

4 Especificidade do método

Neste Capítulo aborda-se um segundo aspecto da validação de um método analítico através do controle da *especificidade* do método.

A comparação de resultados analíticos pode ser comprometida quando o analito presente nas amostras utilizadas no procedimento de medição química apresenta-se em formas físicas e/ou químicas⁴ diferentes ou sofre interferências⁵.

Muitas vezes até mesmo o MRC e as amostras utilizadas nos testes padrão de dados, TPD, contém matriz diferente contendo o analito e outros compostos diferentes do MRC.

O método é específico quando é capaz de identificar o analito sendo capaz de distingui-lo nas suas diferentes formas ou presença de interferências.

As interferências podem modificar a resposta (sinal). Frequentemente, afetam o coeficiente angular da *curva de calibração*, diferenciando-a daquela obtida para o analito. Entretanto, esse efeito pode ser um indicador de possíveis interferências somente se a curva de calibração for linear (EURACHEM, 1998).

Segundo EURACHEM, 1998, se as interferências afetarem o *mínimo valor detectável* e o *mínimo valor quantificável*, outro método analítico deve ser desenvolvido.

4.1 Avaliação da especificidade do método

A especificidade é verificada para o método alternativo apenas quando se sabe que o método de referência é específico. O procedimento experimental consiste em fortificar (adicionar padrões) a um conjunto de dez amostras selecionadas como representativas do método, com um padrão adicional feito para cada amostra (Feinberg *et al*, 1999).

⁴ O analito pode-se encontrar na amostra em mais de uma forma, tais como: inorgânica, organometálica, ou em diferentes estados de oxidação.

⁵ As interferências referem-se a presença na amostra de outros componentes físicos e/ou químicos.

Alternativamente, pode-se fazer um estudo de recuperação com material de referência, da seguinte forma (EURACHEM, 1998):

- Fazer seis leituras de matrizes de branco ou amostras e amostras fortificadas com o analito de interesse em uma faixa de concentração;
- Comparar as leituras das amostras fortificadas com as não fortificadas;
- Calcular a recuperação por:

$$r (\%) = 100(C_1 - C_2) / C_3 \quad (4.1)$$

Onde:

C_1 é a concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 é a concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 é a concentração de fortificação;

A especificidade é verificada pela relação entre a fortificação de amostra e a recuperação. Considera-se a relação entre a fortificação da amostra, f , e a recuperação, r :

$$r_j = c_0 + c_1 f_j + \varepsilon_j, \quad j=1,2,\dots,b \quad (4.2)$$

Se o método é específico, o coeficiente angular, c_1 , e o linear, c_0 , obtidos pelos mínimos quadrados, devem ser estatisticamente iguais a um e a zero respectivamente, ou seja, são testadas as seguintes hipóteses simultâneas, através da estatística de teste F, embora seja usual a utilização de individuais, utilizando-se a estatística de teste t de *Student*.

A necessidade de se testar hipóteses simultâneas se justifica, pois:

- Se $c_1 \neq 1$ implica que as interferências, Δ_s , afetam a inclinação da curva de calibração, de modo que a resposta é multiplicada por c_1 ;
- Se $c_0 \neq 0$ implica que as interferências, Δ_s , afetam o intercepto da curva de calibração, de modo que a resposta é acrescida de uma constante;

$$\left\{ \begin{array}{l} H_0 : \begin{bmatrix} c_0 \\ c_1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} \\ H_1 : \begin{bmatrix} c_0 \\ c_1 \end{bmatrix} \neq \begin{bmatrix} 0 \\ 1 \end{bmatrix} \end{array} \right. \quad (4.3)$$

A estatística de teste F é obtida pela expressão (4.4):

$$F_{\text{Calculado}} = \frac{b(c_0 - 0)^2 + 2\left(\sum_{j=1}^b x_j\right)(c_0 - 0)(c_1 - 1) + \left(\sum_{j=1}^b x_j^2\right)(c_1 - 1)^2}{2QM_r} \quad (4.4)$$

Com $F_{\text{Crítico}} = F_{1-\alpha}(2; b)$.

4.2 Avaliação das incertezas devidas à fortificação

Silva *et al*, 2001 apresentam um exemplo de medição de concentração de pesticidas em maçãs; neste exemplo eles descrevem uma metodologia para avaliação das incertezas devidas à fortificação, através da classificação das incertezas em duas categorias: incertezas de fontes conhecidas (CH) e incertezas sem modelo descritivo (SM).

- Conhecidas (CH): massa, vidraria volumétrica e quantificação instrumental após a modelagem da curva de calibração.
- Sem modelo descritivo (SM): Processamento da Amostra, PA, e Transferência de Massa, TM (extração, filtração, evaporação e purificação).

Procede-se à quantificação das incertezas das etapas do método analítico descrito como CH, as quais são combinadas em $u_{c(\text{CH})}$.

Para a obtenção da incerteza padrão combinada, $u_c(C)$, da concentração do analito, C de interesse, realiza-se um conjunto de ensaios fortificando replicatas antes do processamento da amostra, PA, e obtém-se o desvio-padrão experimental, S_{exp} .

Através do teste F, ao nível de significância de $\alpha=5\%$, compara-se S_{exp}^2 com $u_{c(\text{CH})}^2$. Duas situações podem ocorrer:

1) Se as duas estimativas da dispersão das medições são estatisticamente diferentes, a incerteza associada à SM é estimada por diferença⁶ com base na lei de propagação da incerteza, através da equação (4.5), onde F_c é o fator de correção do método analítico:

$$F_c = F_{\text{PAX}} F_{\text{TM}} \quad (4.5)$$

⁶ Se a diferença for negativa, considera-se estimada da incerteza associada à SM igual a zero.

Com F_{PA} e F_{TM} , os fatores de correção do processamento da amostra e transferência de massa, obtidos pelo inverso da média das respectivas recuperações.

$$S_{\text{exp}} \times F_c = \frac{u_{c(C)}}{C} = \sqrt{\left(\frac{u_{c(\text{CH})}}{\text{CH}}\right)^2 + \left(\frac{u_{F_c}}{F_c}\right)^2} \quad (4.6)$$

2) Quando as duas estimativas da dispersão não são estatisticamente significantes, não é necessário estimar u_F para se obter uma estimativa da incerteza do resultado final.

Por fim, combinam-se as demais fontes de incertezas padrão para a obtenção da incerteza expandida.

Quando se aplica essa metodologia para avaliação das incertezas ao método analítico, deve-se, na medida do possível, minimizar as fontes de incerteza CH, de modo a não mascarar as estimativas das fontes de incertezas SM com a dispersão ocasionalmente elevada gerada pelas primeiras.

As análises de ensaios com amostras fortificadas devem incluir todos os equipamentos e operadores envolvidos no tempo, de forma a reproduzir toda a variabilidade associada às etapas analíticas estudadas.