

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE AMOSTRAS UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

Julianna Ferreira de Almeida Prata
Bolsista PCI, Química.

Maria Inês Couto Monteiro
Orientadora, Eng^a Química, D. Sc.

Resumo

A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é uma técnica analítica bem estabelecida, e muito utilizada em laboratórios de rotina. Entretanto, erros sistemáticos e/ou aleatórios, que podem ocorrer durante a execução das análises, podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados analíticos. Sendo assim, é de extrema importância que o método proposto para cada elemento e tipo de amostra seja validado. Neste trabalho foi apresentado um protocolo de validação para a determinação de cobre em efluentes utilizando a técnica de FAAS.

1. Introdução

Apesar da técnica de espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) ser bem estabelecida e suficientemente robusta para a determinação quantitativa de elementos em laboratórios de rotina, erros sistemáticos e/ou aleatórios causados por alterações que ocorrem na temperatura da chama, na taxa de aspiração da solução, na composição da amostra, entre outras, podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados analíticos (FERNANDES et al., 2003). Resultados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e prejuízos financeiros irreparáveis, e por isso, é de extrema importância que o método proposto para cada elemento e tipo de amostra seja validado.

O desempenho de um procedimento analítico (ou a qualidade dos resultados analíticos) envolvendo análise instrumental depende de dois parâmetros: a qualidade das medidas instrumentais e a confiabilidade estatística dos cálculos envolvidos no seu processamento. Uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório é estabelecer os limites destes parâmetros por meio da estimativa das figuras de mérito, numa etapa conhecida como validação (RIBEIRO et al., 2008).

A validação no laboratório (*"in house validation"*) consiste em executar as etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido ou para verificar que um método adotado seja bem aplicado, enquanto que uma validação completa envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial. Os parâmetros de validação (figuras de mérito) envolvem: seletividade; faixa de linearidade; sensibilidade do método, representada pelos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ); precisão e exatidão (INMETRO, 2011).

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi validar um método para a determinação de cobre em efluentes por FAAS utilizando como ferramenta uma planilha de validação desenvolvida no laboratório da COAM. Esse trabalho foi o ponto de partida para a validação de outros procedimentos analíticos.

3. Material e Métodos

Foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica com chama Agilent, modelo SpectrAA-55b. Todas as medidas de absorvância foram resultantes da média das medidas de absorvância ($n = 3$). As condições operacionais para a determinação de cobre por FAAS foram: gás ar /acetileno com 99,7 a 99,8% de pureza, corrente da lâmpada igual a 10 mA, comprimento de onda igual a 324,8 nm e fenda igual a 0,5 nm. Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada e todos os reagentes utilizados foram, pelo menos, de grau analítico (P.A.). A solução estoque de 1000 mg L⁻¹ de cobre foi fornecida pela Merck. Todas as soluções intermediárias foram preparadas diariamente em solução de ácido nítrico 5% v/v. A planilha de validação foi elaborada no software Excel da Microsoft Office 2010.

3.1. Procedimento para obtenção das Figuras de Mérito

3.1.1. Especificidade

Especificidade é a capacidade de medir apenas o analito de interesse em presença de outros componentes ou interferentes que possam estar presentes na matriz da amostra. A especificidade foi avaliada através do teste de recuperação. Entretanto, primeiramente foi construída, em triplicata, uma curva analítica (0,1-1,0 mg L⁻¹ Cu) em solução de HNO₃ 5% v/v. Às medidas do sinal analítico (absorvância) foram aplicados os testes de Grubbs e de Cochran. O primeiro teste (descrito na equação 1) verificou a existência de valores aberrantes e o segundo (descrito na equação 2), se os resultados da curva analítica apresentavam caráter homocedástico. Para a análise de Grubbs, foi utilizado o valor G tabelado de 1,155 para $\alpha = 0,05$ de confiança e $n = 3$. Para a análise de Cochran, o valor de C tabelado foi de 0,6838 ($\alpha = 0,05$). A curva analítica foi elaborada pelo método dos mínimos quadrados. O teste de recuperação consistiu em se determinar a concentração de Cu em uma alíquota de uma amostra de efluente e em outra alíquota da mesma amostra fortificada com 0,25 mg L⁻¹ de Cu. Uma recuperação de 100% foi considerada para a concentração adicionada de 0,25 mg L⁻¹ de Cu. Recuperações de Cu entre 90 – 110 % foram interpretadas como ausência de efeito de matriz.

$$G_{calc} = \frac{|x_i - \bar{x}|}{s} \quad (1)$$

Onde: G_{calc} = valor de G calculado; x_i = valor suspeito de ser aberrante, \bar{x} = média dos valores e s = desvio padrão.

$$C = \frac{s^2 \max}{\sum_{i=1}^n s_i^2} \quad (2)$$

Onde: $s^2 \max$ = maior das variâncias dos níveis de concentração; $\sum_{i=1}^n s_i^2$ = soma da variância para os níveis da curva.

3.1.2. Precisão do instrumento

Precisão instrumental é definida como o grau de concordância entre resultados independentes, obtidas sob condições controladas e pré-definidas. Os valores de desvio padrão utilizados para a análise do critério “Especificidade” foram usados para o cálculo dos coeficientes de variação (CV) através da equação 3.

$$CV (\%) = (s/\bar{x}) * 100 \quad (3)$$

Onde, \bar{x} = média dos valores e s = desvio padrão.

3.1.3. Linearidade

Linearidade é a habilidade de um método analítico para produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito nas amostras, em uma dada faixa de concentração, através de uma reta. As curvas construídas no critério “Especificidade” foram utilizadas na análise desta Figura de mérito. Foi verificado o resultado obtido para o Teste de Cochran (item 3.1.1) e calculado o coeficiente de correlação (r) da curva analítica com o auxílio da planilha de validação.

3.1.4. Sensibilidade

Sensibilidade é o parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. É expressa pela inclinação da curva analítica. O coeficiente angular da curva analítica foi obtido no critério “Especificidade” (item 3.1.1).

3.1.5. Faixa de trabalho

Faixa de trabalho é a faixa na qual o analito pode ser determinado com precisão e exatidão aceitáveis. Esta faixa pode ser definida pela curva analítica que será utilizada, ou seja, é a faixa linear assegurada do método.

3.1.6. Limite de detecção

Limite de detecção é a menor quantidade de analito presente na amostra, que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Foram analisadas dez soluções branco, e calculado o desvio padrão das medidas (S_{br}). O limite de detecção foi calculado a partir da equação 4.

$$LD (mg L^{-1}) = 3 \times S_{br}/b \quad (4)$$

Onde, S_{br} = desvio padrão das medidas e b= sensibilidade da curva analítica.

3.1.7. Limite de quantificação

Limite de quantificação é a menor quantidade de analito presente no amostra, que pode ser determinado com exatidão e precisão aceitáveis. Foi utilizado o valor de LD calculado no item 3.1.6 e a planilha de validação para calcular o LQ do analito presente na amostra. Após esta etapa, foram preparadas cinco soluções independentes de solução padrão (soluções teste), de concentrações iguais a do limite de quantificação calculado, para a confirmação do resultado.

3.1.8. Exatidão

Exatidão é a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada por meio da recuperação ou por meio da precisão.

3.1.9. Recuperação

A recuperação determina a eficiência do método, ou seja, a recuperação expressa a porcentagem do analito que o método é capaz de analisar, em outras palavras, exprime o grau de concordância entre o resultado de uma medição e o valor aceito como referência. Em cada triplicata dos níveis da curva, foi calculada a concentração média prevista pela equação da reta da curva analítica. Em seguida, calculou-se a recuperação de cada valor, com relação aos respectivos valores de concentração nominal.

3.1.10. Precisão

Precisão é o grau de concordância entre os resultados.

3.1.10.1. Repetitividade

Repetitividade é o grau de concordância entre os resultados das medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (condições de repetitividade), ou seja, mesmo procedimento, instrumento (usado sob as mesmas condições), local, analista e repetições em um curto intervalo de tempo. A solução padrão de concentração igual a 10 mg L⁻¹ foi analisada dez vezes e calculado o desvio padrão relativo.

3.1.11. Precisão intermediária

Precisão intermediária é uma estimativa da previsão quando uma mesma amostra é analisada pelo mesmo procedimento, por instrumentos diferentes ou por analistas diferentes e em diferentes períodos de tempo.

3.1.11.1. Avaliação da mudança de analista

Separadamente dois analistas realizaram, em seis repetições, a análise das soluções padrão nas seguintes concentrações de analito: 0,1 – 0,5 – 1 mg L⁻¹ Cu. As análises foram realizadas no equipamento de rotina do laboratório. Os resultados foram analisados pelo teste *t* pareado, equação 5.

$$T_{cal} = (\bar{d} * (n)^{0,5}) / S_d$$

$$\bar{d} = \sum d_i / n$$

$$S_d = (\sum (d_i - \bar{d})^2 / (n-1))^{0,5} \quad (5)$$

Onde d_i é a diferença entre os resultados obtidos para cada analista; \bar{d} é a média das diferenças; n é o número de pares comparados e S_d é o desvio padrão das diferenças.

3.1.11.2. Avaliação da estabilidade ao longo do tempo

Após a construção da curva analítica, foi analisada uma amostra em triplicata juntamente com uma solução padrão de concentração intermediária. Este procedimento foi realizado uma vez por dia durante uma semana. A diferença de resultados foi avaliada através do cálculo de recuperação. A primeira medida foi considerada igual a 100% de recuperação. Os valores seguintes foram considerados estáveis quando apresentaram recuperações entre 95 e 105%.

4. Resultados e Discussão

Para a obtenção das figuras de mérito foi utilizada uma planilha de validação desenvolvida no laboratório da COAM. A Figura 1 apresenta os resultados obtidos no item "Especificidade". A aplicação do teste de Grubbs indicou que não ocorreram valores aberrantes. A aplicação do teste de Cochran indicou que na faixa de trabalho estudada (0,1- 1,0 mg L⁻¹ Cu), a curva analítica apresentou linearidade e homocedasticidade. A equação da curva analítica foi igual $y = 0,0248x + 0,0045$, e o coeficiente de correlação (r) foi igual a 0,9996. A recuperação obtida para a amostra fortificada foi igual a $100 \pm 2\%$, indicando que não houve interferência de matriz e, portanto a curva analítica pode ser construída em solução de HNO₃ 5% v/v.

A Figura 2 apresenta os resultados obtidos de precisão do instrumento e exatidão. Em todos os níveis de concentração da curva analítica, os valores foram concordantes ($CV \leq 1,25\%$) e apresentaram recuperações variando entre 97,5 e 102,4% indicando que a medida instrumental é precisa e exata, respectivamente.

Os Limites de detecção e quantificação para Cu em efluentes foram satisfatórios ($LD = 0,00547$ mg L⁻¹ e $LQ = 0,01822$ mg L⁻¹), pois atenderam às condições padrões e exigências dispostos na Resolução CONAMA n° 357 para lançamento de efluentes (valor máximo de Cu dissolvido igual a 1,0 mg L⁻¹) (Figura 3). O desvio padrão relativo (RSD%) encontrado para as medidas do sinal analítico de uma solução padrão intermediária (0,50 mg L⁻¹ Cu) foi igual a 0,56% indicando que os resultados analíticos apresentaram boa precisão.

Para avaliar a "Precisão intermediária", as amostras foram analisadas por dois analistas diferentes (Figura 4). Os resultados calculados utilizando o teste t pareado ($t_{\text{calc}} < t_{\text{tabelado}}$) indicaram que as respostas foram estatisticamente semelhantes e, portanto, o protocolo pode ser seguido por dois analistas. Também, foi estudada a estabilidade da amostra durante uma semana, e os resultados indicaram que a amostra permaneceu estável, apresentando recuperações entre 95 e 102%.

Dados da Curva em ácido nítrico											
	Concentração Teórica (mg L ⁻¹)	Sinal Analítico	Grubbs	Sinal Analítico	Média	n	Desvio	Variancia			
Nível 1	B01	0,00	0,0001	1,155	Aprovado						
	B02	0,00	0,0002	1,155	0,0001	0,0002	3	0,0001	0,00000000		
	B03	0,00	0,0002	0,577	0,0002						
Nível 2	B1	0,10	0,0081	1,000	0,0081	0,0080	3	0,0043	0,00000001	Cochran C _{tab} 0,6161 C _{calc} 0,4970	
	B2	0,10	0,0079	1,000	0,0079						
Nível 3	B3	0,10	0,0080	0,000	0,0080					Homocedástico	
	B1	0,25	0,0206	0,801	0,0206	0,0204	3	0,0002	0,000000043		
Nível 4	B2	0,25	0,0205	0,320	0,0205						
	B3	0,25	0,0202	1,121	0,0202						
	B1	0,50	0,0391	0,949	0,0391	0,0394	3	0,0004	0,00000012		
Nível 5	B2	0,50	0,0394	0,095	0,0394						
	B3	0,50	0,0398	1,044	0,0398						
	B1	0,75	0,0596	1,141	0,0596	0,0592	3	0,0003	0,00000010		
Nível 6	B2	0,75	0,0591	0,415	0,0591						
	B3	0,75	0,0590	0,726	0,0590						
	B1	1,00	0,0782	1,134	0,0782	0,0788	3	0,0005	0,00000028		
	B2	1,00	0,0790	0,378	0,0790						
	B3	1,00	0,0792	0,756	0,0792						
Faixa de Trabalho		0,10	1,00	Critério de aceitação de linearidade				Cochran LINEAR	r LINEAR		

Figura 1. Planilha dos resultados obtidos no item “Especificidade”.

Concentração Nominal	Sinal Analítico	Coefficiente de Variação	Critério de Aceitação	Sinal Analítico Previsto	Concentração Prevista	Recuperação (%)	Critério de Aceitação	Sinal Analítico Previsto	Residuo		
Nível 1	0,10	0,0081	1,2500	Resultados Concordantes	0,0082	0,10	97,5	Exato	0,0082	-0,0001	Variância 0,0000
	0,10	0,0079			0,0082				0,0082	-0,0003	
	0,10	0,008			0,0082				0,0082	-0,0002	
Nível 2	0,25	0,0206	1,0188	Resultados Concordantes	0,0200	0,26	102,4	Exato	0,0200	0,0006	Variância 0,0000
	0,25	0,0205			0,0200				0,0200	0,0005	
	0,25	0,0202			0,0200				0,0200	0,0002	
Nível 3	0,50	0,0391	0,8906	Resultados Concordantes	0,0396	0,50	99,6	Exato	0,0396	-0,0005	Variância 0,0000
	0,50	0,0394			0,0396				0,0396	-0,0002	
	0,50	0,0398			0,0396				0,0396	0,0002	
Nível 4	0,75	0,0596	0,5427	Resultados Concordantes	0,0592	0,75	100,0	Exato	0,0592	0,0004	Variância 0,0000
	0,75	0,0591			0,0592				0,0592	-0,0001	
	0,75	0,059			0,0592				0,0592	-0,0002	
Nível 5	1,00	0,0782	0,6715	Resultados Concordantes	0,0788	1,00	100,0	Exato	0,0788	-0,0006	Variância 0,0000
	1,00	0,079			0,0788				0,0788	0,0002	
	1,00	0,0792			0,0788				0,0788	0,0004	

Figura 2. Planilha dos resultados obtidos nos itens “Exatidão” e “Precisão do instrumento”.

	Sinal Analítico branco	Sinal Analítico Padrão intermediário	Concentração Prevista (mg L ⁻¹)
	0,0007	0,0406	0,51
	0,0007	0,0407	0,51
	0,0007	0,0412	0,52
	0,0009	0,0408	0,52
	0,0008	0,0405	0,51
	0,0009	0,0406	0,51
	0,0008	0,0407	0,51
	0,0010	0,0409	0,52
	0,0010	0,0411	0,52
	0,0011	0,0407	0,51
s	0,00014		
b	0,07849	ABS L mg ⁻¹	0,56
LD	0,00547	mg L ⁻¹	Repetitivo
LQ	0,01822	mg L ⁻¹	

Figura 3. Planilha dos resultados obtidos nos itens “Limite de detecção, Quantificação e Repetitividade”.

Analista: Julianna					Analista: Renata					
Concentração nominal mg L ⁻¹	Concentração planilha incerteza	Grubbs	Aprovada	Média	Diferença	Concentração nominal mg L ⁻¹	Concentração planilha incerteza	Grubbs	Aprovada	Média
0,25	0,24	1,944	0,2440	0,24	-0,0003	0,25	0,25	1,944	0,2500	0,24
	0,24	0,9129	0,2440				0,24	0,6455	0,2400	
	0,24	0,9129	0,2430				0,24	1,2910	0,2500	
	0,24	0,0000	0,2430				0,24	0,6455	0,2400	
	0,24	0,0000	0,2430				0,24	0,6455	0,2400	
	0,24	1,8257	0,2410				0,24	0,6455	0,2400	
0,50	0,47	0,6358	0,4680	0,47	-0,0065	0,50	0,48	1,2910	0,4800	0,47
	0,47	0,6358	0,4680				0,47	0,6455	0,4700	
	0,47	0,6358	0,4680				0,47	0,6455	0,4700	
	0,46	1,5442	0,4640				0,47	1,2910	0,4800	
	0,47	0,6358	0,4680				0,47	0,6455	0,4700	
	0,47	0,9992	0,4650				0,47	0,6455	0,4700	
0,75	0,73	0,4428	0,7290	0,73	-0,0150	0,75	0,74	0,6455	0,7400	0,74
	0,73	1,1070	0,7300				0,74	1,2910	0,7500	
	0,73	1,5498	0,7260				0,74	0,6455	0,7400	
	0,73	0,8856	0,7270				0,74	0,6455	0,7400	
	0,73	0,4428	0,7290				0,75	1,2910	0,7500	
	0,73	0,4428	0,7290				0,74	0,6455	0,7400	
		Média								
		Desvio Padrão								
		t								
		Substado (n=3)								
		Critério de aceitação								

Figura 4. Planilha dos resultados referentes à precisão intermediária avaliando a mudança de analista.

5. Conclusão

O protocolo para a validação de um método instrumental monoelementar foi implementado na COAM. Os resultados obtidos para a determinação de Cu na amostra de efluente analisada apresentaram boa precisão e exatidão, validando assim, o método estudado.

6. Agradecimentos

Agradeço ao Programa Institucional de Bolsa de PCI /CNPq, por conceder a bolsa, à minha orientadora Maria Inês Couto Monteiro, aos que trabalham no Centro de Tecnologia Mineral – CETEM, e àqueles que ajudaram na execução deste trabalho.

7. Referências Bibliográficas

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2005. **Resolução Conama nº 357, alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011**. Disponível em: www.mma.conama.gov.br/conama. Acesso em 01/03/2013.

DOQ-CGCRE-008- **Orientação sobre validação de métodos analíticos, coordenação geral de acreditação, INMETRO**, Revisão 04 – Julho/2011.

FERNANDES, K.G.; MORAES, M.; NETO, J.A.G.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. **Padronização interna em espectrometria de absorção atômica**. Química Nova, vol.26, p.249-252, 2003.

OHLWELLER, O. A. **Química Analítica Quantitativa**, Ed.; Livros Técnicos e Científicos; Rio de Janeiro, 1981.

RIBEIRO, F.A.L; FERREIRA, M.M.C; MORANO, S.C; DA SILVA, L.R.; SCHNEIDER, R.P. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figura de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Química Nova, v. 31, n.1, p. 164-171, 2008.