4
Resultados e discussão – Validação do método

A necessidade de se evidenciar a qualidade das medições em Química, pela comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos resultados tem sido, cada vez mais, reconhecida e requerida. Para se garantir a geração de informações confiáveis e interpretáveis sobre as amostras em análise, o método analítico deve passar por um processo de validação. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento. Vários autores e/ou órgãos definem o conceito de validação de métodos, sendo que este conceito evolui continuamente, entre eles:

"A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados" (ANVISA).[49]

"Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer" (EURACHEM).[50]

"Validação é a confirmação por testes à apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso intencional" (Norma ABNT NBR/IEC 17025).[51]

Dentro do âmbito geral de validação de métodos é possível distinguir dois tipos: O primeiro, a validação no laboratório ("in house validation") que consiste das etapas de validação em um único laboratório para validar um método novo, devendo ser utilizada nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia, em que são avaliadas todas as suas características de desempenho, porém sem verificar a reprodutibilidade interlaboratorial. O segundo tipo, a validação completa ("full validation"), envolve, além das características de desempenho, um estudo interlaboratorial, que tem como objetivo verificar como a

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

metodologia se comporta na análise de uma determinada matriz comparando os resultados obtidos em laboratórios independentes, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada.

Os parâmetros analíticos para validação de métodos vêm sendo definidos e re-definidos nacionalmente e internacionalmente e devem ser baseados na intenção do uso do método. Definidas as melhores condições experimentais de intensidade de sinal fosforescente, tornou-se passível obter e apresentar os "parâmetros analíticos de mérito", que são conhecidos também como "parâmetros de desempenho analítico" ou "características de desempenho" ou ainda "figuras analíticas de mérito": linearidade, capacidade de detecção (limite de detecção, LD e quantificação, LQ), robustez, precisão (repetitividade e reprodutibilidade) e tendência ou recuperação (%).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

4.1. Linearidade

A linearidade é o comportamento segundo a qual a resposta analítica medida encontra-se em proporção direta e linearmente relacionada com as concentrações ou quantidades das substâncias em estudo. Para o estudo da linearidade faz-se necessária à construção de uma curva de calibração ou curva analítica, sendo que o eixo x indica a concentração ou quantidade do mensurando (a variável independente) e o eixo y indica a intensidade fosforescente (a variável dependente). Sistemas definidos por modelos quadráticos ou até de ordem superior também podem ser utilizados para este tipo de correlação entre variáveis independente e dependente. No entanto, o modelo linear, que é definido pela equação da reta (equação 1) é o mais simples de se utilizar.

$$y = ax + b \qquad (1)$$

Na equação 1, *"a"* é coeficiente angular, expressa a inclinação da curva aos eixos e "*b"* é coeficiente linear, expressa a intersecção da curva aos eixos.

A determinação desta equação está baseada no estudo do comportamento das duas variáveis em questão, buscando identificar a existência de uma relação definida entre elas. A técnica que melhor se enquadra neste objetivo é conhecida como regressão linear usando o método dos mínimos quadrados, que uma forma de estimar qual a melhor reta que passa pelos pontos da curva analítica obtida experimentalmente. A regressão deveria ser ponderada caso o comportamento das variâncias fosse heteroscedástico. É importante calcular o coeficiente de regressão linear para comprovar a existência de uma relação linear. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A ANVISA[49] recomenda um valor igual ou superior a 0,99 e o INMETRO[52] um valor acima de 0,90. Optou-se neste trabalho por considerar como adequados os valores de coeficiente de correlação (r) igual ou acima de 0,90.

4.1.1. Linearidade do criseno

Experimentos consecutivos foram realizados para construção da curva para o criseno em substrato sólido contendo SDS e nitrato de prata a fim de se avaliar a confiabilidade do método e a repetitividade dos resultados ao longo do tempo. Adotou-se para tal uma diferença entre os coeficientes angulares menores ou iguais a 10%. A faixa de massas de criseno testadas ficou entre 5,9 ng (5 µL de solução 5,2 x 10^{-6} mol L^{-1}) e 59 ng (5 µL de solução 5,2 x 10^{-5} mol L^{-1}). Concentrações maiores de criseno não foram testadas por causa das limitações de solubilidade do composto no sistema de solventes (etanol/água 50/50% v/v) e por se ter adotado o uso de apenas uma adição de 5 µL de analito. Essa faixa mais estreita também garantiu maior probabilidade de comportamento linear por causa da menor variação da proporção analito/sal de átomo pesado. Uma curva analítica encontra-se na Figura 47 indicando a resposta

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

fosforescente do criseno em função da quantidade de analito depositada no papel (média das três medições com seus respectivos desvios padrões, ± 1s). A Tabela 21 mostra o resumo dos dados extraídos dos últimos experimentos (três curvas analíticas) realizados neste trabalho.

Ao se avaliar os resultados médios e desvios-padrão, vê-se que não existe erro sistemático associado, pois a faixa de valores para o coeficiente linear inclui o zero. Isso se deu por causa do baixo sinal de fundo do substrato contendo nitrato de prata e que pôde ser compensado pela correção da medição do branco. Pôde-se observar com a variação de 6% do desvio padrão no valor do coeficiente angular, que não se tem praticamente diferença significativa ao longo do período de 2 meses (novembro/06 a janeiro/07), mesmo estando presentes as variações diárias em termos, por exemplo, do controle da intensidade da fonte de excitação e fluxo do gás de purga. O coeficiente de determinação (R^2) ou correlação (r) mostram a consistência do comportamento linear obtido, pois em SSRTP vários fatores podem vir a provocar a observação de valores de R^2 menores que 0,99, entre eles, a dependência entre a proporção da massa de sal de átomo pesado e de analito. Na medida em que a massa de $AgNO_3$ foi mantida constante e a massa de criseno foi alterada em uma ordem de grandeza na curva, desvios grandes de sinal poderiam acontecer. No entanto, nesse caso, o comportamento indicou a robustez do parâmetro em termos de quantidade de indutor de fosforescência.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

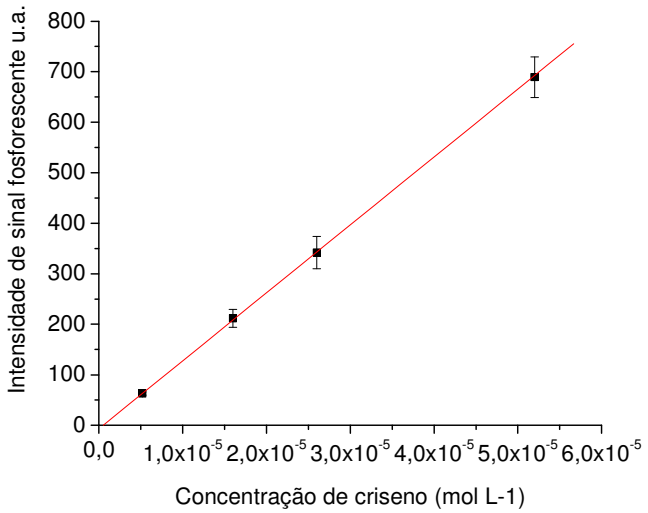

Figura 47: Curva analítica para o criseno (em termos de concentração dos 5 µL de solução) utilizando substrato contendo SDS (360 µg) e $AgNO_3$ (30 µg).

Tabela 21: Resumo dos dados extraídos dos três últimos experimentos (curvas analíticas) para o criseno

	R^2		
	0,974	1,000	0,982
Média R^2 ± s	0,985 ± 0,013		
Coef angular (a)	1,35 x 10^7	1,33 x 10^7	1,20 x 10^7
Média (a) ± s	(1,30 ± 0,83) x 10^7		
Coef. Linear (b)	-12,16	-4,589	-37,077
Data	23/11/2006	14/12/2006	4/1/2007

4.1.2. Linearidade do pireno

Da mesma forma como realizado para o criseno, curvas de respostas entre a concentração da solução de analito depositada no substrato sólido e a intensidade de sinal fosforescente medido para o pireno, nas condições experimentais estabelecidas anteriormente (solução carreadora de analito em meio básico, em substratos contendo 993 µg de $Pb(NO_3)_2$) foram realizadas indicando a resposta fosforescente do pireno em função da quantidade de analito depositada no papel (entre 5,9 e 121 ng de pireno). A Figura 49 ilustra as médias das três medições com respectivos

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

desvios-padrão (± 1s). Na Tabela 22 é mostrado o resumo dos dados extraídos dos três últimos experimentos (curvas analíticas) que foram realizadas neste trabalho.

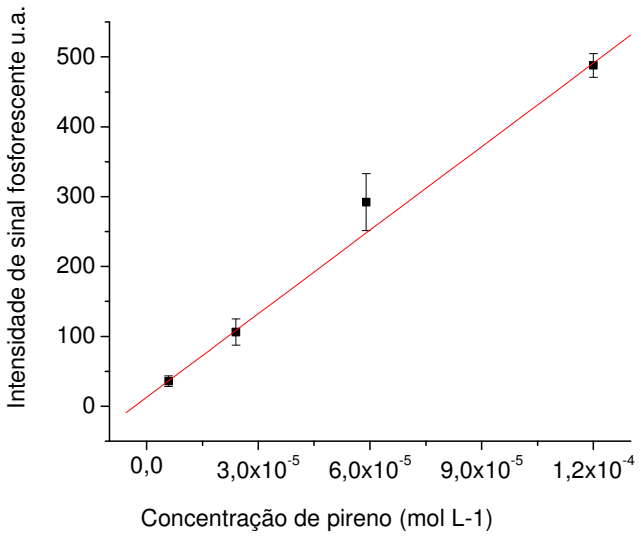

Figura 48: Curva analítica para o pireno (em termos de concentração dos 5 µL de solução carreadora em meio básico) utilizando substrato contendo $Pb(NO_3)_2$ (993 µg).

Tabela 22: Resumo dos dados extraídos dos três últimos experimentos (curvas analíticas) para o pireno

	R^2		
	0,989	0,994	0,995
Média	0,993 ± 0,03		
Coef angular (a)	$4,07 \times 10^{-6}$	$4,85 \times 10^{-6}$	$3,87 \times 10^{-6}$
Média	$(4,27 \pm 0,52) \times 10^{-6}$		
Coef. Linear (b)	19,70	6,41	-3,61
Data	11/9/2006	15/12/2006	4/1/2007

Similarmente à análise conduzida para o criseno, ao se avaliar os resultados pôde-se observar que a variação de 12% do desvio padrão no valor do coeficiente angular reflete a sensibilidade do fenômeno a pequenas variações diárias, inclusive em se tratando, neste caso, de meio fortemente básico, pH 12 (pH de difícil medição devido ao erro sódico e variações de concentração hidrogeniônica no meio etanólico) e em termos, com já mencionado anteriormente, do controle da intensidade da

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

fonte de excitação e fluxo do gás de purga. No entanto, esse valor pode ser considerado aceitável se for considerado o difícil controle desses parâmetros. Quanto ao coeficiente de determinação, este nos mostra a consistência do comportamento linear obtido.

4.2. Capacidade de detecção

A capacidade de detecção é um parâmetro de validação relacionado com a capacidade do método em discriminar amostras de teores de analitos semelhantes. Esse parâmetro poderia ser denominado sensibilidade, mas isso não será feito para não se confundir com o termo que indica a inclinação da curva analítica. A capacidade de detecção obviamente depende da sensibilidade da curva analítica indicada pelo coeficiente angular "a" obtido no subitem anterior. Neste trabalho a capacidade de detecção será avaliada por meio dos limites de detecção (LD) e dos limites de quantificação (LQ) para indicar, respectivamente, a capacidade de medição de sinais que estatisticamente seriam do analito. É válido lembrar que dependendo do critério adotado, a magnitude do branco não é considerada, apenas o seu desvio padrão. Assim esses parâmetros apenas servem para comparação entre métodos e não para avaliação efetiva da menor quantidade de analito que pode ser medida.

4.2.1. Limite de detecção

O LD é o critério de capacidade de detecção mais utilizado. Segundo o INMETRO[52], ele representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Neste trabalho utilizaremos o cálculo do LD baseado em parâmetros da curva analítica, por ser estatisticamente mais confiável. Outro método que poderia ser utilizado é o método da relação sinal-ruído, que é aplicado normalmente quando o procedimento analítico mostra ruído na linha de base, onde para se determinar essa relação é feita uma comparação com amostras

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

de baixas concentrações conhecidas do composto na matriz em análise e um branco desta amostra (matriz isenta do composto de interesse). As estimativas da relação sinal-ruído normalmente utilizada está entre 3:1. O LD pode ser expresso conforme equação 2:

$$LD = 3 \times \frac{s}{a} \quad (2)$$

"s" é a estimativa do desvio padrão de dez replicatas do ensaio em branco e "*a"* é a inclinação da reta, ou seja, o coeficiente angular.

No caso da técnica SSRTP, esse parâmetro também é mais bem expresso em termos de massa efetiva de analito depositada no substrato (limites de detecção absoluto, LDA) considerando 5 µL de amostra, o que permite avaliar a capacidade de detecção em termos de massa. O LDA pode ser expresso como indicado na equação 3:

$$LDA = \left(\frac{3 \times s}{a} \right) \times V \times MM \quad (3)$$

"V" é o volume depositado no substrato (5 µL) e "*MM"* é a massa molar do analito em g mol $^{-1}$; *"s"* é a estimativa do desvio padrão de dez replicatas do ensaio em branco e "*a"* é o coeficiente angular da curva analítica já descrita (subitem 4.1).

4.2.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental. O LQ pode ser calculado pela sistemática similar descrita para o LD, utilizando a relação de 10:1, ao invés de 3:1. O LQ pode ser expresso conforme equação 4:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{a} \quad (4)$$

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

O LQA pode ser expresso como indicado na equação 5:

$$LQA = \left(\frac{10 \times s}{a} \right) \times V \times MM \qquad (5)$$

Na Tabela 23 encontram-se os resultados de LD, LDA, LQ e LQA obtidos para o pireno e para o criseno nas condições experimentais adequadas para cada analito.

Tabela 23 : Parâmetros de capacidade de detecção para pireno e criseno.

	Pireno[a]	Criseno[b]
Sais de átomos pesados	$Pb(NO_3)_2$	$AgNO_3$
LD (mol L^{-1})	7×10^{-8}	6×10^{-7}
LDA (ng)	0,07	0,68
LQ (mol L^{-1})	$2{,}3 \times 10^{-7}$	2×10^{-6}
LQA (ng)	0,23	2,24

[a]Pireno depositado em substratos a partir de solução carreadora em meio básico e em substratos contendo 993 µg $PbNO_3$.
[b]Criseno em substratos contendo 30 µg de $AgNO_3$ e 360 ng de SDS.

4.3. Robustez

A robustez de um método é medida pela variação de sinal que este apresenta em face de pequenas variações em algum parâmetro específico. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma pequena e deliberada modificação em um ou mais de seus parâmetros. Para se determinar à robustez de um método é recomendado o teste de Youden (INMETRO[52]). Esse teste permite avaliar a robustez e ordenar a influência de cada variável no resultado final. Em geral, são realizados em média oito ensaios com uma combinação fatorial dos efeitos e, posterior verificação de qual efeito e/ou combinação de efeitos apresenta variações.

Neste trabalho, a robustez foi obtida para cada parâmetro por meio de um tratamento estatístico similar, o estudo multivariado, ou seja, os dados para esta avaliação foram extraídos do tratamento estatístico realizado no planejamento fatorial, pois esse método permite avaliar cada variável e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

respectivas interações entre elas. O método é considerado robusto para um determinado parâmetro quando a variação deste for maior ou igual a 10% (comparação entre a tolerância e média da faixa).

Conforme descrito nas tabelas dos planejamentos fatoriais para o pireno e para o criseno nas condições experimentais consideradas adequadas, foram escolhidos dois parâmetros para demonstrar essa avaliação: a concentração hidrogeniônica do meio no caso do pireno e a variação de massa de sal de átomo pesado no caso do criseno. Os resultados podem ser observados na Tabela 24, cujos percentuais das variações da concentração de NaOH na solução final diluída para pireno e a massa de $AgNO_3$ para criseno encontrados foram de 60% e 25%, respectivamente, considerou-se assim os métodos robustos em relação aos parâmetros indicados.

Tabela 24: Resultados da avaliação da robustez para o pireno e criseno

	[NaOH] mol L^{-1} (sol. final diluída)	Média da faixa	Tolerância	Variação (%)
Pireno	0,10 - 0,40 (0,25+/-0,15)	0,25	0,15	60
	[$AgNO_3$] mol L^{-1}	Média da faixa	Tolerância	Variação (%)
Criseno	0,03 - 0,05 (0,04+/-0,01)	0,04	0,01	25

4.4. Precisão

4.4.1. Repetitividade

O termo repetitividade é adotado pelo Vocabulário Internacional de Metrologia (VIM).[53] Em conformidade à definição proposta, a repetitividade é uma expressão da precisão (dispersão dos resultados), é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando efetuadas sob as mesmas condições de medição. Conforme recomendação do INMETRO[52], deve-se realizar no mínimo sete repetições para cálculo da estimativa do desvio padrão.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

Para este estudo, optou-se por expressar o resultado como estimativa do desvio padrão relativo (%RSD), indicado na equação 6, também conhecido como coeficiente de variação (CV), com dez repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições.

$$RSD(\%)=\frac{s_r}{M_{medição}}\times 100 \qquad (6)$$

"s_r" é a estimativa do desvio padrão de dez replicatas e "$M_{medição}$" é a média das dez determinações.

Em geral, para a técnica SSRTP são reportados resultados de repetitividade de até 15%, dependendo da complexidade da amostra. Isso se dá por causa de variações de sinais produzidos pela pouca homogeneidade nos substratos sólidos utilizados nas medições (variação de sinal de fundo, variação na posição de depósito da solução de analito e coadjuvante). Neste caso, ainda por se tratar de HPA, que são compostos facilmente degradáveis com a luz, serão considerados adequados valores de até 20% para o %RSD. Os valores encontrados foram de 5% para o pireno e de 6% para o criseno, isso realizando as 10 medições em um mesmo substrato (mesmo papel). Vale ressaltar que quando a repetitividade na técnica SSRTP é determinada em 10 medições em 10 substratos sólidos distintos, descaracterizaria o conceito de repetitividade normalmente usado; os resultados encontrados foram de 14% (pireno) e 19% (criseno).

4.4.2. Reprodutibilidade

No contexto da definição internacional, a reprodutibilidade (s_R) é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc).[53] A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos. É muito

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

comum encontrar desacordo entre métodos analíticos e grandes variações entre resultados. Isto pode ser detectado quando vários laboratórios analisam uma amostra em comum, em estudos de proficiência.

Assim como a repetitividade, a reprodutibilidade também pode ser expressa em ternos de desvio padrão relativo (%RSD). Neste trabalho um teste de hipótese foi aplicado entre dois analistas (indicados como n_1 e n_2) 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 = $n_1 + n_2 - 2$. A seguir, estão listadas a equação 7 e a equação 8 usadas para cálculo da reprodutibilidade.

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1+n_2-2}} \quad (7)$$

$$t_0 = \frac{\overline{X}_1 - \overline{X}_2}{s_p\sqrt{\frac{1}{n_1}+\frac{1}{n_2}}} \quad (8)$$

Os dados foram processados fazendo-se o uso do programa do Excel (Microsoft Office), conforme descrito: ferramentas\análise de dados\ANOVA:fator único. Abaixo, as equações 9, 10 e 11 utilizadas após análise dos dados pelo sistema.

$$s_{entre}^2 = \left(MQ_{entre} - MQ_{dentro}\right)/n \quad (9)$$

$$s_r^2 = MQ_{dentro} \quad (10)$$

$$s_R^2 = \left(s_r^2 + s_{entre}^2\right) \quad (11)$$

"s^2_R" é a soma dos quadrados dos desvios da repetitividade e entre os analistas, "MQ_{entre}" é a soma dos mínimos quadrados entre os analistas e "MQ_{dentro}" é a soma dos mínimos quadrados de cada analista.

Os resultados das oito replicatas e os valores encontrados para a reprodutibilidade em mol L^{-1} e em percentual encontram-se na Tabela 25 (para o criseno) e Tabela 26 (para o pireno). As planilhas, com as memórias de cálculo do tratamento estatístico e com respectivos

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

resultados podem ser observadas nas Tabelas 27 e 28, respectivamente. Em percentuais, as médias dos valores encontrados na reprodutibilidade foram de 24% para o criseno e de 18% para o pireno.

Vale ressaltar que a reprodutibilidade foi realizada em 8 substratos sólidos distintos para cada analista.

Tabela 25 : Resultados para avaliação do atributo reprodutibilidade para o criseno

Replicatas	**Analista 1 (mol L^{-1})**	**Analista 2 (mol L^{-1})**	
1	$9{,}93 \times 10^{-6}$	$7{,}69 \times 10^{-6}$	
2	$8{,}45 \times 10^{-6}$	$8{,}66 \times 10^{-6}$	
3	$1{,}27 \times 10^{-5}$	$8{,}90 \times 10^{-6}$	
4	$1{,}33 \times 10^{-5}$	$1{,}27 \times 10^{-5}$	
5	$1{,}30 \times 10^{-5}$	$1{,}17 \times 10^{-5}$	
6	$1{,}12 \times 10^{-5}$	$4{,}60 \times 10^{-6}$	
7	$9{,}65 \times 10^{-6}$	$1{,}24 \times 10^{-5}$	
8	$8{,}22 \times 10^{-6}$	$9{,}75 \times 10^{-6}$	
Média	$1{,}08 \times 10^{-5}$	$9{,}54 \times 10^{-6}$	
Desvio padrão	$2{,}06 \times 10^{-6}$	$2{,}72 \times 10^{-6}$	
s^2_{entre}	$9{,}42 \times 10^{-14}$ mol L^{-1}		
s^2_r	$5{,}81 \times 10^{-12}$		
s^2_R	$5{,}90 \times 10^{-12}$		
s_R (repro)	**$2{,}43 \times 10^{-6}$**	**mol L^{-1}**	**24 %**

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

Tabela 26 : Resultados para avaliação do atributo reprodutibilidade para o pireno

Replicatas	**Analista 1 (mol L^{-1})**	**Analista 2 (mol L^{-1})**
1	$4{,}53 \times 10^{-5}$	$4{,}30 \times 10^{-5}$
2	$4{,}71 \times 10^{-5}$	$4{,}79 \times 10^{-5}$
3	$4{,}61 \times 10^{-5}$	$4{,}23 \times 10^{-5}$
4	$3{,}52 \times 10^{-5}$	$3{,}49 \times 10^{-5}$
5	$3{,}45 \times 10^{-5}$	$2{,}74 \times 10^{-5}$
6	$4{,}89 \times 10^{-5}$	$3{,}62 \times 10^{-5}$
7	$2{,}95 \times 10^{-5}$	$3{,}71 \times 10^{-5}$
8	$4{,}37 \times 10^{-5}$	$3{,}17 \times 10^{-5}$
Média	$4{,}13 \times 10^{-5}$	$3{,}76 \times 10^{-5}$
Desvio padrão	$7{,}16 \times 10^{-6}$	$6{,}61 \times 10^{-6}$

s^2_{entre}	$1{,}02 \times 10^{-12}$ mol L^{-1}		
s^2_r	$4{,}75 \times 10^{-11}$		
s^2_R	$4{,}85 \times 10^{-11}$		
s_R (repro)	**$6{,}96 \times 10^{-6}$**	**mol L^{-1}**	**18%**

Tabela 27: Planilha com memória de cálculo do tratamento estatístico (Microsort Excel) para a avaliação da reprodutibidade do criseno.

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	*Contagem*	*Soma*	*Média*	*Variância*
Coluna 1	8	8,66E-05	1,08E-05	4,23E-12
Coluna 2	8	7,64E-05	9,54E-06	7,39E-12

ANOVA

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	6,56E-12	1	6,56E-12	1,1297	0,3058	4,6001
Dentro dos grupos	8,13E-11	14	5,81E-12			
Total	8,79E-11	15				

s^2_{entre}	9,42,E-14	mol L^{-1}	
s^2_r	5,81,E-12		
s^2_R	5,90,E-12		
s_R (repro)	2,43E-06	mol L^{-1}	24 %

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

Tabela 28 : Planilha com memória de cálculo do tratamento estatístico (Microsort Excel) para a avaliação da reprodutibidade do pireno

Anova: fator único

RESUMO

Grupo	*Contagem*	*Soma*	*Média*	*Variância*
Coluna 1	8	0,000330358	4,13E-05	5,13E-11
Coluna 2	8	0,000300519	3,76E-05	4,37E-11

ANOVA

Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Entre grupos	5,56E-11	1	5,56E-11	1,1725	0,297187561	4,6001
Dentro dos grupos	6,64E-10	14	4,75E-11			
Total	7,20E-10	15				

s^2_{entre}	1,02,E-12	mol L^{-1}	
s^2_r	4,75,E-11		
s^2_R	4,85,E-11		
s_R (repro)	6,96E-06	mol L^{-1}	18 %

4.5. Tendência ou Recuperação (%)

A tendência (algumas vezes chamada de “recuperação”) de um sistema (método) de medição é o erro sistemático desse sistema de medição. Perdas durante a preparação de amostra, contaminação ou interferências causam variações perceptíveis na reprodutibilidade, mas outros são efeitos sistemáticos e necessitam ser considerados em separado.

Neste trabalho as seguintes estratégias foram aplicadas para se avaliar a tendência do método: (i) comparação com método de referência e (ii) comparação com material de referência certificado (MRC).

A recuperação (ou fator de recuperação), R, é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada.[54]

A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

na amostra. Isso pode implicar, por exemplo, na presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione sinal melhor ou pior, ocasionando avaliações excessivamente otimistas ou pessimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância de interesse, efeitos dos componentes da matriz devem ser investigados.

É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Na maioria dos casos, a dispersão dos resultados aumenta com a diminuição da concentração e a recuperação pode diferir substancialmente a altas e baixas concentrações. Por esse motivo, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Isto pode ser feito adicionando a substância em diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. As medições de recuperação são as mais comuns devido à dificuldade de se obter MRC (que de fato não estão disponíveis para certas aplicações) e são expressas em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (ou branco), em um determinado número de medições.[55] Os intervalos aceitáveis de recuperação de substâncias-traço, e mais particularmente em análise ultra-traço (determinação de microquantidades de amostra contendo quantidades traço de analito) geralmente estão entre 70 e 120%, com repetitividade de até ± 20%.[56] Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%.

Os resultados de tendência foram expressos como recuperação analítica (valor medido, normalmente a média de seis replicatas dividido pelo valor esperado) em percentual e serão apresentadas mais à frente quando do estudo com amostras de bílis e cachaça.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

4.5.1.
Comparação com material de referência certificado

A importância e o uso de materiais de referência certificados (MRC) vêm se intensificando na medida emque os processos analíticos exigem, cada vez mais, controle da exatidão de seus resultados.

Os MRC estão sendo cada vez mais utilizados nos laboratórios para: o controle da qualidade das análises químicas, a calibração de equipamentos, o acompanhamento e a avaliação de analistas, a garantia da qualidade de processos, o controle e atribuição de valores a materiais e o desenvolvimento de metodologias. Eles são ferramentas indispensáveis para assegurar a confiabilidade metrológica, ou seja, rastreabilidade e confiabilidade das medições.

Em um certificado de MRC, além da média e das incertezas, são citadas não apenas as metodologias utilizadas na determinação de cada propriedade/elemento bem como os laboratórios que participaram da certificação do material. No Anexo 1 é apresentado o MRC utilizado neste trabalho (NIST SRM 1647d) e seu respectivo certificado.

A estatística teste adequada para análise de MRC é calculada pela equação 12.

$$to = \frac{\overline{X} - \mu_0}{s/\sqrt{n}} \qquad (12)$$

"$\overline{X}$" é a média dos resultados experimentais para a espécie de interesse, "μ_0" é o valor da espécie de interesse especificado no MRC, "*s"* o desvio padrão das medições realizadas (n=6) e "*n"* o tamanho da amostra (n=6).

Para que a hipótese nula não seja rejeitada é necessário que o módulo do valor da estatística teste encontrado (t_o) seja menor que o valor tabelado na distribuição de t Student (Anexo 2), para os graus de liberdade (gl) adequados, isto é, gl = n -1 = 5. Os testes foram realizados com MRC NIST 1647d que possui valores certificados para pireno e para criseno, cujas concentrações estavam na ordem do µg mL^{-1} (mg L^{-1}). As análises foram realizadas por SSRTP em quintuplicata para o pireno em e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

em sextuplicata para o criseno. Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa para o nível de $t_{0,975}$ e os dados encontram-se na Tabela 29 e na Tabela 30, respectivamente. As recuperações no MRC usando SSRTP no modo sincronizado foram de 115% para o pireno e de 113% para o criseno. Vale ressaltar que nesse MRC estão presentes os 16 HPA prioritários estabelecidos pelo EPA (Tabela 1), entre eles, vários dos usados no estudo preliminar. Esse resultado indicou a boa seletividade obtida pelo ajuste da SSRTP.

Tabela 29 : Dados do teste com SRM 1647d para o pireno

Valor Médio do CRM* (mol L^{-1})	$1,86 \times 10^{-5}$
Replicatas	Valor medido ** (mg L^{-1})
1	$2,24 \times 10^{-5}$
2	$2,54 \times 10^{-5}$
3	$2,02 \times 10^{-5}$
4	$1,98 \times 10^{-5}$
5	$1,92 \times 10^{-5}$
Média	$2,14 \times 10^{-5}$
Desvio padrão	$2,52 \times 10^{-5}$
t_0	**2,520**
$t_{tabelado\ (G\text{-}1=4)}$	2,776

**Valores extraídos do certificado NIST SRM 1647d*
*** Valores medidos por SSRTP na presença de $Pb(NO_3)_2$ em pH básico*

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

Tabela 30 : Dados do teste com SRM 1647d para o criseno

Valor Médio do CRM* (mol L^{-1})	$1,81 \times 10^{-5}$
Replicatas	Valor medido ** (mg L^{-1})
1	$0,91 \times 10^{-5}$
2	$2,64 \times 10^{-5}$
3	$1,46 \times 10^{-5}$
4	$1,92 \times 10^{-5}$
5	$3,12 \times 10^{-5}$
6	$2,20 \times 10^{-5}$
Média	$2,04 \times 10^{-5}$
Desvio padrão	$7,97 \times 10^{-6}$
t_0	**0,706**
$t_{tabelado\ (G-1=5)}$	2,571

**Valores extraídos do certificado NIST SRM 1647d*
*** Valores medidos por SSRTP na presença de SDS e $AgNO_3$*

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

4.5.2. Comparação entre métodos

Esse estudo consistiu na comparação de resultados obtidos empregando-se o método em desenvolvimento e os resultados obtidos por meio de um método de referência, avaliando o grau de proximidade entre os resultados, ou seja, o grau de exatidão do método testado em relação ao de referência. As análises foram efetuadas em replicatas autênticas (com soluções independentes de amostra), utilizando o método em desenvolvimento e o método de referência (HPLC com detecção por fluorescência), nas mesmas amostras de cachaça fortificadas, em uma faixa de concentração comum e na qual se pretende validar o método.

Similarmente à verificação da reprodutibilidade, a comparação entre os métodos SSRTP e HPLC foi feita aplicando-se o teste de hipótese, com comparação de médias. As análises das amostras por SSRTP foram realizadas em seis replicatas autênticas para o pireno e para o criseno, As mesmas soluções de analito foram analisadas por HPLC. No caso do

pireno, as análises por HPLC foram realizadas com a mesma solução de analito (mesma concentração), mas em pH não ajustado da solução, devido a problemas que poderiam ocorrer à coluna cromatográfica em meio fortemente básico. Curvas analíticas nas mesmas condições também foram realizadas com o intuito de minimizar possíveis erros. De acordo com os resultados obtidos, os mesmos não mostraram diferença significativa para o nível de $t_{0,975}$ para as duas substância e os dados encontram-se nas Tabelas 31 (pireno) e 32 (criseno).

Tabela 31 : Resultado do teste da comparação entre SSRTP e HPLC para o pireno

	Valor medido (mg L^{-1})			
Replicatas	SSRTP*	HPLC**		
1	$1,25 \times 10^{-5}$	$1,84 \times 10^{-5}$		
2	$1,77 \times 10^{-5}$	$1,93 \times 10^{-5}$		
3	$1,69 \times 10^{-5}$	$1,54 \times 10^{-5}$		
4	$1,62 \times 10^{-5}$	$1,37 \times 10^{-5}$		
5	$1,76 \times 10^{-5}$	$1,87 \times 10^{-5}$		
6	$1,10 \times 10^{-5}$	$1,66 \times 10^{-5}$		
Média	$1,53 \times 10^{-5}$	$1,70 \times 10^{-5}$		
Desvio padrão	$2,87 \times 10^{-6}$	$2,18 \times 10^{-6}$		
n° de replicatas (n)	6	6	gl=	10
Desvio padrão combinado	$2,42 \times 10^{-13}$			
S_p	$7,0 \times 10^{-6}$			
t_0	**0,45**			
$t_{tabelado}$	2,228			

** valores medidos por SSRTP em presença de $Pb(NO_3)_2$ em pH básico.*
*** valores medidos por HPLC com detecção por fluorescência em pH não ajustado da solução de analito.*

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA

Tabela 32 : Resultado do teste da comparação entre SSRTP e HPLC para o criseno

	Valor medido (mg L^{-1})			
Replicatas	SSRTP*	HPLC**		
1	$7{,}51 \times 10^{-5}$	$1{,}01 \times 10^{-5}$		
2	$1{,}86 \times 10^{-5}$	$9{,}69 \times 10^{-5}$		
3	$1{,}22 \times 10^{-5}$	$1{,}09 \times 10^{-5}$		
4	$1{,}52 \times 10^{-5}$	$1{,}21 \times 10^{-5}$		
5	$1{,}84 \times 10^{-5}$	$9{,}19 \times 10^{-5}$		
6	$1{,}44 \times 10^{-5}$	$8{,}59 \times 10^{-5}$		
Média	$1{,}44 \times 10^{-5}$	$1{,}01 \times 10^{-5}$		
Desvio padrão	$4{,}16 \times 10^{-6}$	$1{,}26 \times 10^{-6}$		
n° de replicatas (n)	6	6	gl=	10
Desvio padrão combinado	$4{,}22 \times 10^{-12}$			
S_p	$9{,}0 \times 10^{-6}$			
t_0	**0,80**			
$t_{tabelado}$	2,228			

** valores medidos por SSRTP em presença de SDS e $AgNO_3$*
*** valores medidos por HPLC com detecção por fluorescência*

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0220928/CA