante ao longo de toda a gama de trabalho e igual ao declive dessa recta de calibração.

A sensibilidade tem interesse no seu aspecto relativo, isto é, quando se pretende averiguar a evolução desta grandeza ao longo do tempo, quando se compara a sensibilidade de vários métodos analíticos baseados em modelos lineares para um mesmo analito, e quando se compara a sensibilidade para vários analitos [4].

2.3.1.3- Precisão

A precisão é um termo geral que avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas [4, 29]. No entanto, importa salientar que será mais realista o estudo sobre amostras no sentido de minimizar efeitos de matriz.

Existem duas medidas para avaliar esta dispersão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Entre estas duas medidas extremas de precisão existe uma situação intermédia que se designa por *precisão intermédia* ou variabilidade intralaboratorial. De um modo geral, a precisão varia com a gama de concentrações [4].

2.3.1.3.1- Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio efectuado em condições idênticas, isto é, refere-se a ensaios efectuados sobre uma mesma amostra, em condições tão estáveis quanto possível, tais como: o mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento, o mesmo tipo de reagentes e curtos intervalos de tempo [4, 29].

O limite de repetibilidade (r) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95%), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio (X_i, X_{i-1}), obtidos nas condições acima referidas. Na prática, aceitam-se os resultados de duas determinações efectuadas em condições de repetibilidade se $|X_i - X_{i-1}| \leq r$.

A repetibilidade pode ser determinada através de um ensaio interlaboratorial ou a partir de ensaios efectuados pelo próprio laboratório. Efectua-se uma série de medições ($n \geq 10$) numa mesma amostra ou padrões, em condições de repetibilidade. Caso se justifique, este procedimento é repetido sobre uma série de amostras, em vários níveis de concentrações cobrindo todo o domínio de aplicação do método. O cálculo é efectuado separadamente para cada nível de concentração, i , a partir dos resultados obtidos e eliminando os valores aberrantes [4].

2.3.1.3.2- Reprodutibilidade

A reprodutibilidade refere-se à precisão de um método efectuado em condições de ensaio diferentes, utilizando o mesmo método de ensaio, sobre uma mesma amostra, mas variando as condições de medição, tais como: diferentes laboratórios, diferentes operadores, diferentes equipamentos e/ ou épocas diferentes [4, 29].

O limite de reprodutibilidade (R) é o valor abaixo do qual se deve situar, com uma probabilidade específica (normalmente 95 %), a diferença absoluta entre dois resultados de ensaio, obtidos nas condições acima referidas.

A reprodutibilidade de um método de análise é obtida a partir de ensaios interlaboratoriais. É enviada uma série de amostras aos n laboratórios participantes, os quais realizam ensaios sobre uma mesma amostra [4].

2.3.1.3.3- Precisão Intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada, sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exactamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes épocas e com ou sem verificação da calibração. Esta medida da precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável.

Para determinar a precisão intermédia de um método, efectua-se n medições em replicado, duplicado ou em ensaio único, sobre a mesma amostra, nas condições pré-definidas, pois existem vários métodos de estudar este tipo de precisão. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outras gamas de concentração. Na maioria dos casos, o valor da precisão intermédia é função da gama de concentração do ensaio e o seu cálculo é efectuado, preferencialmente, a partir dos resultados obtidos, após eliminação dos resultados aberrantes.

Dependendo do ensaio e do tipo de aplicação do estudo da precisão intermédia, existem vários métodos para determinação e controlo deste parâmetro de qualidade, nomeadamente, cartas de controlo de amplitudes que podem ser aplicadas, entre outras, no caso dos duplicados de amostras e dos padrões estáveis ao longo do tempo [4].

2.3.2- AVALIAÇÃO DIRECTA

Este tipo de avaliação visa conhecer essencialmente a **exactidão** dos métodos de ensaio. A exactidão é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro [4, 29].

O termo exactidão, quando aplicado a uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e componentes de erros sistemáticos.

A avaliação da exactidão faz-se normalmente através da análise de Materiais de Referência Certificados (MRC), da participação em Ensaios Interlaboratoriais e através de testes comparativos [4].

2.3.2.1- Materiais de Referência Certificados

Sempre que possível, devem ser usados Materiais de Referência Certificados no processo de validação de um método de ensaio, dado que estes materiais constituem uma excelente ferramenta no Controlo Externo da Qualidade de uma análise química [4].

Um MRC possui um valor de concentração (ou outra grandeza) para cada parâmetro e uma incerteza associada. O valor dessa grandeza foi certificado por um processo tecnicamente válido, sendo acompanhado ou rastreável a um certificado ou outro documento produzido pela entidade certificadora [29]. A aquisição de um MRC é feita a um organismo fornecedor reconhecido e credível, como por exemplo, o NIST- *National Institute of Standards and Technology*, dos Estados Unidos da América [4].

O valor obtido na análise de um MRC deve ser comparado com o valor certificado, determinando-se o erro e a exactidão da análise. Um dos processos de avaliação dos resultados obtidos por meio da análise de um MRC, é através do cálculo do erro relativo (E_r) expresso em percentagem (%) que é calculado pela expressão seguinte:

$$E_r = \frac{(X_{lab} - X_v)}{X_v} \cdot 100$$

em que:

X_{lab} - valor obtido experimentalmente (ou a média aritmética de valores obtidos);

X_v - valor aceite como verdadeiro, ou seja, o valor certificado do MRC.

O erro relativo exprime a componente de erros sistemáticos. Cabe ao laboratório definir qual o seu grau de exigência em termos de exactidão do método em estudo, o qual deve assentar sempre que possível em dados bibliográficos, ou na ausência de tais dados, em critérios de bom senso [4]. O desempenho obtido na análise de um MRC não deve ser extrapolado para amostras com matrizes diferentes, permitindo-nos obter apenas nestes casos uma evidência mínima do domínio da técnica analítica [29].

A periodicidade da análise do MRC deve ser estipulada em função da frequência de análises efectuadas, de estas serem de rotina ou de carácter pontual, do grau de conhecimento das amostras, da complexidade das técnicas e do grau de confiança exigido para o laboratório [4].

2.3.2.2- Ensaio Interlaboratoriais

Define-se por ensaio interlaboratorial a organização, realização e avaliação de ensaios no mesmo (ou similar) item ou material, por dois ou mais laboratórios, de acordo com condições pré-determinadas. Por razões estatísticas, é aconselhável que o número de participantes seja próximo ou superior a dez [29].

Quando um laboratório pretenda avaliar a exactidão dos resultados de um método de ensaio, pode recorrer à participação num ensaio de comparação interlaboratorial, que se destina a avaliar o desempenho dos laboratórios participantes. Os resultados obtidos pelo laboratório nos ensaios interlaboratoriais devem ser objecto de uma análise cuidada, de que resulta um plano de acções correctivas [4, 29].

A avaliação do desempenho do laboratório participante é feita pela entidade organizadora através da seguinte fórmula do cálculo do "Z-score":

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

em que:

X_{lab} - valor obtido pelo laboratório;

X_v - valor aceite como verdadeiro, isto é, o estabelecido no ensaio interlaboratorial;

S- unidade de desvio, que pode ser o desvio padrão da média dos laboratórios no ensaio interlaboratorial, a incerteza de X_v , ou outro desvio que assente em critérios de exigência da entidade organizadora.

A avaliação pode ser feita de acordo com a seguinte escala de pontuação:

$|Z| \leq 2$: Satisfatório

$2 < |Z| \leq 3$: Questionável

$|Z| > 3$: Incorrecto

Caso o laboratório calcule a incerteza do seu resultado (U_{lab}), o valor de X_v deve estar dentro do intervalo de incerteza de X_{lab} . É geralmente empregue o conceito de erro normalizado (E_n) para avaliar a avaliação do desempenho:

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

em que:

U_{ref} - incerteza associada ao valor verdadeiro.

Se $|E_n| \leq 1$, então U_{lab} está bem estimada [4].

2.3.2.3- Testes Comparativos

Um outro contributo importante na validação de um método interno consiste na comparação dos resultados obtidos a partir do método a validar com os obtidos através de um método tomado como referência. O objectivo principal deste tipo de comparação é o estudo da proximidade dos resultados obtidos pelos dois métodos de ensaio, ou seja, a avaliação da exactidão do método interno relativamente ao de referência. Na prática, efectua-se análises em replicado, utilizando os dois métodos de ensaio em separado sobre as mesmas amostras. Este estudo pode ser realizado numa gama restrita de concentrações ou em toda a gama de concentrações em que se pretende validar o método.

Existem várias técnicas para comparação de resultados obtidos através de dois métodos de ensaio, nomeadamente, teste t das médias, teste t das diferenças (amostras emparelhadas) e teste da regressão linear [4].

O teste de regressão linear entre dois métodos de ensaio é normalmente utilizado quando se pretende validar um método na globalidade da sua gama de trabalho. Analisam-se uma série de pelo menos dez amostras de modo a cobrir toda a gama de trabalho que se pretende validar.

A concordância entre os resultados obtidos pelos dois métodos diferentes é avaliada através da equação do tipo $y = bx + a$. Designando y por Método 1 e x por Método 2, teremos a seguinte equação:

$$\text{Método 1} = b \cdot \text{Método 2} + a$$

Sendo **b** o declive e **a** a ordenada na origem.

Pode-se considerar que os dois métodos não apresentam desvios sistemáticos se a equação anterior não for significativamente diferente da equação:

$$\text{Método 1} = \text{Método 2}$$

O intervalo de confiança associado à ordenada na origem, $a \pm S_a \cdot t$, deve conter o valor zero. S_a representa o desvio padrão da ordenada na origem, t o valor de t tabelado para um determinado grau de confiança e $(N-2)$ graus de liberdade, sendo N o número de amostras ensaiadas.

O intervalo de confiança associado ao declive, $b \pm S_b \cdot t$, deve conter o valor 1 (um). S_b representa o desvio padrão do declive.

Caso não se verifiquem estas duas condições simultaneamente, pode-se concluir que os métodos não são estatisticamente concordantes na gama de trabalho em estudo, para um determinado nível de confiança.

No caso de se usar o método dos mínimos quadrados, o método de maior precisão deverá ser colocado no eixo das abcissas (eixo x), sendo o outro colocado no eixo das ordenadas (eixo y), pelo facto de se considerar que os erros relativos ao eixo das abcissas são desprezáveis face aos associados ao eixo das ordenadas. Deste modo, terá de ser conhecida a precisão de cada um dos métodos, antes de se iniciar o estudo comparativo [4].