

## 4

### Validação do método e incerteza de medição.

#### 4.1.

##### Parâmetros analíticos de mérito.

O processo de validação garante que um método analítico produza informações confiáveis e claras a partir de resultados experimentais. De acordo com a Norma ABNT NBR/IEC 17025, a validação é a confirmação por testes, apresentando evidências objetivas, de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional (Norma ABNT NBR/IEC 17025). Uma definição com maior afinidade com as atividades relacionadas com a química analítica é encontrada nos textos produzidos pelo EURACHEM, e que define a validação como o processo de definir uma exigência analítica e de confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que tal aplicação requer (EURACHEM,2002). Todas essas definições oficiais e cuidados com a normalização dos procedimentos usados na validação, indicam a necessidade de se mostrar que a qualidade das medições analíticas, através da rastreabilidade, da confiabilidade e da comparabilidade, tem sido cada vez mais exigida.

Na validação no laboratório, "*in house validation*", as etapas do processo se passam dentro de um único laboratório e tem o intuito tanto de validar um método novo (que tenha sido desenvolvido localmente) quanto de verificar se um método adotado de outras fontes está sendo bem aplicado. Esse tipo de validação é usado nas etapas do desenvolvimento de uma metodologia, servindo para a divulgação da mesma através da publicação de artigos em revistas científicas, onde são registradas todas as características de desempenho da metodologia, com exceção do estudo interlaboratorial, este característico da validação completa, "*full validation*". O estudo interlaboratorial complementa o processo de validação, servindo para verificar como a metodologia se comporta numa determinada aplicação levando em consideração os resultados obtidos em vários laboratórios. Nesse caso, estabelece-se a reprodutibilidade da metodologia e calcula-se a incerteza expandida associada à metodologia desenvolvida (GUM).

Os estudos de validação devem ser representativos e conduzidos de modo a contemplar a faixa de concentração esperada para o analito de interesse e os tipos de amostras onde se espera medir o analito em questão (Ribani, 2004). Os termos mais usados para classificar o conjunto de parâmetros de validação de métodos são: parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho ou parâmetros analíticos de mérito, sendo essa última designação a utilizada no presente texto.

Os parâmetros analíticos de mérito descritos nesse trabalho são: (i) resposta linear, (ii) capacidade de detecção (limite de detecção e limite de quantificação, etc), (iii) precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e (iv) tendência ou recuperação, que são descritos a seguir para a metodologia voltamétrica usando o BiFE. A robustez foi avaliada indiretamente na etapa de otimização do método. Os parâmetros de mérito da metodologia voltamétrica desenvolvida utilizando o BiFE foram comparados com os obtidos com o uso do HMDE, um eletrodo mais tradicional na determinação de traços de metais.

#### **4.1.1. Resposta Linear.**

A faixa de resposta linear indica a capacidade do método analítico em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (Swartz,1998). Nesse caso, a quantificação requer que se conheça a relação de dependência entre a resposta medida e a concentração do analito presente na amostra, esperando que os requisitos para a aplicação da equação da reta sejam cumpridos. A faixa de resposta linear ou faixa linear dinâmica pode ser obtida por processo de calibração externa com padrões (curva analítica) ou por adição seqüencial de padrões na matriz em estudo (curva de adição de analito). É importante ressaltar que a falta de linearidade não inviabiliza a aplicação de um método, desde que se conheça o modelo de previsão de resultados adequado para estes casos (por exemplo, o quadrático).

Neste trabalho, buscou-se o modelo linear de resposta analítica descrito pela equação da reta. A equação da reta envolve duas variáveis que são a resposta medida ( $y$ ), no caso a corrente faradaica de oxidação do analito, e a quantidade de analito na amostra ( $x$ ), no caso a concentração de analito. Os parâmetros importantes do modelo são a inclinação ou sensibilidade da curva de

calibração (representado pelo coeficiente angular “a”), a interseção da curva com o eixo y quando x é igual a zero (representado pelo coeficiente linear “b”) e um coeficiente de correlação entre os pontos da curva. A equação completa é a indicada abaixo na Equação 15.

$$y = ax + b \quad (15)$$

A melhor técnica para obtenção dos parâmetros da curva analítica, levando em consideração a dispersão dos resultados de todos os pontos medidos, é a regressão linear usando o método dos mínimos quadrados. Com essa técnica, estima-se a melhor reta que passa pelo conjunto de pontos medidos experimentalmente na curva analítica. A regressão deve ser ponderada caso o comportamento das variáveis for heteroscedástico (aumento da variância em função do aumento da concentração de analito), o que não foi o caso dos resultados reportados para o presente trabalho. O coeficiente de regressão (r) ou de determinação ( $R^2$ ) são usados para comprovar a existência de uma relação linear (Cunha,2007). Não existe consenso na literatura a respeito de qual desses dois coeficientes é o melhor e nem qual seria o limite para o valor aceitável desses coeficientes para a indicação do comportamento linear. No caso, indicamos o critério da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que aponta valores de coeficiente de correlação (r) igual ou superior a 0,99 como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. Na Tabela 8 são mostrados os coeficientes relevantes da curva de calibração de Pb (II) (feita por adição sucessiva de analito) na ME de querosene usando medições voltamétricas com o BiFE e com HMDE. Os resultados obtidos são a média de três experimentos (três curvas de adição padrão). Curvas de adição típicas para a ME de querosene são mostrada na Figura 37 e Figura 38 usando respectivamente o BiFE e o HMDE. Um conjunto de voltamogramas de concentrações crescentes de PB (II) em ME de querosene é mostrado na Figura 39 (BiFE) e na Figura 40 (HMDE).

Tabela 8 – Parâmetros da curva de calibração de Pb por adição de padrões<sup>a</sup> obtidas em ME de querosene usando medição voltamétrica com BiFE e com HMDE.

<b>BiFE</b>	
Equação da curva	$y=(4,56 \times 10^{-6} \pm 0,60)x + (0,14 \pm 0,03)$
(y=ax+b)	
r	0,998±0,001
R <sup>2</sup>	0,998±0,001
<b>HMDE</b>	
Equação da curva	$y=(8,04 \times 10^{-6} \pm 1,50)x + (0,201 \pm 1,13)$
(y=ax+b)	
r	0,998±0,001
R <sup>2</sup>	0,998±0,001

<sup>a</sup> Resultado médio de três curvas de calibração.

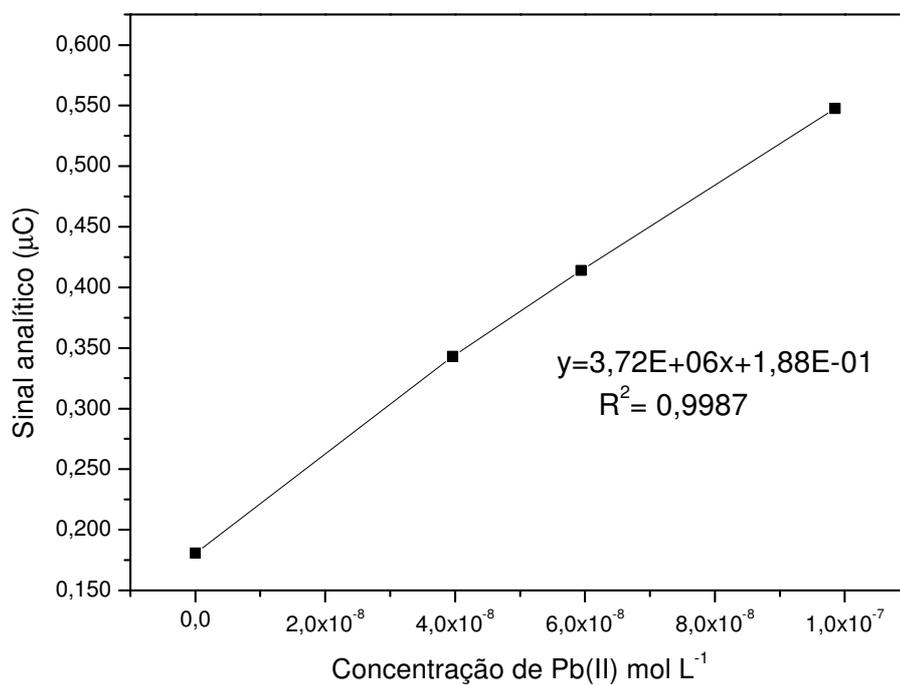


Figura 37 - Curva de adição padrão de Pb (II) para a ME de querosene usando o BiFE.

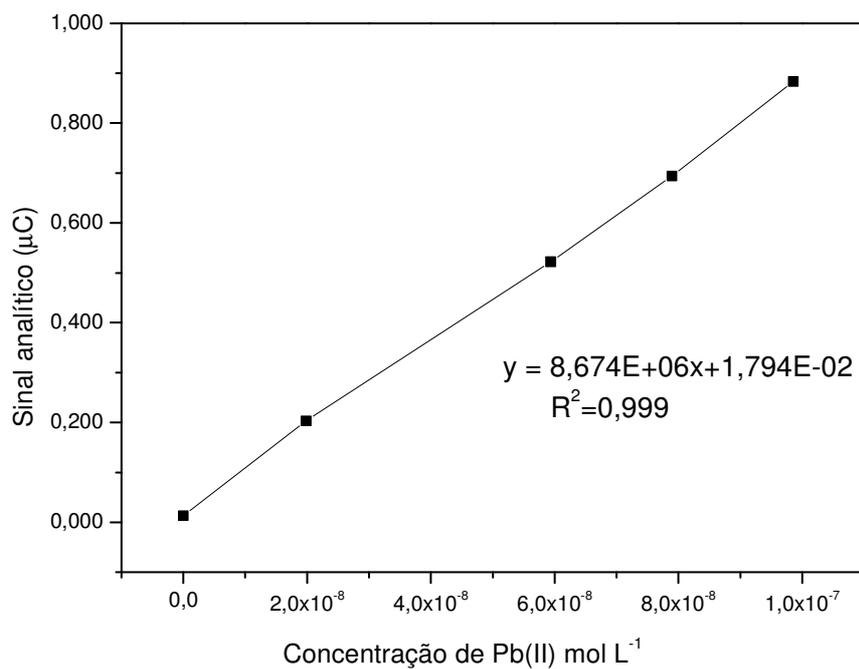


Figura 38 - curva de adição padrão de Pb (II) para a ME-querosene usando HMDE.

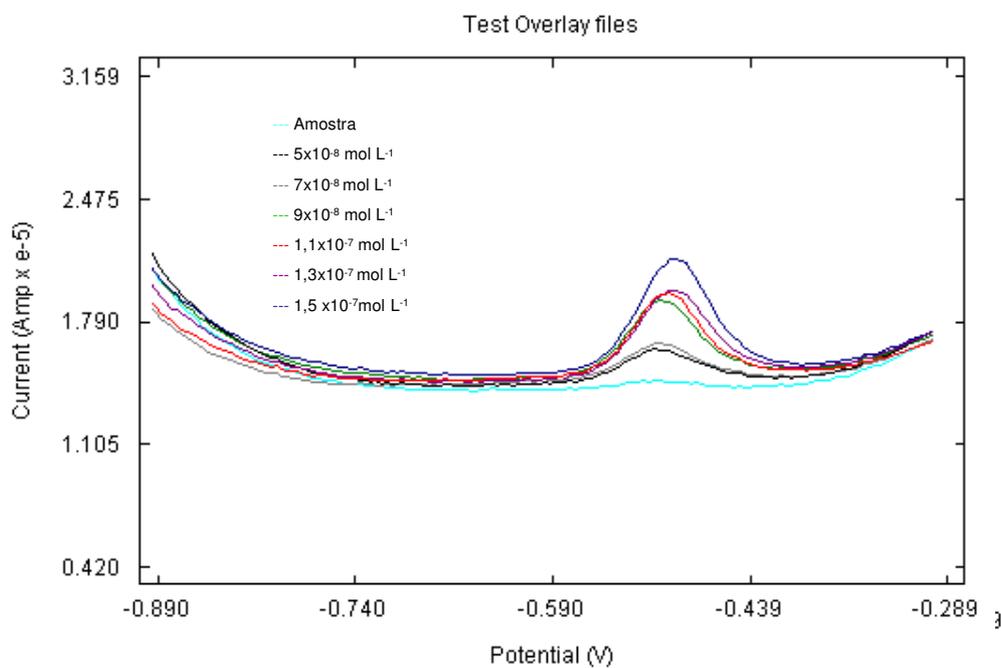


Figura 39 - Voltamogramas de concentração crescente de Pb (II) em ME de querosene usando BiFE.

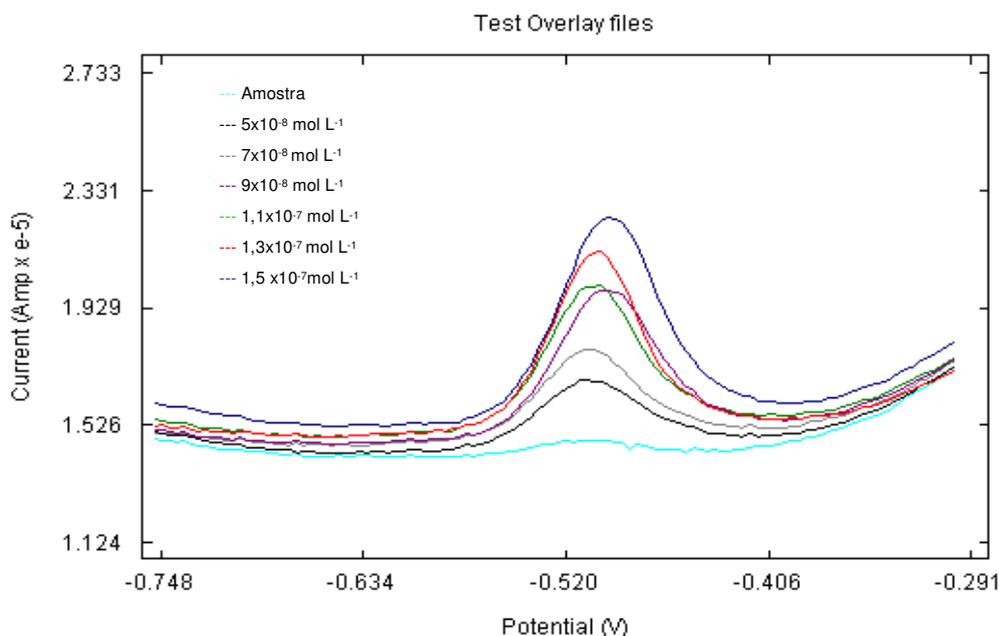


Figura 40 - Voltamogramas de concentração crescente de Pb (II) em ME de querosene usando HMDE.

No caso da ME de óleo lubrificante, os coeficientes relevantes da curva de adição são indicados na Tabela 9. Na Figura 41 e na Figura 42 são mostradas curvas representativas usando medição com o BiFE e com o HMDE respectivamente.

Tabela 9 – Parâmetros da curva de calibração de Pb por adição de padrões<sup>a</sup> obtidas em ME de óleo lubrificante usando medição voltamétrica com BiFE e com HMDE.

BiFE	
Equação da curva ( $y=ax+b$ )	$y=(3,62 \times 10^{-6} \pm 0,53)x + (0,007 \pm 0,005)$
r	0,999
R <sup>2</sup>	0,999
HMDE	
Equação da curva ( $y=ax+b$ )	$y=(7,16 \times 10^{-6} \pm 1,22)x + (0,027 \pm 0,01)$
r	0,999
R <sup>2</sup>	0,999

<sup>a</sup> Resultado médio de três curvas de calibração.

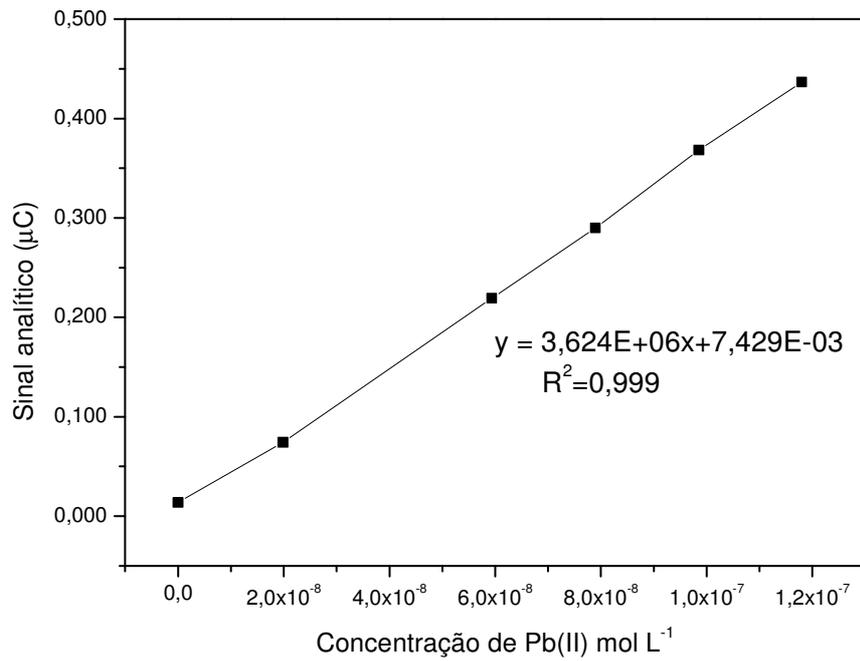


Figura 41 - curva de adição padrão de Pb(II) para a ME de óleo lubrificante usando BiFE.

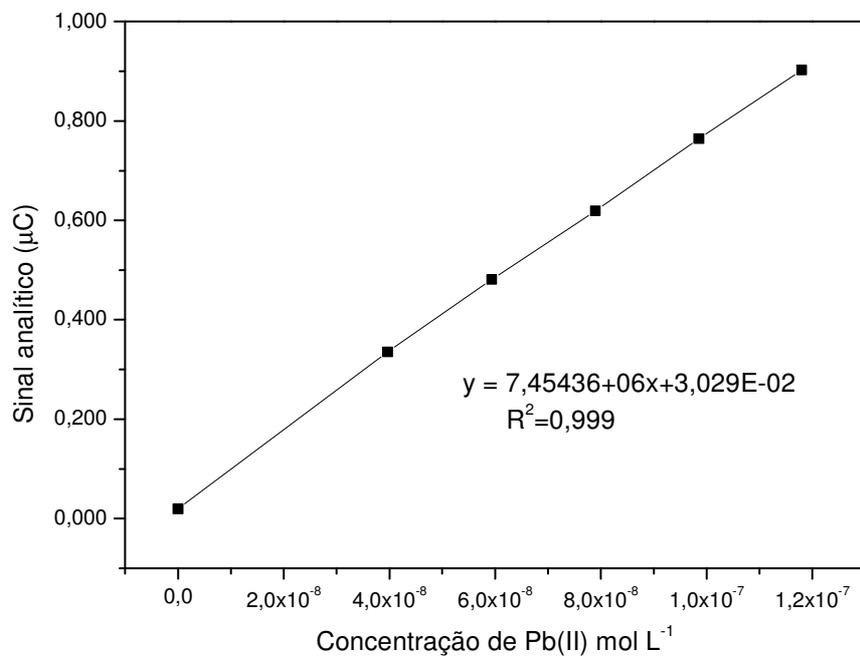


Figura 42 - curva de adição padrão de Pb(II) para a ME de óleo lubrificante usando HMDE.

Tanto com BiFE quanto com HMDE, a faixa linear foi de apenas uma ordem de magnitude, provavelmente devido à complexidade do meio. Uma curva típica mostrando a relação entre o sinal do analito em uma faixa maior é mostrada na Figura 43.

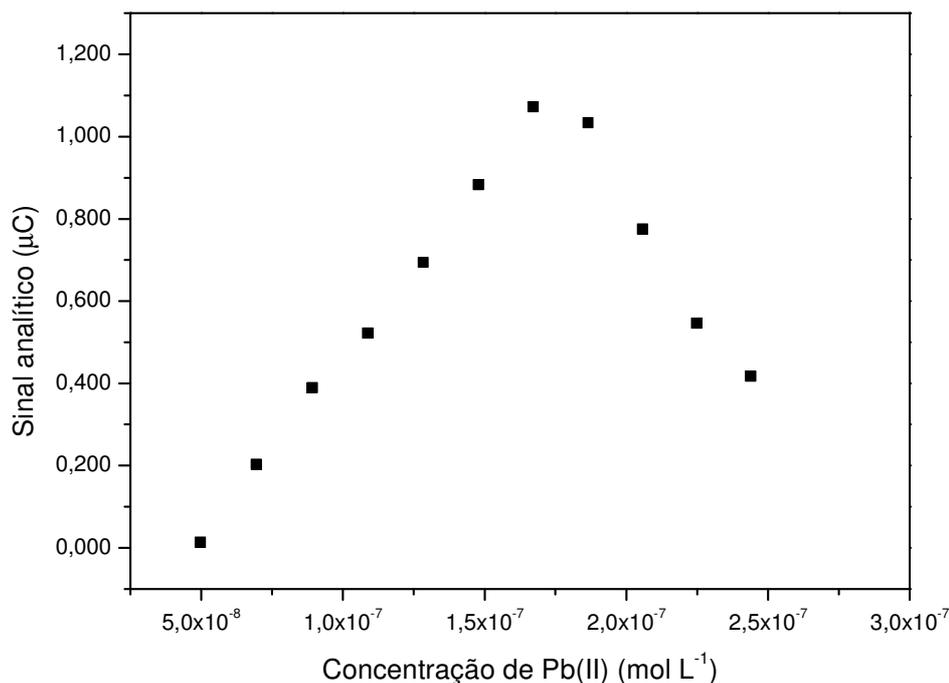


Figura 43 - Resposta analítica do Pb(II) em ME de querosene utilizando uma faixa maior de concentração de analito no BiFE.

#### 4.2. Capacidade de detecção.

Os parâmetros relacionados com a capacidade de detecção estão relacionados com a capacidade potencial do método em medir as menores quantidades de analito ou em discriminar teores próximos de analitos em uma amostra. Esses parâmetros, em geral, dependem da sensibilidade da curva analítica (indicada pelo coeficiente angular) e de fatores estatísticos pré-estabelecidos, podendo variar dependendo do critério adotado no estabelecimento desse parâmetro. Por exemplo, dependendo do critério adotado, a magnitude do branco não é considerada, apenas o seu desvio

padrão, sendo assim esses parâmetros servem apenas para comparação dos métodos e não para avaliação da menor quantidade de analito que pode efetivamente ser medida (Cunha, 2007). Neste trabalho avaliou-se a capacidade de detecção pelo limite de detecção (LD) e pelo limite de quantificação (LQ), ambos definidos pelos critérios indicados mais abaixo.

#### 4.2.1.

##### **Limite de detecção (LD).**

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra e que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2002). Pode-se calcular o limite de detecção de três formas diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. No método baseado em parâmetros da curva analítica, adotado neste trabalho, o limite de detecção pode ser expresso como:

$$LD = 3 \frac{s_b}{a} \quad (16)$$

Onde  $s_b$  é a estimativa do desvio padrão de dez replicatas do ensaio com o branco ou, no caso da ausência de sinal relevante para o branco, do ensaio com soluções contendo a menor concentração aceitável de analito na curva e “a” é a sensibilidade da curva analítica. No caso da utilização da cela eletrolítica para medição voltamétrica, o resultado final foi multiplicado por 10 por causa do fator de diluição da amostra.

No caso da utilização da cela de medição para a voltametria o cálculo será  $LD \cdot 10$  (volume amostral de querosene, mL).

#### 4.2.2.

##### **Limite de quantificação (LQ).**

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. Um critério semelhante ao do LD foi adotado nesse trabalho, alterando-se apenas o valor do limite de confiança (k) de 3 para 10. No método baseado em parâmetros da

curva analítica, adotado neste trabalho, o limite de quantificação pode ser expresso como:

$$LQ = 10 \frac{S_b}{a} \quad (17)$$

Os valores de LD e de LQ para o Pb (II) são indicados na Tabela 10. Os valores reportados são os estimados na cela de medição, isto é, nas MEs de querosene e de óleo lubrificante, e os estimados nas amostras, isto é, no querosene e no óleo lubrificante, considerando o uso do BiFE e do HMDE. Para se calcular estes parâmetros utilizou-se a média de três curvas analíticas de adição de Pb (II) utilizando as MEs das matrizes de interesse.

A memória de cálculo para LD e LQ das ME's de querosene usando BiFE e HMDE encontra-se no Anexo I e II.

Tabela 10 - Parâmetros de capacidade de detecção do Pb (II).

	Querosene		Óleo lubrificante	
	BiFE	HMDE	BiFE	HMDE
LD na cela	4,2 x 10 <sup>-9</sup> mol L <sup>-1</sup> (0,88 µg L <sup>-1</sup> )	3,3 x 10 <sup>-9</sup> mol L <sup>-1</sup> (0,68 µg L <sup>-1</sup> )	6 x 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup> (0,12 ug L <sup>-1</sup> )	4,8 x 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup> (0,09 ug L <sup>-1</sup> )
LD na amostra	4,2 x 10 <sup>-8</sup> (mol L <sup>-1</sup> ) (8,78 µg L <sup>-1</sup> )	3,3 x 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> (6,8 µg L <sup>-1</sup> )	0,3 µg g <sup>-1</sup>	0,24 µg g <sup>-1</sup>
LQ na cela	1,4 x 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> 2,9 µg L <sup>-1</sup>	1,1 x 10 <sup>-8</sup> mol L <sup>-1</sup> 2,36 µg L <sup>-1</sup>	2 x 10 <sup>-9</sup> mol L <sup>-1</sup> 0,41 µg L <sup>-1</sup>	1,6 x 10 <sup>-10</sup> mol L <sup>-1</sup> 0,32 µg L <sup>-1</sup>
LQ na amostra	1,4 x 10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> 29 µg L <sup>-1</sup>	1,1 x 10 <sup>-7</sup> mol L <sup>-1</sup> 23,6 µg L <sup>-1</sup>	1,03 µg g <sup>-1</sup>	0,08 µg g <sup>-1</sup>

#### 4.2.3. Precisão.

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-las são por meio da repetitividade e da reprodutibilidade interna, sendo usualmente indicadas pelo desvio-padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação. A repetitividade e a reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, elas devem ser determinadas para um

diferente número de concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e concentração do analito deve ser estabelecida. Por ser a faixa linear dos métodos voltamétricos curta, usou-se apenas uma concentração da região média das mesmas.

#### 4.2.3.1. Repetitividade (r)

A repetitividade (r) é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (o mesmo procedimento de medição, o mesmo analista, o mesmo instrumento usado sob mesmas condições, o mesmo local e repetições em curto espaço de tempo). Na obtenção da repetitividade, devem-se realizar no mínimo sete repetições para cálculo da estimativa do desvio padrão. Neste trabalho expressou-se o resultado como estimativa do desvio padrão relativo (DPR), como indicado na Equação 18, usando dez repetições de uma mesma amostra na mesma ME. Alternativamente foi realizado um estudo com troca de ME, pelo fato de expressar a realidade do procedimento de medição.

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (18)$$

Onde DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

Testes de repetitividade de medição de Pb foram realizados em amostras microemulsionadas de querosene e de óleo lubrificante onde o analito foi adicionado na forma de padrão inorgânico ( $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  na cela). No caso da voltametria, o conceito de repetitividade não pode ser entendido da maneira restritiva da definição, pois para cada replicata existe a renovação da superfície ativa do eletrodo, seja ela a formação de um novo filme ou de uma nova gota pendente de mercúrio. O valor das repetitividades em termos de DPR é indicado na Tabela 11. Quando se compara os resultados observados na mesma ME para HMDE e para BiFE, observa-se a repetitividade melhor para as medições feitas com o HMDE, o que pode ser facilmente explicado pela melhor reprodução da área superficial da gota de mercúrio quando comparado com a reprodução das características do filme formado em cada replicata. Com a troca de ME, não ocorreu diferença significativa comparando os dois eletrodos, o que pode ser

justificado pela grande variabilidade dos resultados na troca da ME. No caso da ME de óleo lubrificante (resultados baseados em experimentos realizados apenas na mesma ME), a diferença de desempenho dos eletrodos é percebida nitidamente, pois com o HMDE o valor de repetitividade (da ordem de 5%) é menor do que a observada com o BiFE, indicando a vantagem do HMDE em termos de reprodução de superfície ativa de eletrodo. No entanto, não se deve descartar que a piora do desempenho do BiFE na medição em ME de óleo lubrificante seja alguma interferência do meio contendo o óleo durante a formação do filme.

Tabela 11 – Repetitividade do método (medições de Pb (II)  $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ )

Repetitividade (DPR)	Querosene <sup>a</sup>		Óleo <sup>b</sup>	
	BiFE	HMDE	BiFE	HMDE
Mesma ME	9%	1%	18%	5%
Troca ME	17%	16%	-	-

a – ME de querosene

b– ME de óleo lubrificante

#### 4.2.3.2. Reprodutibilidade interna (R)

Reprodutibilidade interna (R) é o grau de concordância entre os resultados das medições realizadas em uma mesma amostra utilizando-se condições variadas, no caso desse trabalho a condição escolhida foi à troca de analistas. Evidentemente, cada analista utilizou uma ME distinta, porém de composição igual à indicada na etapa de otimização. A reprodutibilidade interna assim como a repetitividade também pode ser expressa em termos de DPR. Neste trabalho foi aplicado um teste de hipótese para comparar o resultado médio obtido entre dois analistas (indicados como  $X_1$  e  $X_2$  com  $n_1$  e  $n_2$  sendo as replicatas) e o valor encontrado ( $t_0$ ) foi comparado com o valor tabelado na distribuição de t-Student, para os graus de liberdade (gl) adequados, ou seja,  $gl = n_1 + n_2 - 2$  ( $gl=18$ ; t-student=2,01). Abaixo estão listadas as Equações 19 e 20 usadas para cálculo da reprodutibilidade. É importante salientar que os experimentos de reprodutibilidade interna foram realizados apenas para um dos tipos de ME (no caso, o de querosene).

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (19)$$

$$t_0 = \frac{X_1 - X_2}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (20)$$

A análise de dados ANOVA foram processados usando programa Excel (Microsoft Office). Em seguida, utilizou-se a Equação 21 calcular o valor da reprodutibilidade do método.

$$s_{entre}^2 = (MQ_{entre} - MQ_{dentro})/n \quad (21)$$

Onde  $MQ_{entre}$  é a soma dos mínimos quadrados entre os analistas;  $MQ_{dentro}$  é a soma dos mínimos quadrados de cada analista e  $n$  é o numero total de replicatas (Cunha, 2007).

A reprodutibilidade para a ME de querosene usando BiFE com troca de ambos analistas e ME foi 4%. Resultados semelhantes foram obtidos usando o HMDE (4%). Esses resultados mostraram que a troca do analista é um fator insignificante em termos da reprodução de resultados. A memória de cálculo para a reprodutibilidade e repetitividade da ME de querosene usando BiFE e HMDE encontra-se no Anexo III e IV.

### **4.3. Testes de recuperação e avaliação da aplicabilidade dos métodos.**

A recuperação ou fator de recuperação é definido como a proporção da quantidade do analito interesse (contido ou adicionado no material teste) que é extraído e/ou passível de ser quantificado. No entanto, avaliações excessivamente otimistas de recuperação podem ocorrer no caso da adição de analito (fortificação da amostra) se a substância adicionada não estar necessariamente na mesma forma que o presente em uma amostra específica. Os efeitos dos componentes da matriz também devem ser investigados porque estes podem interferir na quantificação do analito. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados de recuperação aumenta com a diminuição da concentração causando assim uma diferença substancial quando testes são realizados com concentrações significativamente diferentes do analito. Assim, os testes de recuperação devem ser realizados na faixa de concentração típica esperada para o composto de interesse na amostra em estudo. Se tal faixa for muito ampla, testes devem ser realizados com o analito adicionado em diferentes concentrações, sendo de preferência uma próxima ao limite de quantificação, outra próxima à concentração máxima permitida pelo método (por exemplo o final da faixa linear dinâmica) e, finalmente, em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. No presente trabalho, devido a dimensão relativamente curta da faixa linear, escolheu-se fazer os testes de recuperação utilizando apenas uma única concentração (para cada tipo de amostra) próxima à média da faixa linear reportada.

Para a realização de testes de recuperação, idealmente se deve utilizar os materiais de referência certificados (MRC), no entanto, materiais deste tipo não necessariamente estão disponíveis ou mesmo existem. Nesses casos, se faz uso de materiais fortificados com quantidades conhecidas do analito de interesse.

Para amostras fortificadas é aconselhável a realização de estudos comparativos entre métodos, o que consiste na comparação entre resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência.

Os intervalos aceitáveis para recuperação de substâncias-traço geralmente estão entre 70 e 120%, com repetitividade de até  $\pm 20\%$  (cunha,2007). Neste

trabalho, os resultados de recuperação foram expressos em termos percentuais utilizando como referência o valor da quantidade de analito estipulado pelo MRC de óleo lubrificante (NIST 1085a) ou o valor adicionado de analito na ME de querosene.

#### 4.3.1.

##### Testes de recuperação em óleo lubrificante usando MRC.

Para avaliar a aplicação da metodologia em amostra de óleo lubrificante, usou-se o MRC NIST 1085a que possui valores certificados para o Pb (297.4 mg kg<sup>-1</sup>) sendo que o certificado em questão encontra-se no Anexo V. As análises realizadas com o método voltamétrico proposto foram realizadas em triplicada em três dias diferentes e os resultados encontram-se na Tabela 12. Os resultados experimentais obtidos foram comparados com o valor de referência no MRC utilizando um teste t-Student Equação 22.

$$t_0 = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s\sqrt{n}} \quad (22)$$

Onde:  $\bar{X}$  é a média dos resultados experimentais da espécie de interesse;  $\mu_0$  é o valor da espécie de interesse especificado no MRC; s é o desvio padrão das medições realizadas e n é o número de replicatas.

Tabela 12 – Resultados da recuperação do Pb em ME de óleo lubrificante usando NIST1085a.

Alíquota <sup>a</sup>	Recuperação <sup>b</sup>	
	BiFE	HMDE
1	98,0 ± 2,8	98,9 ± 1,3
2	98,6 ± 2,4	99,9 ± 1,6
3	99,8 ± 2,8	99,5 ± 1,3

<sup>a</sup> Alíquotas feitas em três dias diferentes.

<sup>b</sup> Média de três determinações.

Os resultados indicaram recuperações próximas de 100% (98,8 ± 2,6% com o BiFE e 99,4 ± 1,4% usando o HMDE), mostrando que o método em questão pode ser aplicado para a determinação de Pb em óleo lubrificante. A

repetitividade dos resultados também foi boa, mesmo levando-se em conta os desvios-padrão para a mesma amostra analisada em dias diferentes. Nesse caso, o problema relacionado com a maior variação de sinal utilizando o BiFE também é detectado, pois o desvios-padrão médio observado com esse eletrodo foi aproximadamente duas vezes maior que o obtido com o HMDE, confirmando o que foi visto no estudo de repetitividade do método.

#### 4.3.2.

#### Testes de recuperação em ME de querosene fortificada.

Para avaliar a aplicação da metodologia em amostra de querosene usou-se o procedimento de fortificação com o analito de interesse (Pb). Nesse caso específico, tanto padrão inorgânico do analito quanto o padrão metalo-orgânico foram empregados para se avaliar a capacidade do método em recuperar o analito presente em formas químicas diferentes. As análises usando os métodos voltamétricos propostos foram realizadas em triplicada em três dias diferentes, sendo os resultados médios indicados na Tabela 13. Os resultados experimentais da voltametria foram comparados com os valores obtidos com um método alternativo, no caso a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (ET AAS). Isso foi feito para cada amostra. As recuperações obtidas também foram comparadas estatisticamente usando os resultados da análise espectrométrica como valores de referência.

Tabela 13 - Resultados da recuperação do Pb em ME de querosene usando fortificação com o analito.

Técnica	Recuperação (%) média	
	Pb inorgânico	Pb metal orgânico
Voltametria BiFE	98,2 ± 0,35	99,5 ± 0,42
Voltametria HMDE	98,9 ± 0,63	99,2 ± 0,56
ET AAS	99,3 ± 0,38	100,2 ± 0,26

No caso da análise de amostras de querosene obteve-se uma concordância excelente entre resultados obtidos pelo método proposto (seja ele usando BiFE ou HMDE) tanto em relação ao valor adicionado de analito quanto em relação ao valor de analito recuperado pelo método de comparação (ET AAS). Também importante foi constatar que o valor da recuperação independe

da forma na qual o analito é introduzido na amostra. Isso mostra que o uso do ácido nítrico durante o processo de preparação da ME provoca a isoformação de espécies químicas, no caso, a forma inorgânica.

#### **4.4. Incerteza de medição voltamétrica de Pb.**

A incerteza de medição é o parâmetro associado a um valor medido e que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser razoavelmente atribuídos ao mesmo (VIM, 2007). A incerteza associada ao valor medido é resultante de erros originados nos vários estágios da amostragem, da preparação de amostra, da análise e do conhecimento imperfeito de fatores que afetam o resultado contribuindo para que o mesmo se desvie do valor verdadeiro. Assim sendo, a incerteza de medição caracteriza a faixa de valores, dentro da qual o valor real deve se situar, com um nível de confiança específico, sendo esta expressa como um desvio-padrão ou um múltiplo calculado do desvio-padrão. Na obtenção da incerteza de medição de um mensurando por um método analítico específico, é essencial assegurar que a estimativa considere explicitamente todas as fontes possíveis de incerteza, computando os componentes mais significativos.

A necessidade dos laboratórios de ensaios em implementar um procedimento sistemático para estimar a incerteza em suas medições fez com que surgisse o documento de referência denominado Guia para Expressão da Incerteza de Medição da ISO, conhecido como ISO GUM. Esse documento demonstra que a incerteza de valores medidos incorpora diferentes fontes de incerteza que surgem de efeitos aleatórios e para as quais são atribuídas valores de contribuição (variâncias). O ISO GUM propõe a aplicação da lei da propagação da incerteza na combinação dessas diferentes fontes para se obter um valor global denominado de incerteza combinada. Tal procedimento pode-se tornar complexo quando, por exemplo, as fontes de incerteza não são independentes umas das outras. Nesse caso a combinação deve levar também valores de covariância. O procedimento descrito no ISO GUM é válido na maioria dos casos, porém pode se tornar complexo em modelos de resposta não-lineares, quando o número de graus de liberdade não podem ser obtidos (inaplicabilidade da fórmula de Welch-Satterthwaite) e quando a contribuição tem distribuição de saída (distribuição de probabilidade) cujo valor de variância não possa ser facilmente obtido para um dado nível de confiança (BIPM, 2007).

#### 4.4.1.

#### **Etapas gerais para a estimativa da incerteza da medição usando a proposta do ISO GUM.**

O ISO GUM indica uma série de etapas para se realizar a estimativa da incerteza de medição de um mensurando. A seguir, as etapas do processo serão descritas, levando em conta as aproximações e características próprias desse estudo de caso: incerteza de associada á medição voltamétrica de Pb em ME de querosene.

A primeira etapa do processo é a definição da entidade da qual uma propriedade específica vai ser medida (corrente faradaica de Pb (II)). Em seguida, assumiu-se um modelo incompleto (ausência de uma fórmula ou modelo que incluísse todas as contribuições de incerteza) e construiu-se um diagrama de causa e efeito, esquematizando as grandezas de entrada (fontes de incertezas) na forma de “espinha de peixe” e a grandeza de saída (incerteza combinada a partir das grandezas de entrada que no caso é a incerteza da corrente faradaica de Pb), como indicado na Figura 44. Como seria difícil identificar em detalhes todas as incertezas de entrada (indicadas pelas retas que convergem para o eixo principal do diagrama de causa e efeito), decidiu-se por dividi-las em quatro grupos distintos denominadas como indicado a seguir: repetitividade ( $u_r$ ); reprodutibilidade ( $u_R$ ); soluções críticas ( $u_{sol}$ ) e curva de calibração ( $u_{curva}$ ).

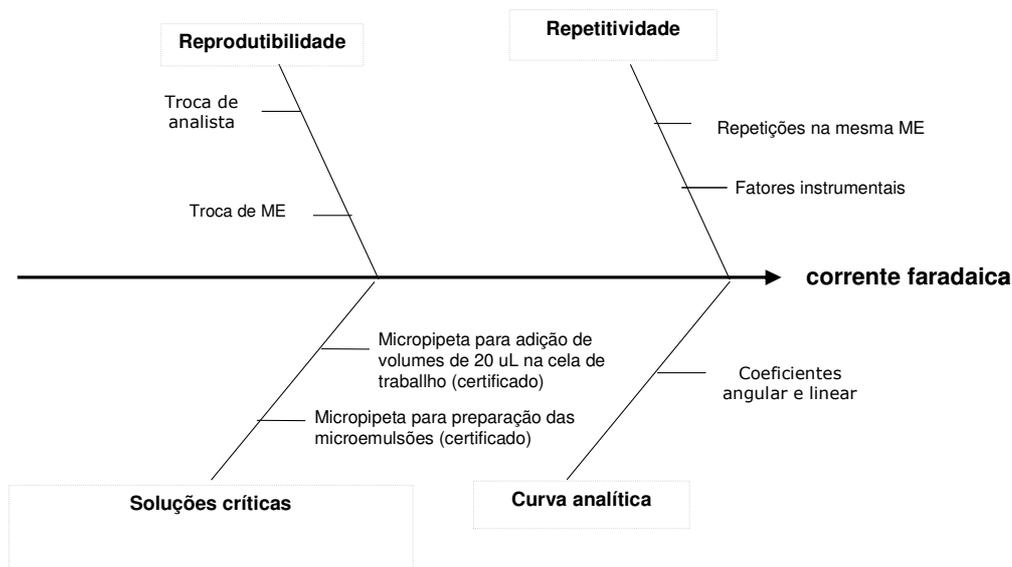


Figura 44 - Diagrama de causa e efeito.

Cada incerteza de entrada pode ser formada por uma ou várias contribuições (denominadas aqui como fontes primárias) que são combinadas para se ter o valor de cada incerteza de entrada. Na combinação para se obter as incertezas de entrada ou para se obter a incerteza combinada a partir das incertezas de entrada assume-se a independência entre essas fontes de modo a se usar a forma mais simples da lei da propagação da incerteza (soma quadrática das contribuições) como indicado na Equação 23.

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (23)$$

Onde:  $u(y)$  é o resultado da combinação de incertezas (podendo ser, qualquer uma das quatro incertezas de entrada obtidas a partir das incertezas que foram

agrupadas ou a incerteza combinada obtida a partir das incertezas de entrada);  $\partial y/\partial x_i$  é o coeficiente de sensibilidade de cada fonte (coeficientes estes utilizados para transformar grandezas de entrada em incertezas uniformizando as unidades das grandezas de entrada de modo a permitir que estas possam ser combinadas ao final do processo) e os valores  $u^2(x_i)$  são as variâncias associadas a cada uma das fontes.

Os valores das incertezas podem ser obtidos por meio de análise estatística (desvio padrão calculado) ou por meio da informação prévia sobre os fatores que afetam o processo de medição (obtidos por outros meios que não sejam os da análise estatística, por exemplo, a dedução da distribuição de probabilidade de forma conhecida, informação obtida de certificados, manuais, experiência do analista, etc.). No caso da incerteza estar associada aos desvios-padrão experimentais, o procedimento de cálculo é o de obter a média aritmética de um conjunto de medições de onde se pode obter a variância e se avaliar o tipo de distribuição estatística dos resultados. Outra consideração importante é a distribuição normal das grandezas de entrada. Essa decisão é baseada no *Teorema Central do Limite* que mostra que uma distribuição estatística que provem da combinação de outras distribuições não necessariamente normais resultará numa distribuição que tende a ser normal. Como as grandezas de entrada e obviamente as incertezas de saída são combinações de distribuições, essa situação parece ser razoável para o modelo estudado nesse trabalho.

Na Equação 24 encontra-se a fórmula para a determinação da incerteza de medição ( $u_{xi}$ ) a partir do desvio padrão experimental. No processo não-estatístico, o valor da incerteza é simplesmente o valor indicado pela fonte de informação utilizada na Equação 25.

$$u_{xi} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (24)$$

Onde  $s$  é o desvio padrão experimental e  $n$  é o número de replicatas.

$$u_{xi} = c \quad (25)$$

Onde  $c$  é a estimativa do resultado obtido da fonte de referência (Cunha,2007).

#### **4.4.2. Incerteza associada à repetitividade ( $u_r$ ).**

Esse tipo de incerteza foi obtido pelo cálculo do desvio padrão de 10 medições consecutivas das correntes faradaicas de Pb (II) (adicionado na forma de padrão de Pb(II)) em uma ME de querosene. Os resultados dessas medições, em termos de DPR, foram indicados anteriormente nesse capítulo (Tabela 11) para os experimentos realizados com o BiFE e com o HMDE. É importante salientar que para a realização de cada replicata foram necessários: a troca de ME e o uso de uma nova gota de mercúrio ou um novo filme de bismuto, distorcendo o conceito formal de repetitividade. No entanto, nesse estudo se assumirá que as medições sob condições experimentais otimizadas descritas anteriormente foram feitas em condições de repetitividade, independentemente da mudança da ME e superfície ativa do eletrodo. Os valores de  $u_r$  observados para os dois tipos de eletrodo são comparáveis, como já havia sido indicado em seção anterior no cálculo da repetitividade dos métodos. Considerando que as condições instrumentais aplicadas nos dois casos são muito semelhantes, faz sentido crer que as flutuações de sinal são causadas pela troca da ME e do eletrodo de trabalho. Comparando teoricamente as reproduções nas superfícies ativas (gota de mercúrio ou filme de bismuto), as variações nas superfícies dos filmes formados no GCE tendem a ser mais relevantes.

#### **4.4.3. Incerteza associada à reprodutibilidade ( $u_R$ ).**

As incertezas associadas com a reprodutibilidade foram obtidas usando experimentos semelhantes aos descritos para a repetitividade, agora usando dois conjuntos de dados ( $n=10$  cada conjunto). Cada um desses conjuntos foi obtido por um analista e, conseqüentemente, em uma ME distinta e desse modo, a avaliação pôde ser feita levando em consideração a troca de analista e a troca de ME. Relatou-se anteriormente que a contribuição da troca de ME é muito mais significativo que a troca de analista independentemente do tipo de eletrodo utilizado para realizar a medição de corrente. Para cada conjunto de dados obtidos, os resultados médios foram comparados pela aplicação de um teste de hipótese nula. O valor de  $u_R$  foi então calculado levando em consideração os desvios padrões de cada conjunto, representando isso como a raiz quadrada da média quadrática obtido por cada analista ( $MQ_{analista}$ ), e o desvio padrão obtido

entre os analistas e ME distintas ( $s_{\text{entre}}$ ), onde  $s_{\text{entre}} = \sqrt{(MQ_{\text{entre}} - MQ_{\text{analista}})/n}$ . Os valores médios quadráticos (MQ) são os somatórios da diferença entre cada valor independente e o valor médio e  $n$  é o número de replicatas. Finalmente,  $u_R$  foi obtido usando a Equação 26 sendo os valores desse tipo de incerteza utilizando BiFE e HMDE indicados na Tabela 14.

$$S_{\text{entre}} = S_R \quad (26)$$

O estudo de reprodutibilidade feito na etapa de validação já sinalizava que a troca da ME implicava em variações de sinal e que isso era menos crítico ao se utilizar o HMDE. Esse comportamento foi confirmado aqui na etapa de avaliação de incertezas, pois o  $u_R$  observado utilizando o HMDE é uma ordem de magnitude menor que a observada com o BiFE. Isso apontaria vantagem significativa para o HMDE, porém, para que essa conclusão seja realmente válida ainda se tem que avaliar as outras fontes de incertezas e a combinação final das mesmas.

#### 4.4.4. Incertezas associadas às soluções críticas ( $u_{\text{sol}}$ ).

Esse tipo de incerteza está relacionada com a preparação das MEs e com a adição de soluções (padrões analíticos e solução de Bi (III)) na cela de trabalho. Os padrões adicionados na cela foram obtidos diretamente pela diluição da solução original de padrão inorgânico e foram inseridos em volumes fixos para a construção das curvas de adição. No caso do uso do BiFE, a adição de solução de nitrato de bismuto na cela eletrolítica não foi considerada pois a concentração otimizada para este parâmetro foi escolhida em condições de robustez e logo, não se esperou pequenas variações de sinal analítico causadas por pequenas variações no volume do nitrato de bismuto.

Nesse caso, a incerteza das micropipetas ( $U_{\text{mp}}$ ) usadas na preparação da ME, dos padrões e na adição dos padrões à cela foram consideradas e combinadas do modo mostrado na Equação 27. Os valores  $U_{\text{mp}}$  são as incertezas expandidas obtidas nos certificados das micropipetas Anexos VI e VII (no caso  $k=2$  para o nível de confiança a 95% considerando distribuição normal) o fator de abrangência usado nesses casos. A razão da divisão de  $U$  por  $k$  é a obtenção da incerteza padrão.

$$u_{sol} = \sqrt{\sum \left( \frac{U_{mp1}}{k} \right)^2 + \left( \frac{U_{mp2}}{K} \right)^2} \quad (27)$$

Onde  $mp_1$  indica a pipeta usada para adição dos volumes na cela e  $mp_2$  indica a pipeta usada é pipeta para adição padrão de chumbo na cela.

Como os procedimentos relativos à preparação e uso de soluções críticas são os mesmos para os experimentos usando ambos os eletrodos, o valor da incerteza é igual nos dois casos. Esse valor é indicado na Tabela 14, mostrando a grande influência desse tipo de incerteza em relação aos outros já calculados.

#### 4.4.5.

#### **Incertezas associadas à curva de calibração ( $u_{curva}$ ).**

Para se obter a incerteza associada à curva de calibração, uma curva de adições sucessivas de padrão (quatro adições) foi preparada dentro da faixa linear do método. O sinal de cada concentração de analito foi medido em quadruplicata na mesma ME (condição de repetitividade). A partir da curva de adição obtiveram-se os valores dos coeficientes angular (a) e linear (b) e seus respectivos desvios padrões ( $s_a$  e  $s_b$ ), de onde foram calculadas as incertezas  $u_a$  e  $u_b$  pelo processo já descrito anteriormente. Desses dois últimos valores se obtém a incerteza da curva Equação 28.

$$u_{curva} = \sqrt{\left[ (c_{ib}^2 \times s_b^2) + (c_{ia}^2 \times s_a^2) + (2 \times c_{ib} \times c_{ia} \times u_b \times u_a \times r) \right]} \quad (28)$$

Onde  $c_{ib}$  e  $c_{ia}$  são coeficientes de sensibilidade e  $r$  é um coeficiente de correlação.

Considerando que os sinais analíticos na curva de calibração se ajustam no modelo linear ( $y = ax + b$ ), onde  $x$  é a concentração de analito e  $y$  é a corrente faradaica medida, os valores  $s_a$  e  $s_b$  são calculados usando as Equações 29a e 29b abaixo.

$$s_b^2 = \frac{s^2 \times \sum x^2}{D} \quad (29a) \quad \text{e} \quad s_a^2 = \frac{s^2 \times \sum x^2}{D} \quad (29b)$$

Onde os valores  $x$  indicam cada uma das concentrações usadas na construção da curva de adição de Pb. Os símbolos  $s^2$  e  $D$  representam respectivamente as variâncias e o desvio da curva sendo dadas pela Equação 30a e Equação 30b.

$$D = (n \times \sum x^2) - (\sum x)^2 \quad (30a) \quad \text{e} \quad s^2 = \frac{\sum \Delta^2}{n-2} \quad (30b)$$

Onde  $\Delta$  é a diferença entre um valor esperado de  $x$  no melhor ajuste da curva de calibração e o valor experimental de  $x$ . As incertezas  $u_b$  e  $u_a$  são então calculadas usando a Equação 31a e Equação 31b.

$$u_b = \sqrt{s_b^2} \quad (31a) \quad \text{e} \quad u_a = \sqrt{s_a^2} \quad (31b)$$

Os coeficientes de sensibilidade  $c_{ib}$  e  $c_{ia}$  são usados para uniformizar as unidades dimensionais das incertezas, permitindo que a soma quadrática possa ser efetuada conforme Equação 32a e Equação 32b.

$$c_b = \frac{\partial y}{\partial b} = -\frac{1}{a} \quad (32a) \quad \text{e} \quad c_a = \frac{\partial y}{\partial a} = \frac{y-b}{a^2} \quad (32b)$$

Finalmente o coeficiente de correlação entre os pontos experimentais é dado pela Equação 33 (Cunha,2007).

$$r = -\frac{\sum x}{\sqrt{(n \times \sum x^2)}} \quad (33)$$

Os valores das incertezas associadas às curvas de calibração usando o HMDE e o BiFE são indicados na Tabela 14, de onde se vê a menor contribuição para o HMDE por causa , provavelmente, das variações de sinal maiores de corrente faradaica de Pb que são combinadas ao longo da curva de adição. A memória de cálculo da curva analítica das MEs de querosene usando BiFE e HMDE está no Anexo VIII e IX assim como o tutorial no Anexo X.

#### 4.4.6. Incertezas combinada ( $u_c$ ) e incerteza expandida (U).

Após a identificação e quantificação das incertezas de entrada, estas devem ser combinadas para a obtenção da incerteza de saída  $u_c$ , isto é, a incerteza associada à medição de corrente faradaica de Pb (II). Essa combinação é indicada na Equação 34. A incerteza expandida é obtida pela multiplicação de  $u_c$  por um fator de abrangência  $k$ , que representa o grau de liberdade efetivo, e que nesse trabalho corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95% da distribuição normal ( $k$  aproximadamente igual a 2, no caso  $k = 2$ ). O fator de abrangência é usado apenas para garantir uma margem de segurança para a incerteza combinada. Nos Anexos XI e XII encontram-se as memórias de cálculos das incertezas para as MEs de querosene usando BiFE e HMDE com troca de analista e ME. Nos Anexos XIII e XIV encontram-se as memórias de cálculos das incertezas para as ME'S de querosene usando BiFE e HMDE com troca de ME. O tutorial encontra-se no Anexo XV.

$$U_c = \sqrt{(u_r^2 + u_R^2 + u_{sol}^2 + u_{curva}^2)} \quad (34)$$

Na Tabela 14, os valores de incerteza das quatro fontes agrupadas e de suas combinações (incerteza combinada e incerteza expandida) utilizando medições voltamétricas com os dois tipos de eletrodos (BiFE e HMDE). Em seguida, descrevem-se detalhes de como cada uma dessas incertezas foram calculadas e avalia-se criticamente a contribuição de cada uma.

Tabela 14 - Valores de incerteza para as medições voltamétricas de Pb(II) em ME de querosene usando BiFE e HMDE.

Incerteza (u)	Valor (mol L <sup>-1</sup> )	
	BiFE	HMDE
Repetitividade ( $u_r$ )	$1,61 \times 10^{-8}$	$2,07 \times 10^{-9}$
Reprodutibilidade ( $u_R$ )	$4,28 \times 10^{-9}$	$5,75 \times 10^{-10}$
Soluções críticas ( $u_{sol}$ )	$4,33 \times 10^{-7}$	$4,33 \times 10^{-7}$
Curva de calibração ( $u_{curva}$ )	$4,99 \times 10^{-8}$	$2,49 \times 10^{-9}$
Combinada ( $u_c$ )	$4,36 \times 10^{-7}$	$4,3 \times 10^{-7}$
Expandida (U)	<b><math>8,73 \times 10^{-7}</math></b>	<b><math>8,67 \times 10^{-7}</math></b>

#### 4.5. Considerações finais.

Algumas considerações finais podem ser feitas com relação aos resultados encontrados ao longo do cálculo de incerteza de medição do sinal analítico do Pb (II). Para tal, deve-se usar os gráficos de barras Figura 44 e Figura 45 respectivamente para a metodologia que faz uso do BiFE e para a metodologia que faz uso do HMDE. Comparando-se os valores de  $u_c$  e de  $U$  vê-se resultados similares, da ordem de  $4 \times 10^{-7}$  e  $8 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  respectivamente, para ambos os eletrodos, indicando que a escolha de qualquer um deles gera resultados similares em termos de incerteza associada à medição. Esse fato se deve única e exclusivamente à grandeza de entrada  $u_{\text{sol}}$  cuja magnitude é igual para ambas as abordagens de medição de corrente faradaica e de longe, é o parâmetro que domina o processo. Sendo assim, qualquer tentativa de melhoria da incerteza de medição tem que passar pela alteração do jeito na qual as MEs e os padrões são preparados e, no caso dos padrões, adicionados à cela. Qualquer outro esforço no sentido de melhorar repetitividade, reprodutibilidade seria inútil. Em termos numéricos, os experimentos para cálculo de incerteza foram realizados com soluções de Pb (II)  $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ . Logo, as incertezas combinadas são uma ordem de magnitude em relação a esse valor, o que a primeira vista é um absurdo. No entanto, deve-se levar em consideração que toda essa incerteza vem da preparação das soluções críticas e que o processo de medição em si carrega incertezas de  $5,6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  para o BiFE (em torno de 100% do valor referência) e de  $2,2 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  para o HMDE (em torno de 44% do valor de referência). Deve-se ainda lembrar que esses últimos valores ainda carregam incertezas de medição de volume (padrões e adição de padrões), que ainda poderiam ser minimizados.

A saída para a resolução desse problema passa pelo esforço de se preparar as MEs utilizando medição em massa, pois nesse caso, apenas a incerteza da balança analítica (que é muito menos do que as incertezas dos aparatos de medição de volume) seria envolvida. Alternativamente poderia se fazer uso de outros aparatos automáticos de medição que possam oferecer menores incertezas no volume medido (por exemplo, um amostrador automático operando em temperatura local constante). O caso mais complicado é o que envolve a adição de soluções padrões na cela, pois a sistemática de uso dos analisadores voltamétricos comerciais é a da adição de padrões usando micropipetas automáticas.

Outro fato relevante é que os resultados para U tornam os valores de LQ medidos usando os critérios descritos na literatura estão completamente fora da realidade prática da medição de sinal analítico.

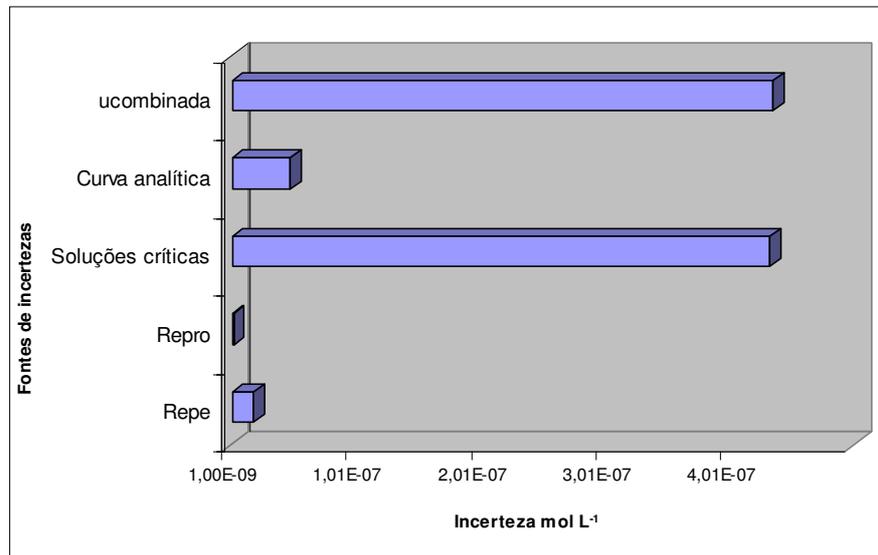


Figura 45 - Gráfico de barras mostrando a contribuição das incertezas usando BiFE.

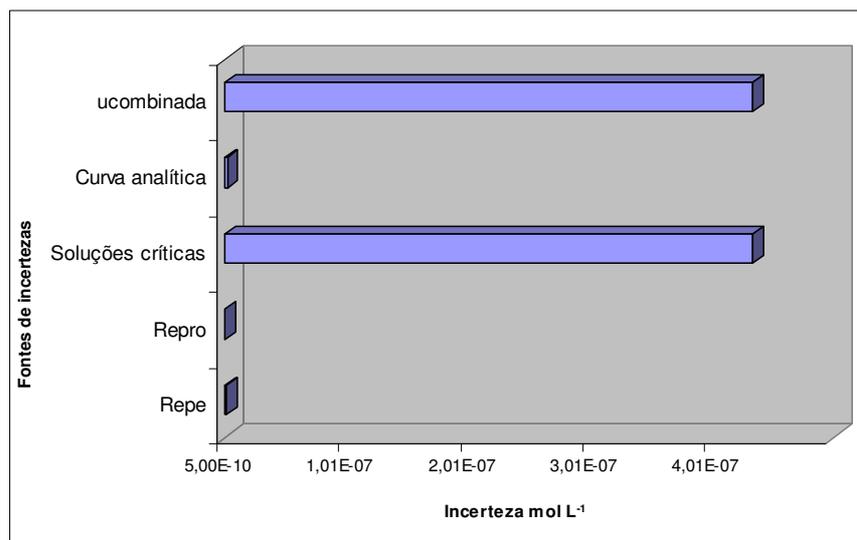


Figura 46 - Gráfico de barras mostrando a contribuição das incertezas usando HMDE.