

6

Validação parcial das metodologias: Parâmetros analíticos de mérito e avaliação de interferências mútuas

6.1

Curvas de calibração

Demonstrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade é exigência crucial já que dados analíticos não confiáveis podem levar o analista a tomar decisões errôneas com prejuízos irreparáveis. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve passar pelo processo de validação. A validação de um método é um processo contínuo que inicia no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo do seu desenvolvimento. A maioria dos órgãos reguladores do Brasil e de outros países exige a validação de metodologia analítica e, para isso, tem estabelecido documentos oficiais que são diretrizes a serem adotadas no processo de validação (EURACHEM, 1998; USP, 2000; INMETRO, 2003). Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.

É possível distinguir dois tipos de procedimentos de validação. O primeiro, utilizado nesse trabalho, é chamado de validação no laboratório (*in house validation*) e consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório para validar os métodos novos desenvolvidos. A validação no laboratório é utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade do método. Segundo RIBANI e colaboradores (2004), pode-se considerar esta etapa como sendo preliminar à *validação completa (full validation)*.

O segundo tipo, validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios,

estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo.

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) redigiu um documento técnico que define um guia para validação de métodos analíticos que tem sido utilizado pela ISO (RIBANI, 2004). A norma internacional ISO/IEC 17025, que é uma norma específica para laboratórios de ensaio e de calibração, apresenta a "validação de métodos" como um dos requisitos técnicos importantes na qualidade assegurada dos laboratórios de ensaio, bem como a documentação do trabalho de validação (ISO, 1999). O órgão regulador para alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América (US-FDA, *United States Food and Drug Administration*) também tem proposto guias sobre validação de métodos (US-FDA, 2000).

Para as técnicas analíticas consideradas clássicas, tais como a gravimetria e a volumetria, o resultado da determinação analítica provém da combinação de medidas de massas e/ou volumes e de considerações sobre a estequiometria dos processos químicos envolvidos. Já para as técnicas instrumentais, é preciso fazer a medição de uma propriedade físico-química da amostra, que possa ser correlacionada com a sua composição. Assim, a natureza da medição efetuada depende da técnica empregada, tal como a luz absorvida ou emitida no caso dos métodos espectrofotométricos.

A correlação entre o sinal medido e a massa ou concentração da espécie a ser quantificada muito raramente é conhecida *a priori*. Na maior parte dos casos, a relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse deve ser determinada empiricamente a partir dos sinais medidos para massas ou concentrações conhecidas dessa espécie. Essa relação matemática, muitas vezes, pode ser expressa como uma relação linear entre uma variável aleatória y e uma variável não-aleatória x que é descrita pelo modelo representado na Equação 1:

Equação 1
$$y = Ax + B + \varepsilon$$

onde a interseção B corresponde ao branco experimental e o coeficiente angular A corresponde à sensibilidade experimental. Os parâmetros A e B normalmente são estimados usando regressão linear com ajuste por mínimos quadrados. O

termo ε representa o erro nos valores medidos de y . Na prática, métodos tais como a fosforimetria que usam medições definidas, podem ser calibrados por mínimos quadrados para que sejam obtidas estimativas confiáveis de x (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996; BARROS NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002).

Além dos coeficientes de regressão, também é possível calcular, a partir dos pontos experimentais, o coeficiente de determinação R^2 (ou correlação R). Este parâmetro permite estimar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo da unidade, maior a precisão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.

Admitindo-se que os erros nas medições têm média igual a zero e os mesmos não estejam correlacionados, a função linear (Equação 1) pode ser ajustada aos valores experimentais usando-se a estimativa por mínimos quadrados (MQ), também chamada de estimativa por mínimos quadrados ordinários.

O critério geral dos mínimos quadrados é expresso pela soma quadrática residual, SQ_r , mostrada na Equação 2.

Equação 2
$$SQ_r = \sum_{i=1}^m [(y_i - \hat{y}_i) / \sigma_i]^2 = \sum_{i=1}^m (d_{y_i} / \sigma_i)^2$$

onde σ_i é o desvio padrão no ponto i e m é o número de medições da calibração.

Adicionalmente, a SQ_r deverá ser minimizada, fazendo com que a expressão assumira seu valor mínimo e, dependendo do comportamento dos erros, o critério dos mínimos quadrados deverá ser modificado.

Se os erros se devem somente aos valores medidos para a variável dependente (o sinal analítico), y , se os erros σ_y são constantes nos diversos pontos da calibração (homocedasticidade) ou, se expressados pelas estimativas de σ , e se os erros em x puderem ser desprezados, o critério clássico dos mínimos quadrados gaussianos, normais ou ordinários pode ser aplicado, uma vez que se garante a homocedasticidade do conjunto (variância constante na faixa de calibração considerada).

Através de gráficos de resíduos, pode-se verificar se a variância não é constante no conjunto de calibração. Nestes gráficos, d_y (resíduo) freqüentemente é uma função de x com aparência afunilada. Nesses casos, a homocedasticidade pode ser avaliada de maneira simples com o teste de Hartley mostrado na Equação 3 :

Equação 3:
$$\hat{F} = s_{\max}^2 / s_{\min}^2$$

Onde s_{\max}^2 é a variância máxima e s_{\min}^2 é a variância mínima.

Em situações mais obscuras, segundo BARROS NETO e colaboradores (2002), é preciso aplicar o teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias. Em ambos os casos, o valor calculado deverá ser comparado com o valor crítico da distribuição e se este for maior que o crítico, a hipótese nula de que as variâncias são iguais deverá ser rejeitada.

Quando os erros σ_y nas medições variam, a heteroscedasticidade tem que ser admitida e o critério de mínimos quadrados se transformará no modelo de mínimos quadrados ponderados.

Por outro lado, se ambas as variáveis estão sujeitas a erros (erro no valor medido e na quantidade ou concentração do analito), deve-se fazer o ajuste por mínimos quadrados ortogonais.

Assim, a escolha do modelo a ser usado na calibração analítica dependerá da concordância com as condições mencionadas anteriormente e do procedimento de calibração.

Normalmente, as calibrações experimentais são realizadas fazendo-se determinações em uma série de amostras de calibração contendo o analito de interesse em quantidades adequadas. Se possível, usam-se materiais cujas concentrações são conhecidas com o máximo de confiança, isto é, com alta precisão e exatidão. Na prática, usam-se como amostras de calibração materiais de referência certificados, padrões contendo um ou vários componentes, e materiais-padrão sintéticos (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002).

As quantidades ou concentrações das amostras de calibração são tomadas como "verdadeiras" e isentas de erro, ou então admite-se que, os erros aleatórios de x são desprezíveis em relação aos de y . Nessas condições, deve-se usar a função de calibração descrita na Equação 4:

Equação 4
$$y = B_x + A_x x + e_y$$

Se houver homocedasticidade, os parâmetros B_x e A_x são estimados pelo algoritmo gaussiano (normal) dos mínimos quadrados.

O coeficiente de correlação (r_{xy}), que é uma medida da relação entre duas variáveis aleatórias, não tem nenhum significado na calibração feita nas

condições mencionadas, uma vez que os valores de x em um experimento de calibração não são grandezas aleatórias.

As incertezas dos valores de y estimados pela calibração e dos resultados analíticos (quantidades ou concentrações dos analitos) estimados através dos modelos de calibração, diferem entre si. A incerteza nos valores de y na calibração é caracterizada pelo intervalo de confiança, enquanto a incerteza nos valores estimados de x é caracterizada pelo intervalo de previsão. Desta forma, o intervalo de previsão de um valor medido de y , também influenciará na definição do valor crítico (limite de decisão), do limite de detecção, e do limite de quantificação (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002).

Segundo BARROS NETO e colaboradores (2002), a precisão na calibração é caracterizada pelo Desvio padrão residual, pela estimativa do desvio padrão da estimativa do coeficiente angular A , pela estimativa do desvio padrão da estimativa de uma média \hat{y}_e na posição x_i , pela estimativa do desvio padrão de um valor previsto \hat{y}_p na posição x_i , pela estimativa do desvio padrão de uma média $\hat{\bar{y}}_p$ prevista a partir de n repetições na posição x_i , e pela estimativa do desvio padrão de uma média $\hat{\bar{x}}_p$ prevista a partir de n repetições na posição x_i . Em um texto bastante completo, os autores relacionam todas as equações para o cálculo desses erros especiais (BARROS NETO; PIMENTEL; ARAUJO, 2002).

Quando existirem efeitos de matriz e não se dispõe de amostras de calibração com uma matriz semelhante, o método de adições de padrão pode ser o mais indicado. Este método é utilizado com frequência em sistemas ambientais e bioquímicos e na análise de ultratraços em geral. Adicionando-se soluções-padrão à amostra, produz-se na série de calibração um comportamento semelhante ao da amostra, desde que o analito no padrão adicionado esteja na mesma forma da amostra.

O modelo de adições de padrão (ou de analito) é baseado no fato de que o branco não apresenta valor estatisticamente diferente de zero ou que esse valor pode ser eliminado e se x_0 é a concentração inicial do analito na amostra que está sendo investigada (Equação 5), então:

Equação 5
$$y_0 = A_x x_0$$

onde y_0 é o valor medido para a amostra sem adição de padrão. Quantidades conhecidas, x_i , do analito são adicionadas à amostra, de preferência em teores

equimolares de x_i , na faixa de $x_1 \gg x_0$, $x_2 = 2x_1$, ..., $x_p = px_1$ (normalmente com $p = 3$ ou 4).

A função de calibração por adição de padrão será, então, estimada por mínimos quadrados e o procedimento se justificará se a sensibilidade da determinação das espécies na amostra for igual à das espécies adicionadas.

Quando o branco apresentar um valor diferente de zero, deve-se estimá-lo a partir de um número suficientemente alto de medições do branco, e então proceder correção dos valores medidos em relação a ele. Para garantir um modelo de calibração adequado por adições de padrão, deve-se realizar $p \geq 2$ adições de padrão (onde p é o número de amostras com adição de padrão). Uma única adição (repetida m_i vezes) só pode ser feita quando se tiver certeza de que o modelo linear é adequado. Se a linearidade na faixa $x < x_0$ tiver sido apenas admitida, e não verificada experimentalmente, a calibração por adições de padrão torna-se um método pouco confiável. No entanto, praticamente não existe alternativa, quando se suspeita da presença de efeitos de matriz.

Por outro lado, se a análise visual dos dados graficados mostrar que as retas obtidas quando se trabalha com a curva aquosa (X_1) e a curva de adição padrão (X_2) são aproximadamente paralelas, isto é, parecem possuir a mesma inclinação, um teste de paralelismo pode ser aplicado. As hipóteses admitidas serão:

H_0 = as linhas são paralelas (as inclinações não diferem)

H_1 = as linhas não são paralelas (as inclinações diferem)

e a análise de variância de Y em função de X_1 e de X_2 permitirá avaliar se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{critico}}$. Neste caso, não se rejeita H_0 e as duas curvas produzem linhas paralelas ($p < 0,05$), o que indica não haver efeito de matriz (GARDINER, 1997).

Desta forma, fica claro que para se aplicar o modelo de calibração adequado, é importante testar as condições anteriormente citadas. Inicialmente, pode-se usar um programa computacional para examinar visualmente os erros residuais de um dado modelo de calibração, obtendo-se assim uma informação preliminar sobre as características destes erros. Gráficos típicos de desvios residuais também podem indicar quais os testes que devem ser realizados, tais como os de aleatoriedade, de normalidade, de linearidade e de homocedasticidade, entre outros.

A análise dos gráficos dos resíduos traçados revelou, em todos os estudos, que os pontos se distribuem uniformemente com o incremento da

variável de resposta Y, além de apresentarem uma distribuição ao redor do resíduo igual a zero (valor predito igual ao valor experimental). Adicionalmente, o gráfico da probabilidade normal, mostrou que a variância é constante durante os intervalos considerado, podendo ser aplicado o modelo de regressão simples. O teste de Dixon para *outliers* confirmou a análise visual do gráfico dos resíduos versus os valores preditos, não eliminando nenhum ponto.

6.2 Linearidade

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição ou do comportamento físico-químico da espécie interrogada.

Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa poderá ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho.

A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível realizar a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

Desta forma, a linearidade reproduzirá a habilidade de uma metodologia analítica em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração, sendo obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real (Equação 1).

O coeficiente de correlação linear (R) é freqüentemente usado para indicar o quanto pode ser considerada adequada uma reta como modelo matemático. Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

(INMETRO), um valor acima de 0,90 é, normalmente, requerido e o método poderá ser considerado como livre de tendências (*unbiased*) se o intervalo de confiança da reta de regressão linear contiver a origem (INMETRO, 2003).

O coeficiente de determinação ou coeficiente de correlação múltipla (R^2) é a razão entre a soma quadrática explicada pela regressão e a soma quadrática total e também é comumente chamada de variação percentual explicada pelo modelo. Como a capacidade explicativa do modelo está incluída no intervalo $0 \leq R^2 \leq 1$, quanto mais próximo de 1 estiver o valor de R^2 , mais o modelo consegue descrever a variação em y .

Segundo BARROS NETO e PIMENTEL (1996), um erro comum é interpretar a raiz quadrada do coeficiente de determinação como sendo o coeficiente de correlação entre x e y . Conforme os autores, isto só é válido para o ajuste de uma reta e o que R realmente representa é o coeficiente de correlação entre os valores observados e os valores estimados pelo modelo.

Outro erro comum que os autores apontam é o de se usar o valor numérico de R^2 , ou de sua raiz quadrada, R , para avaliar um modelo e concluir sobre a validade do ajuste caso esse valor seja suficientemente alto. Um valor de $R^2 = 0,98$ ($R = 0,99$) apesar de bastante alto, significa apenas que 98% da variação total em torno da média foi explicada pelo modelo e nada impede que os 2% restantes indiquem falta de ajuste. Assim, PIMENTEL e BARROS NETO (1996) enfatizam que o correto é se usar o teste F para falta de ajuste, como já mencionado.

Pode-se avaliar se o modelo linear é adequado examinando-se a distribuição dos resíduos ao longo dos valores de x . Neste caso, se os erros distribuem-se aleatoriamente em torno da linha zero, pode-se inferir que o modelo linear é adequado. Caso os erros apresentem desvios sistemáticos, o modelo linear será inadequado e um modelo não-linear descreverá melhor o sistema. Segundo BARROS NETO e colaboradores (2002), a hipótese de linearidade pode ser testada de duas maneiras: *a priori* (sem levar em consideração nenhum modelo não-linear), comparando-se o desvio padrão residual, $s_{y,x}$, com o desvio padrão dos valores y_{ij} em relação a suas médias e *a posteriori* (em relação a um dado modelo não-linear), comparando-se o desvio padrão residual do modelo linear com o desvio padrão residual do modelo não linear.

Assim, o intervalo de massas ou concentrações dentro do qual pode-se construir uma curva analítica linear é chamado de faixa linear dinâmica. Ainda que as causas para a perda de linearidade sejam características de cada

técnica, este é um fenômeno que pode ocorrer com qualquer conjunto de dados. Por outro lado, o cálculo dos coeficientes de regressão de uma curva analítica deve ser acompanhado de uma cuidadosa inspeção, para verificar se todos os pontos a serem usados estão dentro da faixa linear dinâmica correspondente.

Dentro da faixa linear dinâmica e na hipotética ausência de erros indeterminados ($R^2 = 1$), todos os pontos teriam resíduo de interpolação igual a zero ($r_i = 0\%$). Na prática, sempre existem erros experimentais e, portanto $r_i \neq 0\%$ para qualquer ponto experimental usado na construção da curva. Se um gráfico dos r_i em função das massas ou concentrações for construído, dentro da faixa linear observar-se-á que os resíduos se distribuirão aleatoriamente entre valores positivos e negativos. Entretanto, para massas ou concentrações maiores que o limite da faixa linear, geralmente o sinal medido é menor que o sinal interpolado a partir da curva analítica. Deste modo, do final da faixa linear em diante, a tendência geral é de todos os valores de r_i serem negativos.

Curvas de resposta entre a quantidade de analito depositada no substrato e o sinal fosforescente medido (curvas analíticas) dos sete hidrocarbonetos nitrogenados e sulfurados foram construídas em etanol e em iso-octano, para melhor representar uma matriz de derivado de petróleo (gasolina). Cada ponto da curva é uma réplica autêntica, tendo sido feitas três réplicas autênticas para cada concentração testada. As medições foram obtidas nos comprimentos de onda máximos, que por sua vez, não variaram significativamente em função da variação da concentração em nenhum dos casos. A melhor reta entre os pontos experimentais foi traçada com ajuda do software Microcal Origin 6.0[®] (Northampton, USA). A Figura 25 e a Figura 26 mostram as curvas analíticas traçadas para os sete analitos de interesse e as respectivas faixas lineares. A equação da curva e o coeficiente de determinação (R^2) estão indicados nas Figuras. Em todos os casos os valores de R^2 indicam que os modelos explicam pelo menos 99% da variação total em torno da média, com exceção da curva traçada para o DBT, onde o valor foi de 97%.

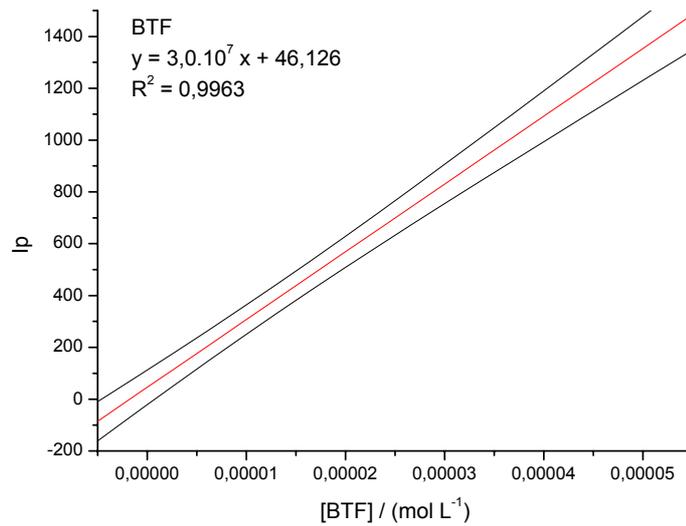
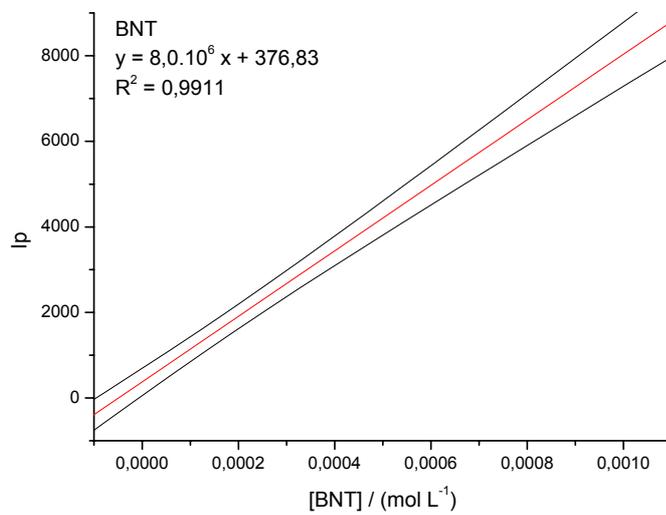
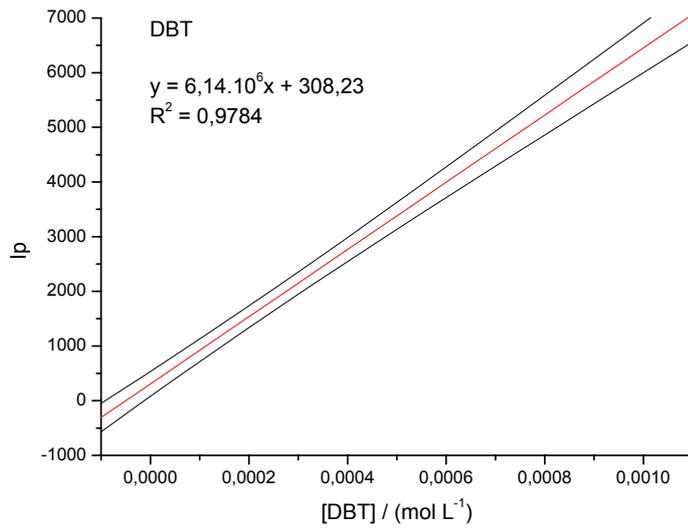


Figura 25: Regressão linear (curvas analíticas) para o DBT, para o BNT e para o BTF obtidas nas condições otimizadas da Tabela 11. As linhas curvas são as hipérboles que definem os intervalos de confiança (95%) da reta de regressão. O intervalo de confiança para a concentração estimada a partir de um sinal observado I_p , pode ser obtido no eixo x.

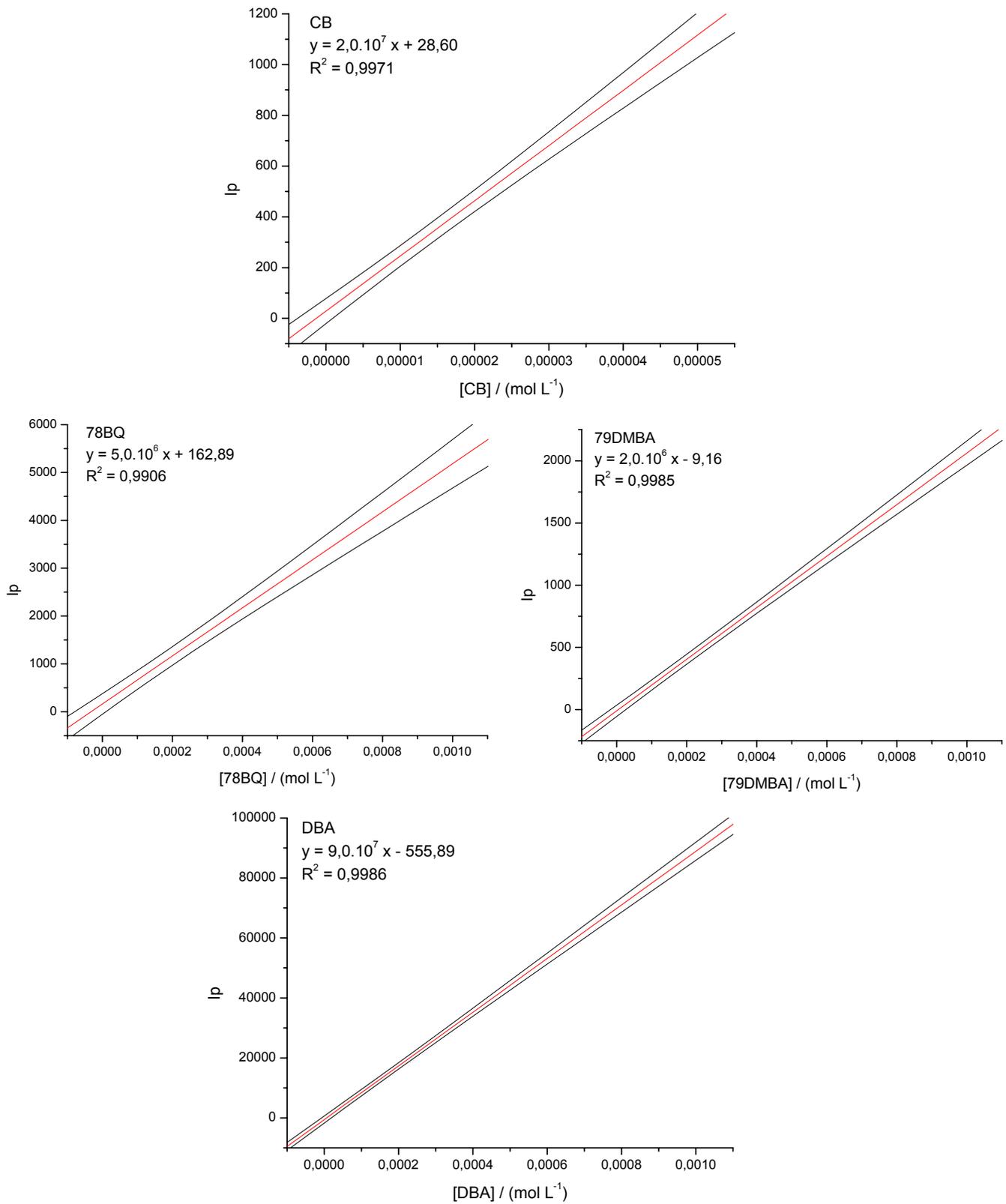


Figura 26: Regressão linear (curvas analíticas) para o CB, para a 78BQ, para a 79DMBA e para a DBA obtidas nas condições otimizadas da Tabela 11. As linhas curvas são as hipérbolas que definem os intervalos de confiança (95%) da reta de regressão. O intervalo de confiança para a concentração estimada a partir de um sinal observado I_p , pode ser obtido no eixo x.

Com a obtenção das retas de regressão, o primeiro passo na sua interpretação é verificar o sinal de B (Equação 1). Se for positivo, indica que, quanto maior o valor de X, maior o valor de Y; se negativo, indica que quanto maior o valor de X, menor o valor de Y. Neste caso, B representa o acréscimo médio de Y para um acréscimo unitário de X. Esta quantidade pode ser negativa, situação em que para um acréscimo de X corresponde um decréscimo de Y. Um valor negativo significa que, mesmo quando não existe intensidade de sinal, o valor da concentração é maior do que zero. Ao se expressar Y em função de X e supondo-se que teoricamente a concentração pudesse assumir o valor zero, chega-se ao resultado hipotético que a intensidade deveria ser negativa. Como isso é fisicamente impossível, o significado prático é que para cada intensidade de sinal, existe um valor mínimo observável.

Segundo PIMENTEL e BARROS NETO (1996), intuitivamente pode-se avaliar a qualidade do modelo comparando-se a soma quadrática explicada pelo modelo (SQ_{reg}) com a soma quadrática residual (SQ_r). Quanto maior o valor de SQ_{reg} , em relação ao valor de SQ_r , melhor seria o modelo. Entretanto, esta abordagem não leva em conta o fato que cada termo acrescentado (pois quanto maior o número de termos maior a variação explicada pelo modelo) tira do modelo um grau de liberdade. Assim, é preciso avaliar se o grau de liberdade retirado por um termo adicional é compensado pelo aumento na quantidade de variação que passou a ser explicada pelo modelo. Ainda segundo os mesmos autores (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996), isto pode ser feito comparando-se as médias quadráticas que são obtidas dividindo-se as somas quadráticas da regressão (MQ_{reg}) e dos resíduos (MQ_r) por seus respectivos graus de liberdade (v_{reg} e v_r). Quanto maior o valor da razão MQ_{reg}/MQ_r , melhor será o modelo.

Na hipótese que $y = 0$, ou seja, de que não exista relação linear entre as variáveis y e x, tanto a média quadrática devida á regressão quanto a média quadrática residual serão estimativas da variância populacional e refletirão apenas o erro aleatório. Esta hipótese poderá ser avaliada por meio de um teste F, que compara a razão MQ_{reg}/MQ_r com o valor crítico (tabelado) de F_{v_{reg},v_r} . Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias (maior do que o valor tabelado) indicará a existência de uma relação linear entre as duas variáveis. Adicionalmente, quanto maior for a razão MQ_{reg}/MQ_r e o valor de F, mais significativa será esta relação (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996). Alguns autores recomendam que MQ_{reg} deve ser pelo menos cinco vezes maior que MQ_r para que a regressão tenha utilidade prática (DRAPER; SMITH, 1981; PIMENTEL; BARROS NETO, 1996).

A validade do modelo pode ser investigada, também, através de um teste t de Student, que trata como hipótese nula (H_0) a premissa de que intensidade de sinal fosforescente e concentração de analito não se relacionem linearmente. Em um nível de significância de 5%, o valor calculado de t comprovará ou rejeitará esta hipótese, complementando e reforçando o teste F anteriormente descrito.

Como mostrado na Tabela 13, que resume a análise de variância (ANOVA) dos dados experimentais obtidos para cada composto estudado, t calculado, em todos os casos, possui um valor bastante superior ao valor crítico ($t_{0,05,14}=2,145$ ou $t_{0,05,18}=2,101$ dependendo do caso), que permite rejeitar a hipótese nula, resultando em um modelo que relaciona linearmente intensidade de sinal e concentração.

O Valor p é o menor valor de α (significância) para o qual rejeitamos a hipótese nula. Se $\alpha=0,05$, então, para um valor $p \geq 0,05$ não rejeita-se H_0 , caso contrário, rejeita-se H_0 . Em todos os casos mostrados na Tabela 13, $p < 0,05$. Assim, temos que, ao nível de 5% de significância, rejeita-se H_0 , resultando em um modelo que relaciona linearmente intensidade de sinal fosforescente e concentração e é estatisticamente válido. Adicionalmente, $F_{\text{calculado}}$ é muito maior que o $F_{\text{crítico}}$, mostrando que existe uma associação linear entre as variáveis (mesmo resultado do teste t).

Tabela 13: Resumo da análise de variância (ANOVA) das regressões.

	SQ_{reg}	SQ_r	Teste F	Teste t	p
DBT	$8,5 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	633,4	25,2	$4,7 \times 10^{-13}$
BNT	$1,4 \times 10^8$	$1,3 \times 10^6$	2039,5	45,2	$8,5 \times 10^{-21}$
BTF	$1,2 \times 10^6$	$4,6 \times 10^3$	813,1	28,5	$9,5 \times 10^{-5}$
CB	$8,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	1035,9	32,2	$6,6 \times 10^{-5}$
78BQ	$2,0 \times 10^7$	$1,9 \times 10^5$	525,4	22,9	$2,9 \times 10^{-6}$
79DMBA	$3,3 \times 10^6$	$4,9 \times 10^3$	2721,5	52,2	$8,1 \times 10^{-7}$
DBA	$6,7 \times 10^9$	$9,2 \times 10^6$	4413,7	66,4	$7,8 \times 10^{-10}$

6.3

Sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação

Sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito (capacidade de discriminar concentrações próximas). Pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração, conforme a Equação 6 e é determinada simultaneamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada e não deve ser confundida com o limite de detecção (LANÇAS, 2004).

Equação 6
$$S = \frac{dx}{dc}$$

Onde:

S = sensibilidade;

dx = variação da resposta;

dc = variação da concentração.

Quando são realizadas medições em amostras com baixas concentrações do analito é importante saber qual o menor valor desta que pode ser detectado pelo método.

A importância desta determinação e os problemas associados a ela advêm do fato de que a probabilidade de detecção não muda rapidamente de zero para um quando seu limiar é ultrapassado. Os problemas têm sido investigados estatisticamente e diversos critérios de decisão têm sido propostos.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão ruído/sinal do equipamento. Já o limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. Assim, pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato. Na prática, o limite de detecção (LD) é determinado como a menor concentração do analito que pode ser diferenciada do ruído do sistema com segurança. O LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito e pode variar em função do tipo da amostra. É

fundamental, portanto, assegurar-se de que todas as etapas de processamento do método analítico sejam incluídas na determinação desse limite de detecção.

Para a validação de um método analítico, é normalmente suficiente fornecer uma indicação do nível em que a detecção do analito começa a ficar problemática, ou seja, “Branco + 3s” e “ 0 + 3s “, considerando análise de sete ou mais amostras de branco e de brancos com adição, respectivamente (INMETRO, 2003).

O Limite de Quantificação (LQ), algumas vezes também denominado Limite de Determinação, é a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão (INMETRO, 2003).

Em um trabalho bastante completo, o INMETRO (2003) apresenta as metodologias para as medições quantitativas do limite de detecção e do limite de quantificação.

Adicionalmente, as metodologias desenvolvidas para os sete CPA sulfurados e nitrogenados foram avaliadas pelas estimativas dos limites de detecção absoluto (LDA) e dos limites de quantificação absoluto (LQA). Esses parâmetros (Equação 7 e Equação 8) permitem avaliar a capacidade de determinação em termos de massa de analito efetivamente depositadas no substrato.

$$\text{Equação 7} \quad \text{LDA} = (3 S_b / m) \times V \times \text{MM}$$

$$\text{Equação 8} \quad \text{LQA} = (10 S_b / m) \times V \times \text{MM}$$

Nestas equações, S_b é o desvio padrão da medição do sinal fosforescente de 10 brancos, m é a sensibilidade da curva analítica em mol L^{-1} , V é o volume de amostra aplicado ($5,0 \times 10^{-6}$ L) e MM é a massa molar do analito em g mol^{-1} .

A Tabela 14 mostra os LDA e LQA para o sete analitos, estimados usando as condições experimentais e instrumentais selecionadas e otimizadas para cada analito. Os limites de detecção absolutos, calculados para 5 μL de amostra, foram da ordem de pg. Os limites de quantificação e os valores de massa efetiva da faixa de trabalho estão também indicados na Tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros de sensibilidade e faixa de aplicação. Condições instrumentais e experimentais otimizadas (Tabela 11 e Tabela 12).

Analito	LDA	LQA	Faixa de aplicação (ng)
DBT	490 pg	1,6 ng	0,49 a 921
BNT	600 pg	2,0 ng	0,6 a 1170
BTF	60 pg	0,2 ng	0,06 a 34
CB	80 pg	0,3 ng	0,08 a 8360
BQ	200 pg	0,7 ng	0,2 a 896
79DMBA	200 pg	0,7 ng	0,2 a 1287
DBA	5 pg	17,0 pg	0,005 a 1407

6.4 Exatidão e Precisão

A exatidão da metodologia é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro (LANÇAS, 2004). A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência).

A determinação da tendência total com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser expressa como recuperação analítica (valor observado/valor esperado) e deve ser corrigida ou demonstrada ser desprezível. Apesar disso, em ambos os casos, a incerteza associada com a determinação da tendência permanece como um componente essencial da incerteza global.

Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão de um método são, entre outros, o uso de materiais de referência, a participação em comparações interlaboratoriais e a realização de ensaios de recuperação.

Já a precisão é um termo geral que avalia a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo. Repetitividade e reprodutibilidade são geralmente dependentes da concentração do analito e, deste modo, devem ser determinadas para um diferente número de

concentrações e, em casos relevantes, a relação entre precisão e a concentração do analito deve ser estabelecida (INMETRO, 2003).

A repetitividade é definida como o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade que, segundo o INMETRO (1995), são mesmos procedimentos de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo.

A repetitividade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição a branco em várias concentrações na faixa de trabalho. O INMETRO (2003) sugere 7 ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (INMETRO, 1995). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando se busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos através de comparação interlaboratorial.

Vários fatores podem afetar a precisão das medições na fosforimetria em superfície sólida na temperatura ambiente (SSRTP). Entre eles podemos destacar as variações da posição em que os volumes de solução de surfactante, de sal de metal pesado e de analito são colocados no papel, a posição do substrato acessório do instrumento de medição, a presença de oxigênio e de umidade no ambiente que envolve o substrato e a amostra.

A precisão das medições foi avaliada pela repetitividade e expressa através do cálculo do desvio padrão relativo (DPR). Para esse cálculo, volumes de 5 μL de soluções de analito de concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram depositadas em sete substratos de celulose. Cada analito foi testado nas condições experimentais estabelecidas como ótimas. Os resultados mostraram que uma variação entre 0,27 e 1,6%, o que pode ser considerado excelente para essa técnica, que por ser realizada em substrato sólido, está sujeita a flutuações na homogeneidade (porosidade, espessura) dos próprios substratos. Além disso, o sinal de fundo original do substrato varia significativamente entre diferentes folhas de papel filtro de um mesmo lote e também em função da posição de

onde o substrato foi cortado numa mesma folha de papel. Em geral, para SS RTP são reportados resultados de repetitividade de até 15%. Para outras concentrações diferentes de $1,0 \times 10^{-5}$, uma rápida avaliação da repetitividade pode ser vislumbrada pela variância dos pontos equivalentes a tais concentrações na curvas analíticas.

6.5 Seletividade

A seletividade corresponde à capacidade de uma metodologia em determinar o analito de maneira inequívoca na presença de outras substâncias susceptíveis de interferirem na medição (LANÇAS, 2004). Adicionalmente, a farmacopéia americana define seletividade de uma metodologia analítica como sua habilidade em medir, de forma exata, um analito na presença de interferentes as quais se espera estejam presentes na matriz da amostra. Isso inclui precursores de síntese, isômeros, produtos de decomposição, entre outros (USP, 1990).

A seletividade é um parâmetro de grande importância na análise de amostras complexas e tem sido empregado como sinônimo de especificidade, apesar da objeção de alguns autores (CHASIN, 1998). Neste caso, o termo específico refere-se a um método que produz uma resposta para um único analito, enquanto o termo seletivo refere-se a um método que fornece resposta a um grupo de entidades químicas que podem ou não ser distinguíveis umas das outras (LANÇAS, 2004).

Um experimento que avalia as interferências mútuas entre as sete substâncias envolvidas neste trabalho foi feito objetivando-se verificar se a escolha das condições experimentais específicas é capaz de gerar espectros que não sofram interferências (sejam elas espectrais ou não-espectrais) dos outros compostos presentes. Para tal, misturas sintéticas equimolares ($5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) contendo os sete CPA tiveram sua fosforescência medida (I_{A+i}) e comparada com o sinal fosforescente emitido por soluções-padrão contendo apenas um dos analitos de interesse (I_A). Essa comparação foi feita pela razão do sinal do analito na mistura e na respectiva solução padrão (I_{A+i} / I_A), onde um resultado igual ou muito próximo da unidade indica a ausência de qualquer interferência. No caso de razão acima da unidade tem-se interferência espectral e, no caso do valor obtido ser inferior a um, tem-se interferência não-espectral no

sinal do analito. Neste último caso, a interferência poderá ser corrigida por meio de calibração por método de adição de analito.

Os resultados mostram algumas situações bastante favoráveis, com interferência mínima nos sinais medidos para o BTF e o DBT, indicando a grande seletividade na escolha das condições experimentais para medição de fosforescência desses analitos. Uma interferência espectral um pouco mais elevada, mas ainda indicando um resultado bastante promissor, foi obtida com CB, BQ e DBA. Maior comprometimento pode ser observado para a 79DMBA e mais intensamente para o BNT, onde percebe-se intensa interferência espectral.

Razões entre o sinal da mistura de analitos e o sinal dos analitos.
Concentração dos analitos: $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Analito	I_{A+I} / I_A
BTF	1,12
BNT	274
DBT	1,15
BQ	1,94
CB	2,21
79DMBA	18,6
DBA	1,50

Vale ressaltar que o uso de arranjos instrumentais e/ou matemáticos tais como varredura sincronizada, derivada de ordem superior ou redução da banda espectral de passagem podem reduzir ou até mesmo resolver este tipo de interferência, desde que observadas as condições experimentais específicas. No entanto, como os estudos anteriores mostraram, é possível encontrar outras condições experimentais que, embora não produzam o sinal fosforescente mais intenso, podem fornecer maior seletividade nas determinações. Neste caso, cada situação particular deverá ser avaliada.

6.6 Robustez

De acordo com o INMETRO (2003), a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por modificações pequenas e deliberadas em seus parâmetros. Neste trabalho, a robustez das metodologias fosforimétricas foi avaliada pela variação de parâmetros como o tipo de papel que constitui o substrato sólido, o fabricante e o lote dos reagentes e o tempo de secagem das aplicações no substrato, não havendo, nestes casos, variação significativa ($\alpha=5\%$) entre os resultados obtidos. Segundo o INMETRO (2003), em trabalhos nos quais há mudanças de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação das metodologias, sem alteração significativa nos resultados, pode-se dizer que o método possui uma robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças de ambiente de análise.

Para determinar a robustez de um método, o INMETRO (2003) recomenda o teste de *Youden*. Este teste permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Estas mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando uma metodologia é transferida para outros laboratórios, analistas ou equipamentos.