

6 Validação dos métodos

A validação de métodos analíticos desenvolvidos no laboratório é um processo contínuo que se inicia no planejamento do método e continua durante o desenvolvimento e otimização. Para se garantir a geração de informações confiáveis e interpretáveis sobre as amostras em análise, o método analítico deve passar pelo processo de validação, que de acordo com a ABNT⁶³, é a comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que o método atende os requisitos para uma aplicação ou uso específico. Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de organizações nacionais ou internacionais.

A orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos elaborado pelo INMETRO⁶⁴ recomenda que, quando aplicável, sejam investigadas as seguintes características de desempenho: especificidade e seletividade; linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho; limite de detecção; limite de quantificação; exatidão e tendência; precisão; robustez e incerteza de medição. Utilizando as condições escolhidas para o 2MI e 7MI, foram definidos alguns parâmetros de validação, que serão apresentados a seguir.

6.1. Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas à detecção, neste caso, do sinal fosforescente. Classifica-se um método como específico quando este produz resposta para apenas um analito⁶⁴. Quando um método produz resposta para vários analitos, mas é possível distinguir a resposta de um analito na presença dos demais, denomina-se o método seletivo.

Para a avaliação destes parâmetros foi realizada uma breve avaliação da capacidade seletiva da SS RTP usando seis sais indutores, para quatro analitos: Indol, 2MI, 3MI e 7MI. A primeira etapa dessa avaliação foi à comparação das características espectrais obtidas com os sais indutores de fosforescência. Essa avaliação se iniciou pelos resultados contidos na Tabela 1 e na Tabela 2,

apresentadas no Capítulo 3. Embora naquela etapa as condições não estivessem otimizadas, havia uma indicação que o método poderia não ser específico para os analitos avaliados (2MI, 3MI, 7MI e Indol), pois todos os analitos apresentaram sinais fosforescentes nas mesmas condições, além de apresentarem $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ e $\Delta\lambda$ muito próximos. Uma vez estabelecidas às condições fosforescentes do 2MI e do 7MI, foi realizado uma nova comparação das características espectrais do indol com os seus três derivados. Como nesse estudo havia uma indicação de comportamentos fosforescentes semelhantes entre esses compostos indólicos, foram incluídos três novos compostos nitrogenados: quinolina (QNL), 7,8 benzoquinolina (7,8BZQNL) e acridina (ACR). Estes compostos foram escolhidos devido à possibilidade de estarem presentes em amostras como, por exemplo, o querosene. Os testes foram realizados em soluções de etanol/H₂O (50%/50% v/v) e em querosene, na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O KI foi escolhido como átomo pesado indutor de fosforescência por provocar menor sinal de fundo do substrato. Os espectros sincronizados (ajustados com os $\Delta\lambda$ s do 2 MI), indicados na Figura 52 e na Figura 53, mostraram que não é possível discriminar o 2MI na presença do demais indóis, em etanol/H₂O e querosene, respectivamente. Entretanto, nas condições estabelecidas, a QNL, a 7,8BZQNL e a ACR apresentaram sinais fosforescentes característicos do branco do substrato, indicando que as condições estabelecidas para o 2 MI, em etanol/H₂O e querosene, respectivamente, são seletivas em relação a estes compostos, Figura 54 e 55.

Este estudo foi realizado em apenas uma concentração. Para que se pudesse ter uma avaliação mais eficiente seria necessário avaliar diferentes concentrações dos compostos nitrogenados.

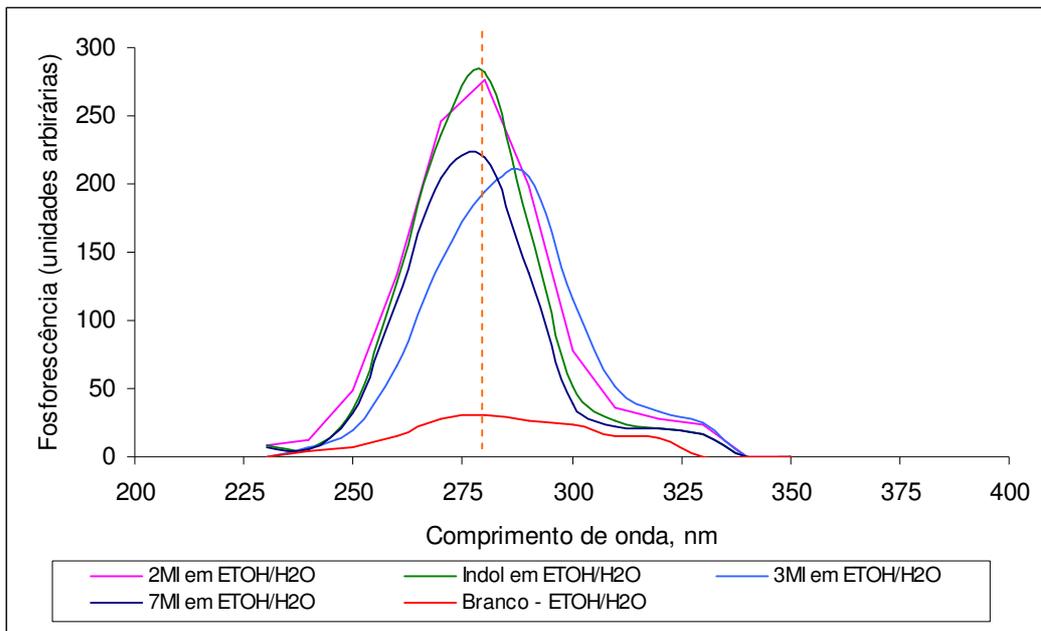


Figura 52: Os espectros sincronizados do 2MI em solução de etanol/H₂O, na presença dos demais indóis.

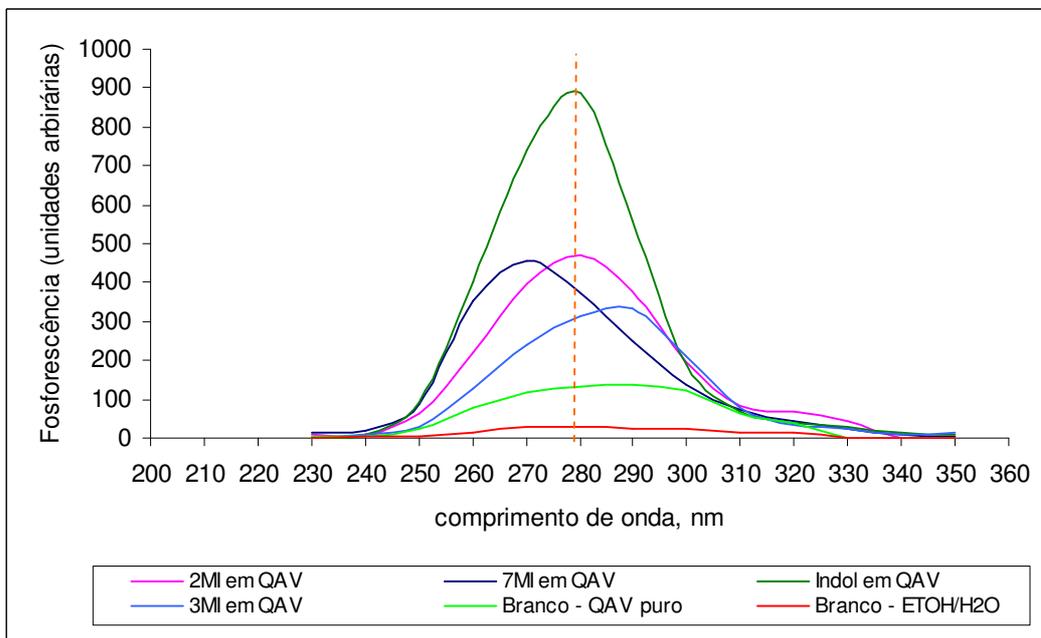


Figura 53: Os espectros sincronizados do 2MI em querosene, na presença dos demais indóis.

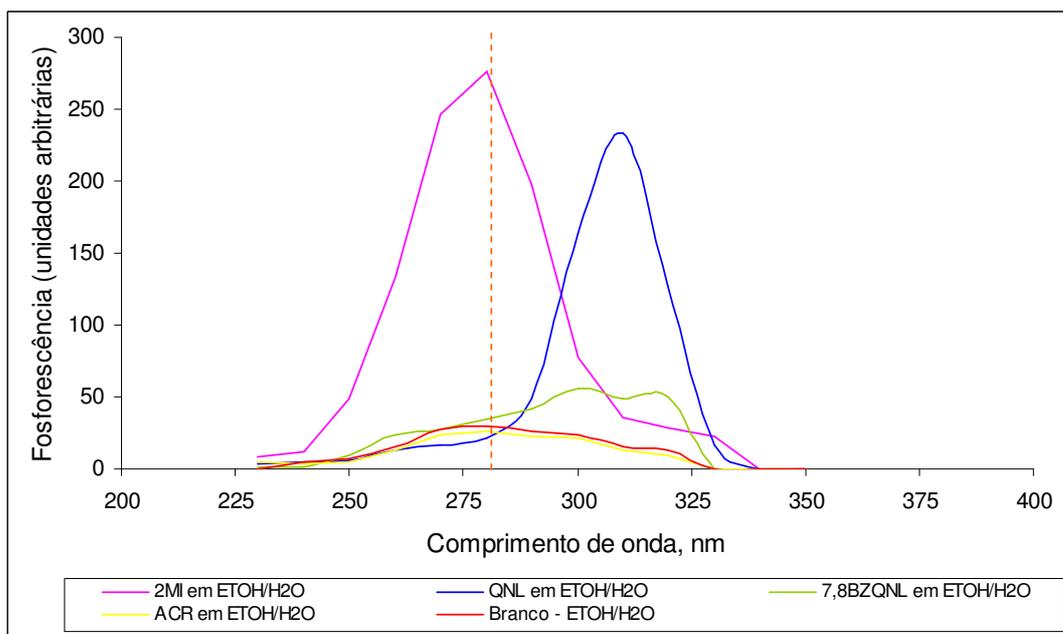


Figura 54: Os espectros sincronizados do 2MI em solução de etanol/H₂O, na presença de quinolina, 7,8 benzoquinolina e acridina.

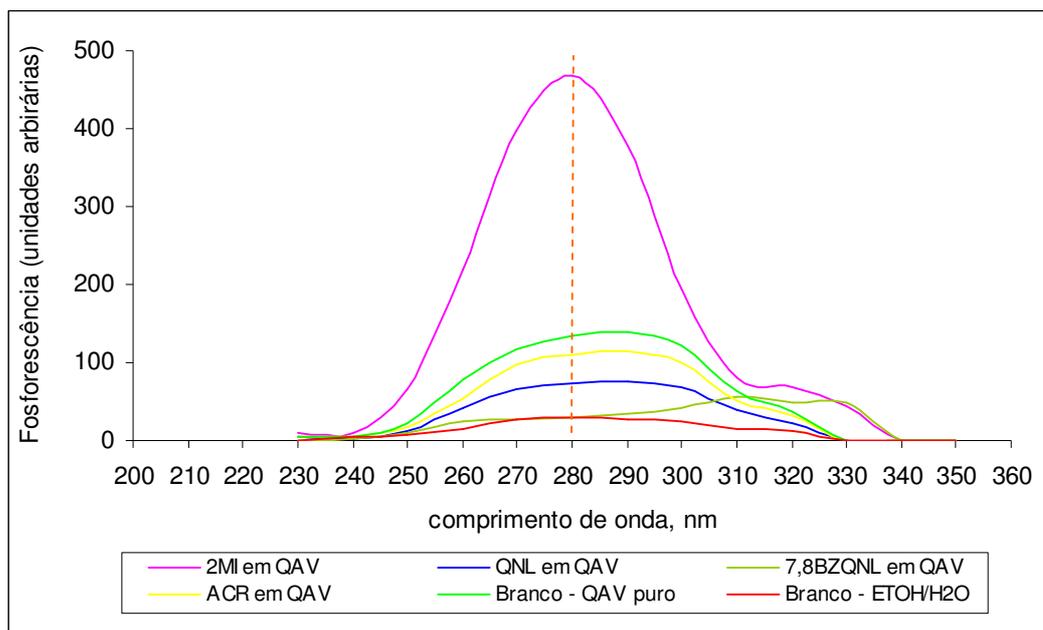


Figura 55: Os espectros sincronizados do 2MI em querosene, na presença de quinolina, 7,8 benzoquinolina e acridina.

6.2. Linearidade

Segundo a definição dos órgãos nacionais e internacionais^{64,65}, a linearidade ou resposta linear é observada quando um método analítico produz resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, considerando uma faixa de concentração. A linearidade pode ser observada graficamente através da curva analítica. Os parâmetros da curva (Equação 1) podem ser obtidos pela regressão linear simples usando o método dos mínimos quadrados (quando a variância é homogênea ao longo dos pontos amostrados - homoscedasticidade):

$$Y = aX + b \quad (1)$$

onde Y é a variável de resposta; X é a concentração ou massa do analito; a é a inclinação ou sensibilidade da curva de calibração; b é a interseção com o eixo y, quando x=0, b é o erro aleatório.

De um modo geral, a linearidade de um método é avaliada através do coeficiente de correlação linear (r) e de determinação (R²). Entretanto, também é necessário avaliar a homogeneidade das variáveis. Esta pode ser avaliada através de alguns testes estatísticos, como por exemplo, o teste t de *Student*, a prova F de Fischer, o intervalo de confiança do coeficiente angular e o coeficiente de determinação.

6.2.1. Linearidade do 2MI

A linearidade foi avaliada a partir da construção da curva analítica entre a massa de analito depositado no substrato e o sinal fosforescente medido, para cada condição escolhida. Na construção da curva analítica do 2MI na presença do KI, a faixa linear ficou no intervalo entre 156 ng (5 µL de solução 2,38 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) a 1561 ng (5 µL de solução 2,38 x 10⁻³ mol L⁻¹), de massa do analito. Já na presença do TINO₃ e SDS, a faixa linear compreendeu massas de analito entre 56 ng (5 µL de solução 8,48 x 10⁻⁵ mol L⁻¹) e 487 ng (5 µL de solução 7,42 x 10⁻⁴ mol L⁻¹). A Figura 56 e a Figura 57 representam duas curvas analíticas do 2MI, cada uma obtida em dias diferentes, na presença de KI e na presença de TINO₃/SDS, respectivamente. Cada ponto da curva representa a média das três

medições do sinal fosforescente em seu comprimento de onda máximo do espectro sincronizado.

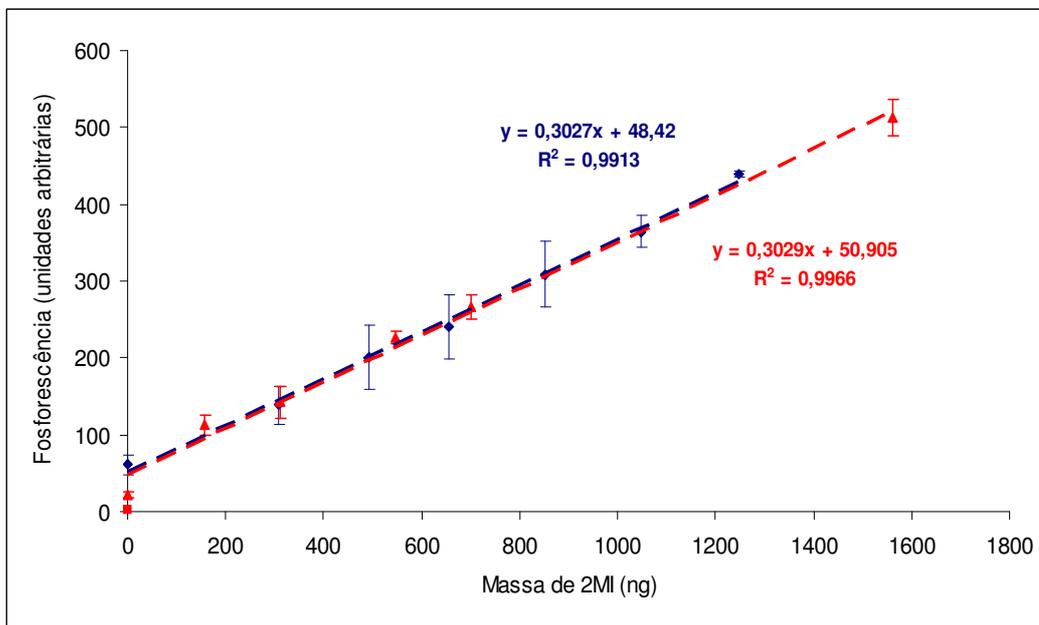


Figura 56: Curvas analíticas para o 2MI na presença de KI (1245 µg).

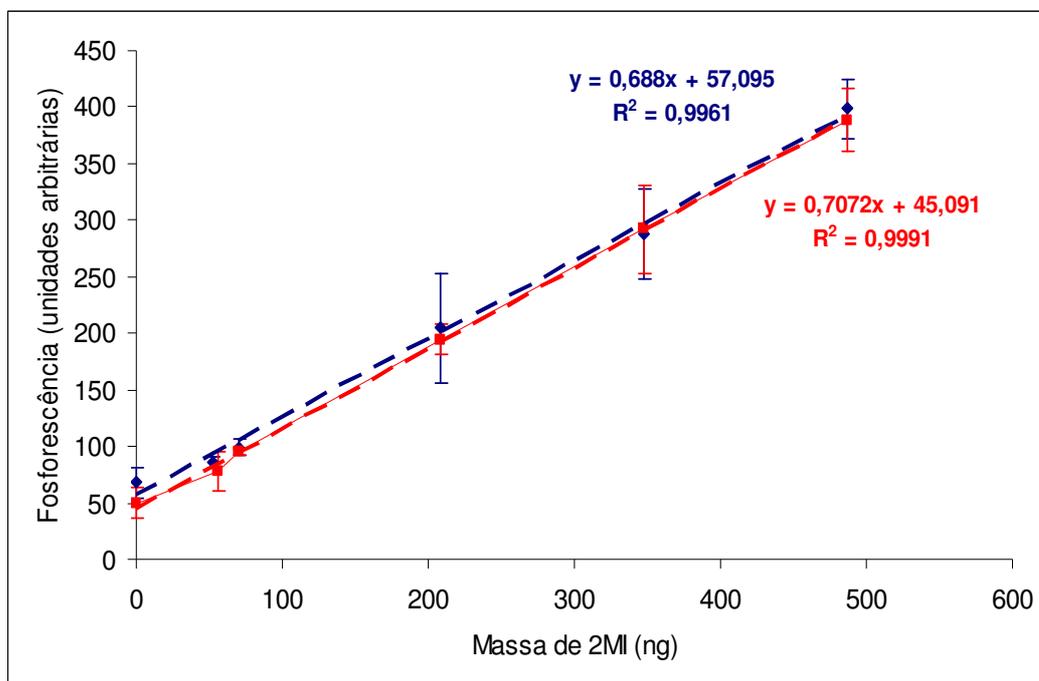


Figura 57: Curva analítica para o 2MI na presença de TINO₃ (133 µg) e SDS (721 µg).

Em todos os casos, o comportamento linear foi indicado pelos valores de coeficientes de correlação (r), de determinação (R^2) e pelo coeficiente de determinação ajustado (R^2_{adj}), superiores a 99% (Tabela 9). Os desvios padrão

dos coeficientes lineares indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenada está muito próxima do valor zero, indicando um erro sistemático (provavelmente causado por variações do sinal do branco causado pela não-homogeneidade dos substratos usados). Já os desvios padrão dos coeficientes angulares representam boa precisão intermediária (reprodutibilidade intralaboratorial) das medições.

Tabela 9: Parâmetros das curvas analíticas

Parâmetro	2MI na presença de KI	2MI na presença de TINO ₃ /SDS
Coeficiente angular (a)	0,3028 ± 0,0001	0,6976 ± 0,0135
Coeficiente linear (b)	49,6625 ± 1,7572	51,093 ± 8,4881
R ²	0,9940 ± 0,0037	0,9976 ± 0,0021
R	0,9969 ± 0,0019	0,9988 ± 0,0011
R ² _{adj}	0,9940 ± 0,0038	0,9970 ± 0,0027

Outra maneira de se avaliar a adequação do modelo linear é através do teste F de *Snedecor–Fisher*. Este teste é baseado no princípio da ANOVA, onde a média quadrática da regressão (MQ_{reg}) é dividida pela média quadrática do resíduo (MQ_{res}), para seus respectivos graus de liberdade, conforme mostrado na Equação 2.

$$F = MQ_{reg} / MQ_{res} \quad (2)$$

O resultado encontrado é comparado com o da tabela F, considerando seus graus de liberdade (gl). Um valor estatisticamente significativo ($\alpha = 0,05$) da razão entre as médias ($F_{calc.} > F_{critico}$) indica a não existência de relação linear, ou seja, se aceita a equação da regressão linear. Os resultados dos testes do 2MI na presença do sal de KI e na presença de TINO₃/SDS podem ser encontrados nas tabelas ANOVA (Tabela 10 e Tabela 11). Como o valor calculado ($F_{calc} \cong 456$ na presença de KI e $F_{calc} \cong 4614$ na presença de TINO₃/SDS) foi muito superior ao valor crítico ($F_{critico} = 7,71$) podemos dizer que o modelo linear é estatisticamente válido, o que confirma o resultado obtido no teste anterior.

Tabela 10: Resumo da análise da variância – ANOVA - do 2MI na presença de KI

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	142911	142911	456,3602	$2,84 \times 10^{-5}$
Resíduo	4	1252,616	313,1539		
Total	5	144163,6			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores
Interseção	48,4199	10,5872	4,5734	$1,02 \times 10^{-2}$	19,0249
2MI	0,3027	0,0142	21,3626	$2,84 \times 10^{-5}$	0,2633

Tabela 11: Resumo da análise da variância – ANOVA - do 2MI na presença de TI e SDS

b	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	90925,84	90925,84	4614,387	$2,81 \times 10^{-7}$
Resíduo	4	78,81943	19,7049		
Total	5	91004,66			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores
Interseção	45,0915	2,7199	16,5779	$7,75 \times 10^{-5}$	37,5396
2MI	0,7072	0,0104	67,9293	$2,81 \times 10^{-7}$	0,6783

O modelo linear também pode ser avaliado por meio do teste *t* de *Student*, que trata como hipótese nula (H_0) a premissa de que a intensidade de sinal fosforescente e a concentração de analito não se relacionam linearmente. Em um nível de significância de 5%, o valor calculado de *t* comprovaria ou rejeitaria esta hipótese.

Como mostrado na Tabela 10 e na Tabela 11, os valores de *t* calculados ($t \cong 21$ para o 2MI na presença de KI e $t \cong 68$ para o 2MI na presença de TINO₃/SDS) são bastante superiores ao valor crítico ($t_{0,05,4} = 2,776$), sendo a hipótese nula rejeitada, resultando em um modelo que relaciona linearmente intensidade de sinal e concentração.

O Valor p ($2,84 \times 10^{-5}$ e $2,81 \times 10^{-7}$) 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 se rejeita H_0 , caso contrário, rejeita-se H_0 . No caso deste estudo, $p < 0,05$. 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 do analito.

A partir dos diversos testes estatísticos, pôde-se concluir que os métodos apresentaram respostas lineares, tendo sua faixa até 1561 ng de 2 MI na presença do sal de KI enquanto na presença de TINO₃/SDS a faixa linear se estendeu até 487 ng de 2 MI.

6.2.2. Linearidade do 7MI

A linearidade do 7MI foi calculada da mesma maneira indicada anteriormente. Curvas analíticas foram construídas relacionando a massa do analito depositado no substrato sólido e a intensidade de sinal fosforescente nas duas condições experimentais estabelecidas (tanto na presença de KI quanto na presença de TINO₃/SDS). A massa depositada do analito, na presença de KI, ficou entre 170 ng (5 µL de solução $2,60 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e 341 ng (5 µL de solução $5,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), uma faixa consideravelmente menor que a do 2MI. Na presença de TINO₃/SDS, a massa de analito depositada foi variada de 53 ng a 344 ng. Na Figura 58 e na Figura 59 duas curvas analíticas (média das três medições com respectivos desvios-padrão para cada ponto das curvas) são representadas para cada condição experimental escolhida.

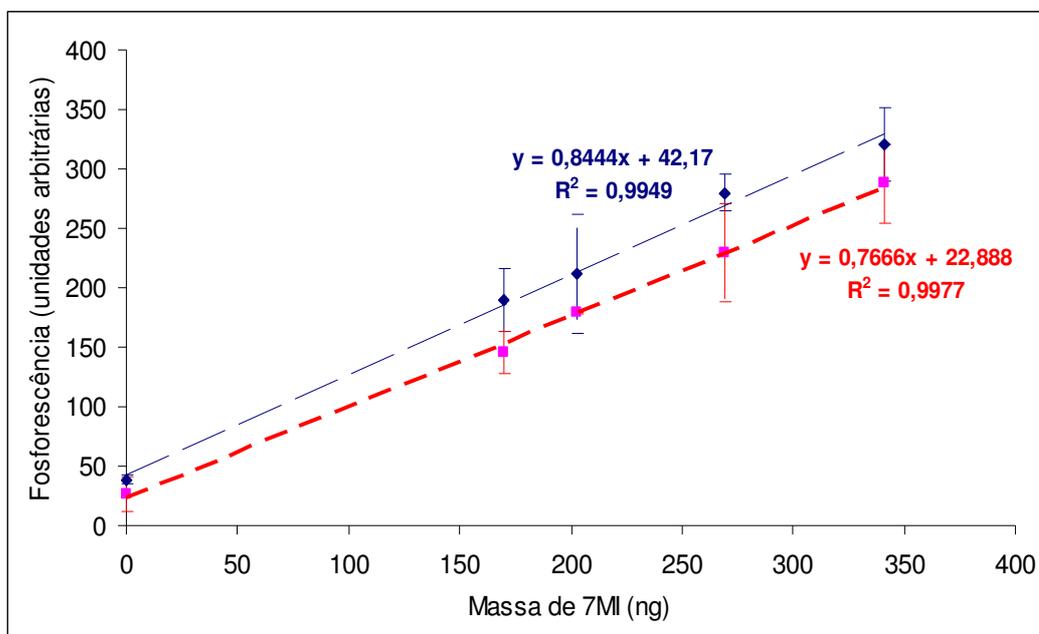


Figura 58: Curva analítica para o 7MI na presença de KI (1245 µg).

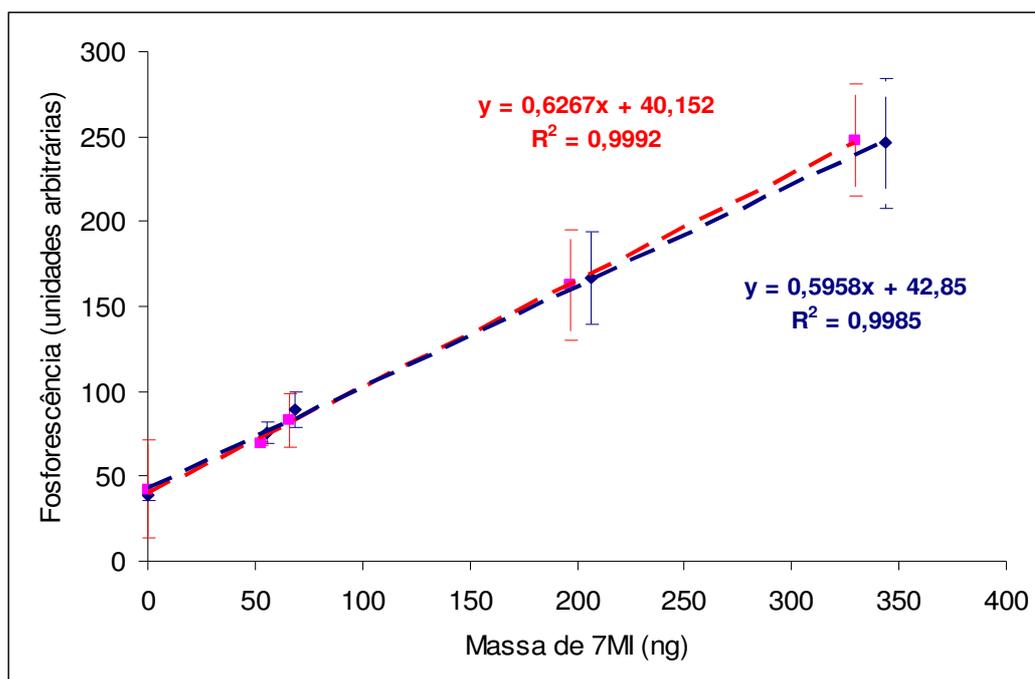


Figura 59: Curva analítica para o 7MI na presença de TINO_3 (999 μg) e SDS (721 μg).

Similarmente à análise conduzida para o 2 MI, ao se avaliar os resultados pôde-se observar que o comportamento linear foi obtido, como indicado pelos vários coeficientes (r , R^2 e R^2_{adj}), Tabela 12, superiores a 99 %. Os desvios padrão dos coeficientes lineares indicaram que a faixa onde as curvas atingem o eixo da ordenada está muito próxima do valor zero, indicando um pequeno erro sistemático. Os desvios padrões dos coeficientes angulares indicam que o método apresenta uma boa precisão intermediária das medições.

Tabela 12: Parâmetros das curvas analíticas

Parâmetro	7MI na presença de KI	7MI na presença de TINO_3 /SDS
Coefficiente angular (a)	$0,8055 \pm 0,0550$	$0,6113 \pm 0,0218$
Coefficiente linear (b)	$32,5290 \pm 13,6344$	$41,5010 \pm 1,9078$
R^2	$0,9963 \pm 0,00198$	$0,9989 \pm 0,0004$
R	$0,9982 \pm 0,0010$	$0,9994 \pm 0,0003$
R^2_{adj}	$0,9951 \pm 0,0026$	$0,9985 \pm 0,0006$

A adequação do modelo foi avaliada pelos testes F e *t* de *Student* que indicaram ser linear para as duas condições utilizadas. Na Tabela 13, um resumo dos valores obtidos em todos os testes é apresentado.

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

	7MI na presença de KI	7MI na presença de TINO ₃ e SDS
SQ _{reg}	4,67x10 ⁻⁴	2,76x10 ⁻⁴
SQ _r	2,39x10 ⁻²	4,15x10 ⁻¹
Teste F	5,86x10 ⁻²	2,00x10 ⁻³
Teste t	2,42x10 ⁻¹	4,47x10 ⁻¹
P	1,54x10 ⁻⁴	2,47x10 ⁻⁵

A partir dos resultados, pôde-se verificar, por meio dos testes estatísticos, que o método para o 7MI é linear para as faixas: até 341 e 458 ng, na presença de KI e TINO₃/SDS, respectivamente.

6.3. Detectabilidade

A sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito, sendo representado pela inclinação das curvas analíticas. Quando os limites de detecção e de quantificação são considerados pelo critério ks_b/a (onde “k” é a constante numérica; “a” é a sensibilidade da curva e s_b é o desvio padrão do sinal do branco) o termo sensibilidade se estende a esses dois parâmetros. Porém, neste trabalho, um dos critérios para o cálculo de limites de detecção (LD) e de limites de quantificação (LQ) incluiu a capacidade de discriminação do sinal analítico do sinal do branco. Desta forma, aqui o LD e o LQ foram denominados como parâmetros de detectabilidade.

Segundo alguns autores,⁶⁴⁻⁶⁷ o LD é a menor quantidade ou concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Existem vários critérios para a definição do LD. No caso de métodos

instrumentais a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído-sinal da linha de base, conforme demonstrado na Equação 3, ou pela distribuição de *Student*, Equação 4.

$$LD = x + 3s_b \quad (3)$$

$$LD = x + ts_b \quad (4)$$

onde “x” é a média dos valores dos brancos e “s_b” é o desvio padrão dos brancos e “t” é a abscissa da distribuição de Student, dependente do tamanho da amostra e do grau de confiança. A média e o desvio padrão são dependentes da matriz e é válido somente quando os valores das amostras em branco apresentarem um desvio padrão diferente de zero. Esse critério foi adotado por ser considerado mais adequado no caso da SS RTP onde o sinal do branco pode ser relevante.

Alternativamente, calculou-se o LD por meio dos parâmetros da curva analítica, conforme Equação 5 cujos parâmetros já foram definidos.

$$LD = 3 \times \frac{s_b}{a} \quad (5)$$

No caso da técnica SS RTP, esse parâmetro também pode ser expresso em termos de massa efetiva de analito depositado 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 6:

$$LDA = (LD) \cdot V \cdot MM \quad (6)$$

onde “V” é o volume depositado no substrato (5 µL) e “MM” é a massa molar do analito em g mol⁻¹.

O LQ é definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão. O procedimento de avaliação do LQ é semelhante à do LD, podendo ser estimado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 vezes o desvio padrão do branco (Equação 7) ou por meio de parâmetros

da curva analítica, conforme Equação 8 ou Equação 9, no caso da massa efetiva de analito.

$$LQ = x + ks_b \quad (7)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{a} \quad (8)$$

$$LQA = (LQ) \cdot V \cdot MM \quad (9)$$

A determinação dos limites de detecção e de quantificação foi feita para os dois analitos, nas duas condições estabelecidas, considerando a análise de 10 amostras em branco, conforme apresentado na Tabela 14. Para o 2MI, os resultados mais sensíveis foram obtidos com $TiNO_3/SDS$, enquanto que para o 7MI os resultados mais sensíveis foram com o uso de KI.

Os valores obtidos e a avaliação crítica do sinal analítico observado indicaram que, para a determinação do 2 MI e do 7 MI por SSRTP, o parâmetro mais realista para detectabilidade é aquele que leva em consideração a magnitude do sinal do branco, equações 3 (LD), 6 (LDA), 7 (LQ) e 9 (LQA), cujos valores estão em negrito na Tabela 14. As planilhas detalhadas dos cálculos realizados se encontram nos anexos V e VI.

Tabela 14: Parâmetros de mérito de sensibilidade para o 2MI e o 7MI.

	2 MI		7 MI	
Condição experimental	KI (1245 µg)	TiNO ₃ (133 µg) SDS (519 µg)	KI (1245 µg)	TiNO ₃ (133 µg) SDS (721 µg)
LD (3s _b /a)	1,2x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	8,4x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	1,6x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	3,7x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
LDA (3 LD x V x MM)	80,9 ng	55,1 ng	10,0 ng	24,2 ng
LD (x + 3s_b)	9,2x10⁻⁵ mol L⁻¹ (12,1 mg/L)	9,6x10⁻⁵ mol L⁻¹ (12,6 mg/L)	6,1x10⁻⁵ mol L⁻¹ (8,0 mg/L)	8,6x10⁻⁵ mol L⁻¹ (11,3 mg/L)
LDA (x + 3s_b)	60,6 ng	62,7 ng	40,3 ng	56,1 ng
LQ (10s _b /a)	4,1 x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	2,8x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	5,2x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	1,2 x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
LQA (10 LQ x V x MM)	269,6 ng	183,7 ng	33,9 ng	80,7 ng
LQ (x + 10s_b)	2,3 x10⁻⁴ mol L⁻¹ (28,8 mg/L)	2,5 x10⁻⁴ mol L⁻¹ (32,8 mg/L)	9,6 x10⁻⁵ mol L⁻¹ (12,5 mg/L)	1,7x10⁻⁴ mol L⁻¹ (22,3 mg/L)
LQA (x + 10s_b)	148,7 ng	164,2 ng	62,8 ng	112,6 ng

6.4. Exatidão e Tendência

A exatidão do método analítico é o grau de concordância entre o valor médio obtido de uma série de resultados e o valor de referência aceito. A exatidão pode ser demonstrada pela comparação dos resultados obtidos com material de referência certificado ou com outro método validado cujo erro sistemático é sabidamente não significativo. Outra forma de investigação é comparar a média dos resultados obtidos com a média do programa interlaboratorial, ou ainda por meio de estudos de recuperação de quantidades conhecidas do analito adicionado na matriz da amostra contendo ou não essa mesma espécie química de interesse⁶⁸. Neste trabalho a exatidão foi avaliada por meio de estudos de recuperação em material fortificado, devido à dificuldade de se obter materiais de referência certificado (MRC).

A recuperação 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 quantificada⁶⁹. Ela consiste na relação percentual entre a concentração determinada mediante aplicação do procedimento analítico e o nível de fortificação (concentração em que o analito é adicionado na amostra controle).^{70,71} Os valores de recuperação considerados adequados são estabelecidos em função da concentração do analito, conforme mostra a Tabela 15⁷¹. Entretanto, de acordo com a área de pesquisa os valores aceitos podem variar. De um modo geral os intervalos aceitáveis para análise de traço e ultra- traço estão entre 70 e 120 %, com repetitividade de até ± 20 %.^{72,73}

Tabela 15: Recuperação do analito em função da sua concentração (adaptação da fonte Brito, Junior e Polese)⁷¹

Concentração do analito	Intervalo de recuperação aceito, %
≥ 10 %	98 - 102
≥ 1 %	97 - 103
$\geq 0,1$ %	95- 105
$\geq 100 \mu\text{g g}^{-1}$	90 - 107
$\geq 100 \text{ ng g}^{-1}$	80 - 110
$\geq 10 \text{ ng g}^{-1}$	60 - 115
$\geq 1 \text{ ng g}^{-1}$	40 - 120

Para o cálculo de recuperação, amostras em branco foram fortificadas com o analito de interesse (2MI e 7MI) em solução de etanol/H₂O (50/50% v/v) de modo que a concentração da solução final ficasse próxima ao ponto médio da curva analítica. Os resultados de recuperação, Tabela 16, foram expressos como recuperação analítica (valor medido, é a média de dez replicatas, dividido pelo valor esperado) em percentual.

Tabela 16: Recuperações do 2MI e 7MI em etanol/H₂O.

Analito	Sal de atomo pesado	
	KI	TI
2MI	83 ± 2%	77 ± 17%
7MI	78 ± 4%	79 ± 15%

Tendo em vista que o teste de especificidade mostrou que não é possível discriminar o 2MI ou 7MI na presença de outros indóis aqui estudados (sinais fosforescentes na mesma região de comprimento de onda), optou-se por avaliar o potencial de recuperação dessas espécies químicas (família dos indóis), nas condições estabelecidas ($\Delta\lambda = 170$ nm) para o 2MI na presença de KI. Para isto foram preparadas soluções individuais de 3MI, Indol e mistura destes na presença de 2MI em etanol/H₂O e em querosene, cuja concentração final foi próxima do ponto médio da curva analítica ($7,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹). Esta concentração quando comparada com a Tabela proposta por Brito, Junior e Polese⁷¹ equivale à concentração de ≥ 100 ng g⁻¹, cujo percentual de recuperação está na faixa de 80 a 110 %

Os percentuais de recuperação, Tabela 17, indicaram que é possível determinar, por meio da quantificação total, qualquer uma das espécies químicas estudadas anteriormente.

Tabela 17: Recuperações dos indóis em etanol/H₂O e em querosene

Analito	Recuperação, %	
	Solução etanol/H ₂ O	Querosene
Indol	111 ± 8	104 ± 11
3MI	104 ± 5	70 ± 7
2MI + 3MI	112 ± 23	74 ± 3
2MI + Indol	107 ± 10	98 ± 13

Os percentuais de recuperação obtidos para as soluções de etanol/H₂O estão de acordo com a tabela proposta por Brito, Junior e Polese⁷¹. Já para as soluções preparadas em querosene, à recuperação do 3MI e da mistura 2MI + 3MI ficaram um pouco abaixo da tabela. Entretanto se considerarmos que outros autores^{72, 73} consideram aceitável uma recuperação de até 70% pode-se dizer que para a concentração estudada a metodologia desenvolvida é aceitável.

6.5. Precisão

A precisão é um termo geral usado para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições pré-estabelecidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição. As duas formas mais utilizadas para expressar a precisão de um método são a repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV%).

Por definição, repetitividade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuadas sob as mesmas condições de medição (mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento sob as mesmas condições, mesmo local e instrumento e repetições em curto espaço de tempo).⁶⁴

Para o estudo de repetitividade do 2MI e do 7MI, nas duas condições estabelecidas, o cálculo foi feito a partir do desvio padrão relativo (%RSD), indicado na Equação 10, realizando dez medições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições.

$$RSD(\%) = \frac{s_r}{M_{\text{medição}}} \times 100 \quad (10)$$

onde “ s_r ” é a estimativa do desvio padrão de dez replicatas e “ $M_{\text{medição}}$ ” é a média das dez determinações.

Para medidas sucessivas no mesmo substrato, a repetitividade do 2MI e do 7MI, na presença de KI, apresentou variações de 3 e 5%, respectivamente, sendo considerada boa para a técnica utilizada. Na presença do TINO₃/SDS, as variações também foram satisfatórias, 5 e 6%, respectivamente. No entanto, no caso da técnica de SSRTP, as replicatas são realizadas utilizando substratos de

papel distintos, ou seja, cada replicata é adicionada em um substrato de papel. Sendo assim, entende-se que para técnicas com esse tipo de característica, o estudo de repetitividade deve também ser realizado usando diferentes substratos. Neste caso, as repetitividades do 2MI e do 7MI apresentaram um aumento significativo, quando comparado com os resultados anteriores medidos em seqüência no mesmo substrato. Na presença de KI, a repetitividade ficou em 18 e 15%, para o 2MI e para o 7MI, respectivamente, indicando o problema de homogeneidade dos substratos (variação de sinal de fundo) e as pequenas diferenças na posição de aplicação das soluções no substrato (variação na posição de depósito da solução de analito e coadjuvante). No entanto, considerando essas limitações, os resultados obtidos também foram satisfatórios. As variações obtidas na presença do $TiNO_3/SDS$ foram semelhantes às observadas na presença de KI, ficando em 16 e 21 %, para o 2MI e 7MI. Em geral, para a técnica SS RTP são reportados resultados de repetitividade de até 15%, dependendo da complexidade da amostra.

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição.⁶⁴ A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos. Segundo o INMETRO⁶⁴, quando os resultados são obtidos por um mesmo método, tendo variado laboratórios, analistas ou equipamentos, a reprodutibilidade é chamada de precisão intermediária ou reprodutibilidade interna.

Neste trabalho foi calculada a reprodutibilidade interna, tendo sido o analista a fonte de variação de medição. Uma vez escolhida a fonte de variação, as estimativas das variâncias (dentro e entre os grupos) foram obtidas através da análise de variância (ANOVA), no programa Excel (Microsoft Office). A reprodutibilidade é obtida através da soma dos quadrados dos desvios da repetitividade e entre os analistas, conforme demonstrado na Equação 11, Equação 12 e Equação 13.

$$s_{entre}^2 = (MQ_{entre} - MQ_{dentro}) / n \quad (11)$$

$$s_r^2 = MQ_{dentro} \quad (12)$$

$$s_R^2 = (s_r^2 + s_{entre}^2) \quad (13)$$

onde s^2_R é a soma dos quadrados dos desvios da repetitividade e entre os analistas; MQ_{entre} é a soma das médias quadráticas entre os analistas e; MQ_{dentro} é a soma das médias quadráticas de cada analista.

Os resultados obtidos para a reprodutibilidade interna mostraram que os analitos, na presença do KI, apresentaram variações um pouco menores do que na presença de $TiNO_3/SDS$. No entanto, em todos os casos, a reprodutibilidade ficou na mesma magnitude dos valores de repetitividade, que foram obtidos com troca de substrato. Esse fato indica que, o substrato é o fator mais relevante na degradação da precisão, não importando a troca de analista. Os resultados obtidos para repetitividade e reprodutibilidade estão descritos da Tabela 18, a seguir. As memórias dos cálculos se encontram nos anexos V e VI.

Tabela 18: Parâmetros de precisão do 2MI e 7MI

	2MI		7 MI	
	KI	$TiNO_3/SDS$	KI	$TiNO_3/SDS$
Repetitividade (mesmo substrato)	3%	5%	5%	6%
Repetitividade (troca substrato)	18%	16%	15%	21%
Reprodutibilidade interna (troca de papel e analista)	18%	23%	17%	23%

6.6. Robustez

A robustez de um método é a sensibilidade que este apresenta em face de pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma pequena modificação de um ou mais parâmetros (valores $\geq 10\%$ quando comparado a tolerância com a média da faixa). O teste recomendado pelo INMETRO⁶⁴ para determinar a robustez é o teste de *Youden*. Este teste permite avaliar a robustez do método bem como ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Outra maneira, similar ao teste de *Youden*, de se avaliar a robustez é por meio da técnica estatística de planejamento de experimento.

Neste trabalho, a robustez foi avaliada a partir da análise estatística obtida pelo planejamento fatorial composto central. A Tabela 19 mostrou a robustez dos parâmetros estudados para o 2MI e 7MI, nas duas condições estabelecidas.

Tabela 19: Robustez dos parâmetros estudados para o 2MI e 7MI, na presença de KI e TINO_3/SDS .

Análito	Parâmetro	Faixa	Média da faixa	Tolerância	Tolerância (%)
2MI	massa de KI (μg)	954 - 1535	1245	± 290	± 23
	pH	4,2 - 9,8	7	$\pm 2,8$	± 40
2MI	massa de SDS (μg)	519 - 923	721	± 202	± 29
	massa de TINO_3 (μg)	40 - 266	153	± 113	± 74
7MI	massa de KI (μg)	954 - 1535	1245	± 290	± 23
	pH	4,2 - 9,8	7	$\pm 2,8$	± 40
7MI	massa de SDS (μg)	418 - 1024	721	± 303	± 42
	massa de TINO_3 (μg)	133 - 293	213	± 80	± 38

Comparando a robustez obtida para todos os parâmetros estudados, foi possível verificar que a variação da massa de sal de TINO_3 utilizada para o estudo do 2MI foi o parâmetro que menos afetou o sinal fosforescente. A influência do pH da solução também não mostrou ser um parâmetro relevante na determinação do 2MI e do 7MI. Por outro lado, a massa de sal de KI utilizada nos estudos do 2MI e do 7MI, mostrou ser o parâmetro que mais pode afetar o sinal fosforescente do 2MI e do 7MI.

6.7. Incerteza

Quando uma medição é realizada, este resultado é somente uma aproximação ou estimativa do valor do mensurando. A expressão completa de um resultado deve incluir a incerteza de medição. Segundo o guia EURACHEM/CITAC⁷⁴ a incerteza de medição é um parâmetro associado ao resultado de uma medição, que caracteriza a dispersão de valores que podem ser obtidos em torno da média. Este parâmetro pode ser um desvio padrão ou a metade de um intervalo correspondente a um nível da confiança declarado. Para estabelecer a estimativa de incerteza de medição se faz necessário identificar as variáveis que contribuem para a incerteza, e quantificar seus valores. A incerteza de um resultado pode ser oriunda de diversas fontes, tais como: definição incompleta do mensurando, amostragem não representativa, homogeneidade da

amostra, estabilidade da solução, pesagem, efeitos de matriz e interferências, equipamentos volumétricos, tendências pessoais na leitura de instrumentos analógicos, entre outras.

A implementação do ISO GUM (Guia para a expressão da incerteza de medição)⁷⁵ parte da análise que o modelo matemático da medição (equação da medição propriamente dita) inclui todas as contribuições relevantes para o ensaio ou calibração. A incerteza global é então estimada pela lei da propagação da incerteza, seguindo a identificação e a quantificação da incerteza individual dos fatores relevantes.⁷⁶ Para se calcular a estimativa da incerteza de medição alguns procedimentos precisam ser seguidos:

- (i) Especificar o mensurando, definindo claramente o que está sendo medido.
- (ii) Identificar fontes de incerteza, podendo utilizar o diagrama de causa e efeito para indicar as fontes relevantes de incerteza.
- (iii) Quantificar a dimensão do componente de incerteza associado a cada fonte potencial de incerteza identificada.
- (iv) Calcular a incerteza combinada.

Alguns componentes de incerteza podem ser avaliados experimentalmente a partir da dispersão de medições repetidas (uso da estatística freqüencista), conforme Equação 14.

$$u_{x_i} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (14)$$

onde “s” é desvio padrão calculado e “ \sqrt{n} ” é a raiz quadrada de n (número de replicatas)

Outros componentes da incerteza podem ser adquiridos a partir de informações existentes ou previamente obtidos, por exemplo, quando a estimativa de incerteza é originada de resultados e dados já existentes. Assumindo que cada grandeza de entrada (resultado ou dados) tem uma distribuição e um intervalo de confiança, a incerteza deve ser calculada com base nas distribuições de probabilidade (normal, retangular, triangular), Figura

60, correspondente a um nível de confiança declarado⁷⁷. A expressão que representa cada tipo de incerteza é apresentada na Equação 15.

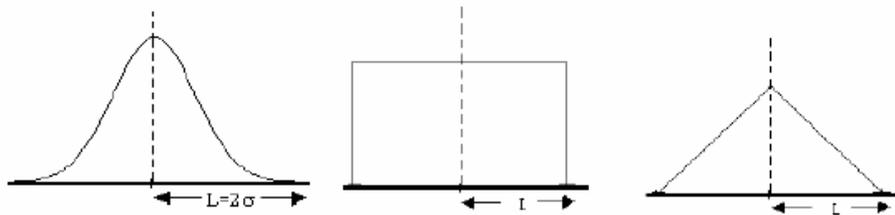


Figura 60 : Representação gráfica das distribuições de probabilidade normal, retangular e triangular.

$$u(x_i) = c \quad c = u_{\text{certificado}} = \frac{U_{(\text{declarada})}}{k} \quad (15)$$

onde “ c ” é a estimativa do resultado, “ $U_{\text{declarada}}$ ” é a incerteza expandida que deve ser extraída do certificado e “ k ” é o coeficiente de abrangência, normalmente para um nível de 95% de confiança.

Cada incerteza de entrada pode ser formada por uma ou várias contribuições, que também são combinadas para se ter o valor de cada incerteza de entrada. No processo de combinação das incertezas 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 16).

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)} \quad (16)$$

onde: “ $u(y)$ ” é o resultado da combinação de incertezas; “ $\partial y / \partial x_i$ ” 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.

Outra consideração importante esta relacionada com o *Teorema Central do Limite* que mostra que uma distribuição estatística proveniente 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.

Uma vez identificadas às fontes de incerteza de entrada e consideradas as suas contribuições, pode-se estimar a incerteza padrão combinada (u_c). A incerteza padrão combinada é a raiz quadrada da soma quadrática das incertezas padrões relativas de todos os componentes que contribuem para a estimativa da incerteza de medição, Equação 17. Para se calcular as incertezas combinadas são necessárias os valores da incerteza padrão relativa de cada contribuição, que consiste na razão do valor obtido da incerteza padrão pelo valor variável.

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots} \quad (17)$$

onde $y(x_1, x_2, \dots)$ é uma função de vários parâmetros x_1, x_2, \dots

A incerteza expandida (U) é calculada a partir da multiplicação da incerteza padrão combinada (u_c) pelo fator de abrangência k (graus de liberdade efetivos), como mostrado na equação 18.

$$U = k_{v,p} u_c \quad (18)$$

A incerteza expandida corresponde a uma probabilidade de abrangência de aproximadamente 95% (na verdade 95,45%) para um “ k ” calculado igual a 2, por se tratar de caráter amostral. O fator “ k ” está diretamente relacionado com o grau de probabilidade de acerto do cálculo da incerteza. O valor do fator de abrangência k deve levar em conta, além do nível de confiança desejado, o número de graus de liberdade efetivos associados ao caso para o intervalo $y-U$ a $y+U$. O valor de k geralmente está entre 2 e 3, mas pode assumir diversos outros valores.¹⁰⁷ É comum calcular o número de graus de liberdade efetivos (v_{eff}) através da equação, 19, de Welch- Satterthwaite:

$$v_{eff} = \frac{u_c^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (19)$$

onde “ u_c ” é a incerteza combinada, “ u_i ” é a incerteza padronizada associada à i -ésima fonte de incerteza, “ v_i ” é o n° de graus de liberdade associado à i -ésima fonte de incerteza, “ N ” é o n° total de fontes de incertezas analisadas.

Da aplicação da Equação 19, resulta o número de graus de liberdade efetivo. O valor “ k ” para o nível de confiança de 95% pode então ser obtido a partir das tabelas estatísticas⁷⁸.

O resultado da medição é, então, convenientemente expresso como:

$$Y = y \pm U \quad (20)$$

Este resultado significa que a melhor estimativa do valor atribuível ao mensurando Y é y , com $[y - U$ a $y + U]$ sendo o intervalo no qual se espera abranger uma extensa fração da distribuição de valores que podem ser razoavelmente atribuídos a Y .

Com base no conhecimento técnico e informações extraídas da literatura foi realizado um primeiro diagrama de causa e efeito para a medição de fosforescência dos analitos por SS RTP, prevendo todas as possíveis fontes de incertezas ligadas à técnica (Figura 61).

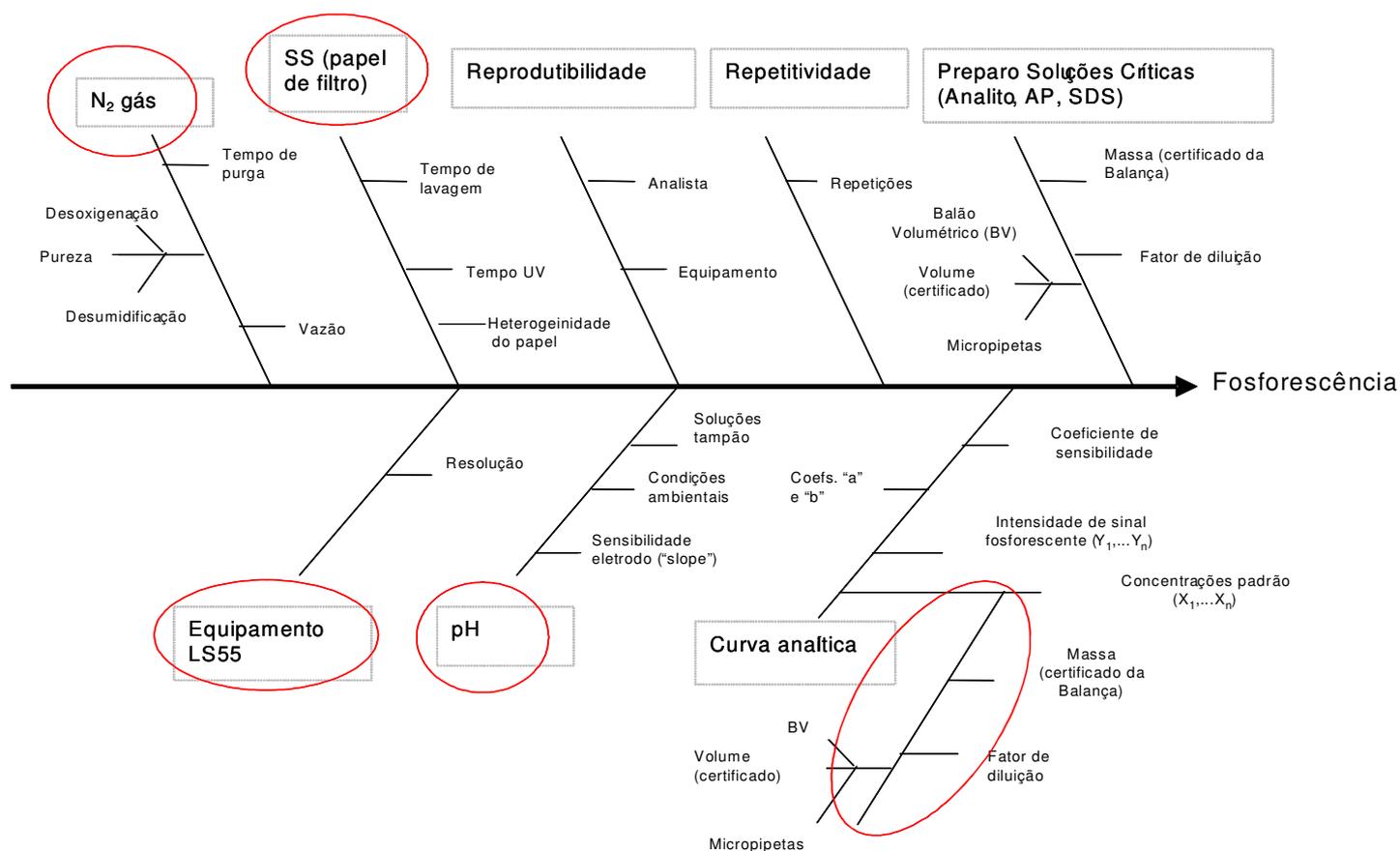


Figura 61: Espinha de peixe (diagrama de causa efeito) de um método típico baseado na SS RTP.

A partir deste diagrama foram selecionados os componentes relevantes, para que fossem efetuados os cálculos. Após avaliação mais detalhada dos parâmetros selecionados, foi possível observar que os parâmetros gás, substrato sólido e variações do equipamento se encontravam embutidos dentro das fontes repetitividade e reprodutibilidade. Também foi observado que os parâmetros relacionados às soluções da curva analítica já haviam sido contemplados no componente “preparo de soluções críticas”. Embora o pH possa ser uma possível fonte, foi verificado que a variação do sinal fosforescente dentro de um mesmo valor de pH, Figura 62, é bem maior do que entre diferentes valores de pH, indicando a não relevância do mesmo. Uma vez detectadas tais duplicidades, um novo diagrama foi gerado, como mostra a Figura 63.

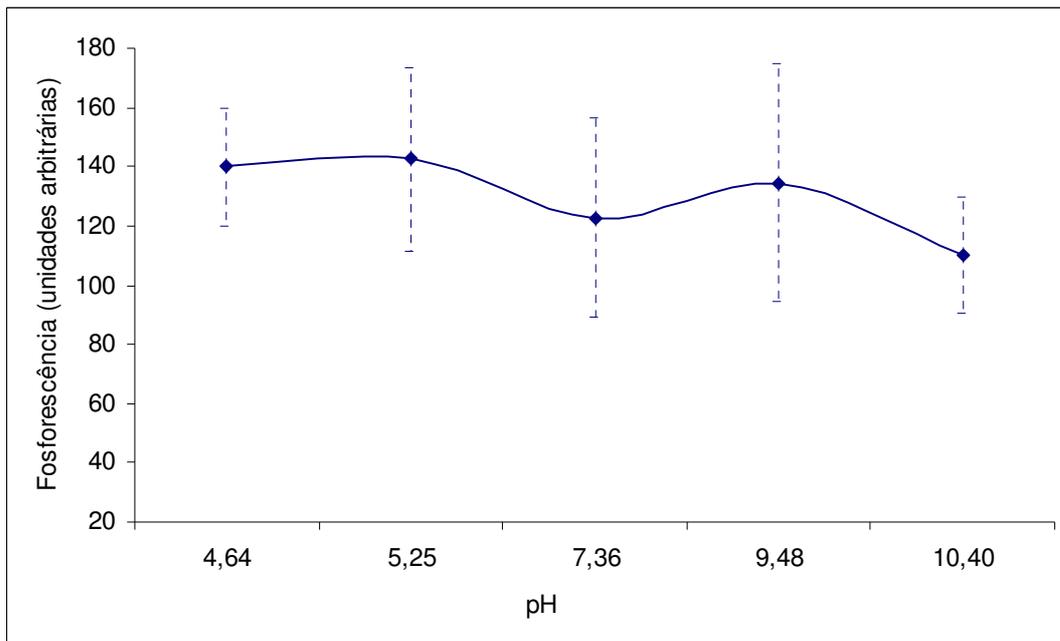


Figura 62: Dispersão dos resultados em diferentes valores de pH

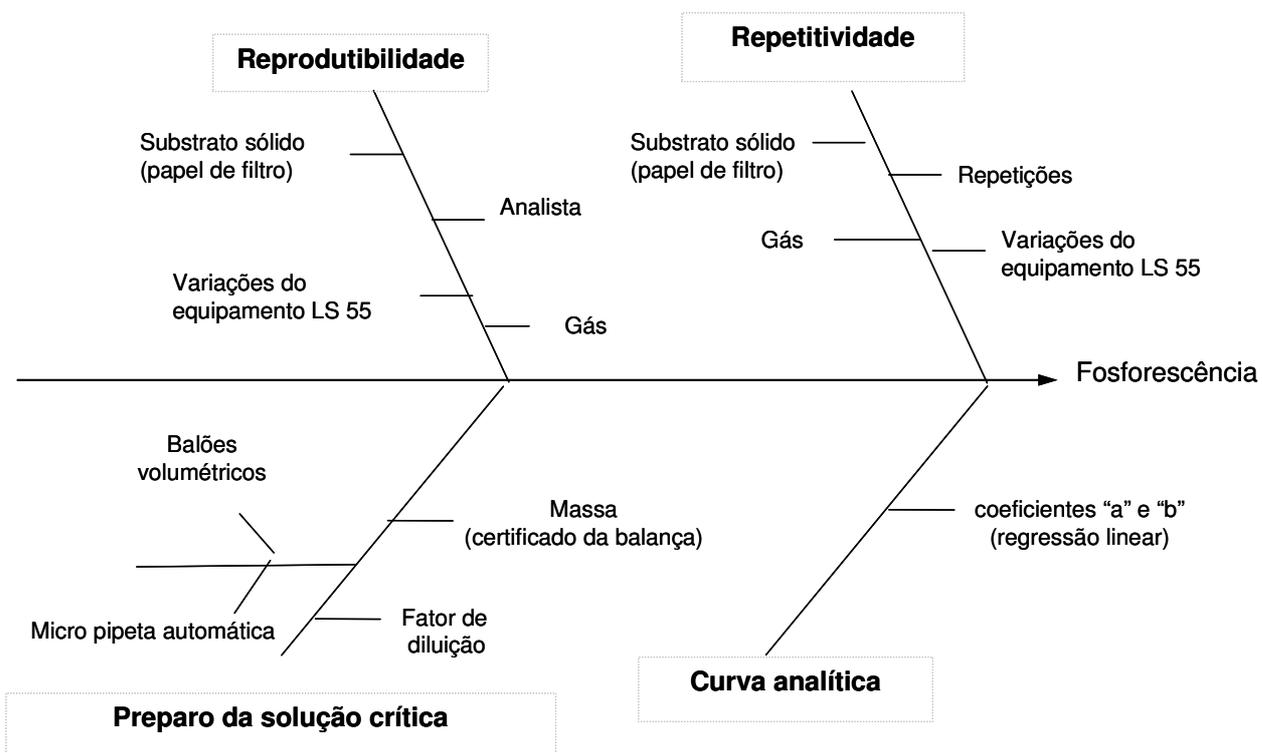


Figura 63: Diagrama de causa efeito (Espinha de peixe), após avaliação e ajuste das fontes de incertezas.

As incertezas de entrada foram agrupadas em quatro grupos principais e estimadas para cada componente relevante: (i) Preparo Soluções Críticas, (ii) Repetitividade, (iii) Reprodutibilidade, (iv) Curva analítica. Uma vez estimada a incerteza de cada componente foi possível calcular a incerteza combinada e expandida. As incertezas expandidas foram calculadas para os dois analitos (2MI e 7MI) nas duas condições selecionadas para cada um (na presença de KI e TINO_3/SDS).

A incerteza associada à repetitividade da amostra (u_{repe}) foi calculada pela estimativa do desvio padrão " s_r ", com dez repetições de uma mesma amostra, sob as mesmas condições. A incerteza associada à reprodutibilidade da amostra foi calculada pela estimativa do desvio padrão da reprodutibilidade " s_R ", através de 10 substratos distintos de uma mesma amostra para cada analista, sob as mesmas condições. A estimativa da incerteza da reprodutibilidade (u_{repro}) foi calculada pela soma dos quadrados dos desvios da repetitividade de cada analista " s_r " e entre os analistas " s_{entre} ", conforme Equação 21. A memória dos cálculos se encontra nos anexos VII e VIII.

$$S^2_R = \sqrt{(s_r^2 + s_{entre}^2)} \quad (21)$$

A estimativa da incerteza do componente curva foi calculada com base nos coeficientes da curva analítica, equação 18.

$$u_{curva} = \sqrt{[(c_{ia}^2 \times s^2 a) + (c_{ib}^2 \times s^2 b) + (2 \times c_{ia} \times c_{ib} \times u_a \times u_b \times r)]} \quad (22)$$

onde: c_{ia} é o coeficiente de sensibilidade igual a $\frac{y_{maior(u.a.)} - b}{a^2}$ ("b" intercepção da reta); c_{ib} é o coeficiente de sensibilidade igual a $-1/a$ ("a" inclinação da reta); u_a é a incerteza de "a" e é igual a $\sqrt{s^2 a}$ (" $s^2 a$ " = $\frac{s^2 \times \sum C^2}{D}$); u_b é a incerteza de "b" e é igual a $\sqrt{s^2 b}$ (" $s^2 b$ " = $\frac{n \times s^2}{D}$); D é o desvio padrão igual a

$(n \times \sum C^2) - (\sum C)^2$; “C” é a concentração em mol L⁻¹ e “r” é a razão entre “a, b” e é igual a $\frac{\sum C}{\sqrt{(n \times \sum C^2)}}$.

Conforme descrito, os parâmetros massa, micropipeta e balão volumétrico contribuem na estimativa da incerteza associada ao preparo de soluções críticas. Sendo assim, a incerteza associada ao preparo de soluções críticas (u_s) foi calculada conforme a Equação 23.

$$u_s = \sqrt{\left(\left(\frac{u_{mp1}}{K} \right)^2 + \left(\frac{u_{mp2}}{K} \right)^2 + \left(\frac{u_{bv}}{K} \right)^2 \right) \times (u_{fd}) + \left(\frac{u_{bal}}{K} \right)^2} \quad (23)$$

onde: “ u_{mp1} ” é a incerteza da micropipeta de 20-200 μ L, “ u_{mp2} ” é a incerteza da micropipeta de 5 μ L, “ u_{bv} ” é a incerteza do balão volumétrico, “ u_{fd} ” é a incerteza do fator de diluição, “ u_{bal} ” é a incerteza da balança e, K é o fator de abrangência de cada componente. A razão entre o valor da incerteza expandida expressa no certificado “U” e o fator de abrangência “k” será a incerteza combinada (u_{comb}). Os certificados referentes às calibrações da balança, 2 micropipetas e balão volumétrico estão nos anexos I, II, III e IV respectivamente.

Com base nos resultados encontrados para cada componente de incerteza foram calculadas a incerteza combinada (u_c) e a incerteza expandida (U), conforme cálculo apresentado nas equações 24 e 25, respectivamente.

$$u_c = \sqrt{(u_r^2 + u_R^2 + u_s^2 + u_{curva}^2)} \quad (24)$$

$$U = u_c \times K \quad (25)$$

A Tabela 20 e a Tabela 21 apresentam um resumo das incertezas calculadas. As planilhas detalhadas dos cálculos realizados se encontram nos anexos V, VI, VII e VIII.

Tabela 20: Resumo das Incertezas estimadas para cada componente, Incertezas combinada e expandida estimadas por SSRTP para o 2MI

Fontes de incerteza	2MI com KI			2MI com TINO ₃ e SDS		
	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹
Preparo de soluções críticas	6,51x 10 ⁻⁷	4,34x10 ⁻⁴	8,68 x10 ⁻⁴	6,51x 10 ⁻⁰⁷	6,70 x10 ⁻⁴	1,34 x10 ⁻³
Repetitividade	2,99x10 ⁻⁴			4,13 x10 ⁻⁴		
Reprodutibilidade	3,10x10 ⁻⁴			5,26 x10 ⁻⁴		
Curva analítica	5,33x10 ⁻⁵			3,32x10 ⁻⁵		

Tabela 21: Resumo das Incertezas estimadas para cada componente, Incertezas combinada e expandida estimadas por SSRTP para o 7MI

Fontes de incerteza	7MI com KI			7MI com TINO ₃ e SDS		
	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹
Preparo de soluções críticas	6,51 x10 ⁻⁷	1,08 x10 ⁻⁴	2,15 x10 ⁻⁴	6,51x10 ⁻⁷	8,21 x10 ⁻⁵	1,64 x10 ⁻⁴
Repetitividade	7,09 x10 ⁻⁵			5,09 x10 ⁻⁵		
Reprodutibilidade	7,23 x10 ⁻⁵			5,32 x10 ⁻⁵		
Curva analítica	3,63 x10 ⁻⁵			3,63 x10 ⁻⁵		

As contribuições de cada componente de incerteza também podem ser observadas por meio dos gráficos de barras, Figura 64 e 65.

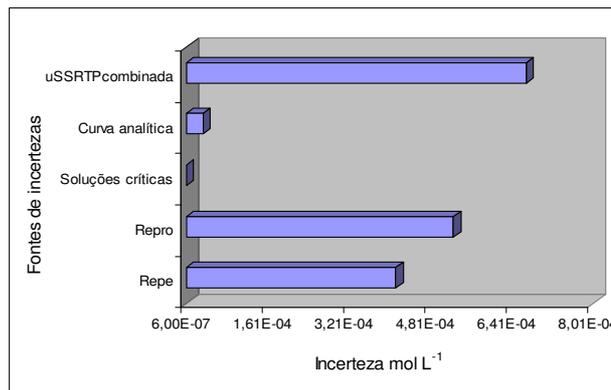
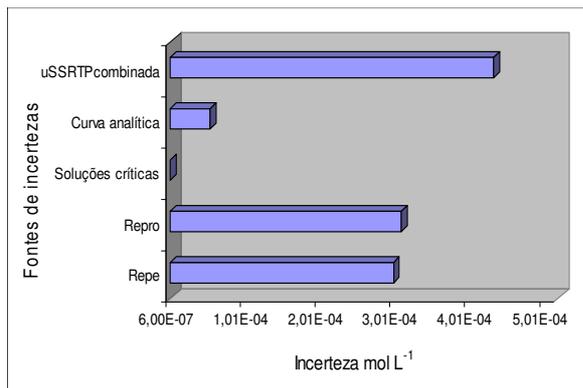


Figura 64: Gráfico de barras mostrando a contribuição de incerteza de cada componente, para o 2MI na presença de KI e TINO₃, respectivamente.

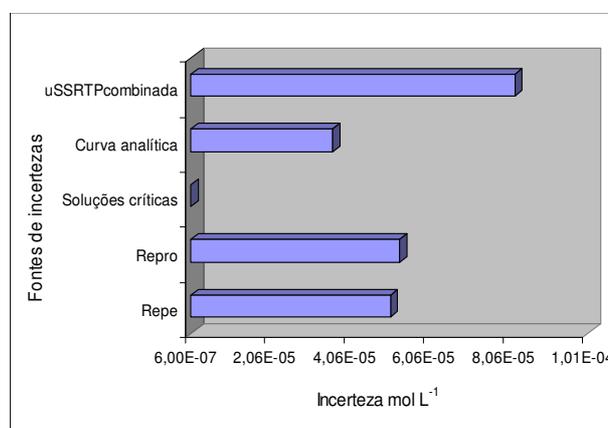
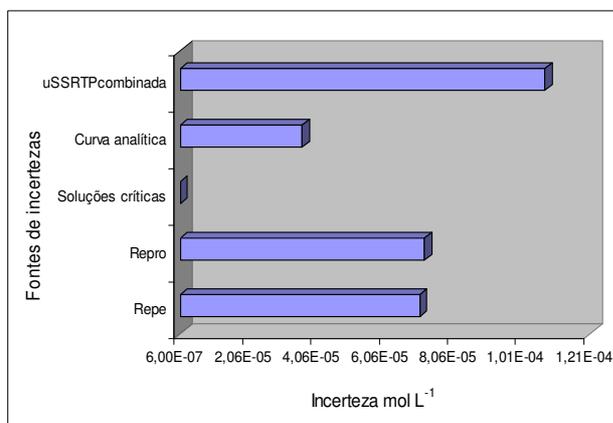


Figura 65: Gráfico de barras mostrando a contribuição de incerteza de cada componente, para o 7MI na presença de KI e TINO₃, respectivamente.

A partir dos resultados obtidos para a estimativa da incerteza combinada podemos dizer que para:

- i) 2MI na presença de KI: $Y = \text{Concentração medida } (1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) \pm 4,3 \times 10^{-4} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 33 % do valor medido;
- ii) 2MI na presença de TINO₃: $Y = \text{Concentração medida } (3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) \pm 6,7 \times 10^{-4} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 22 % do valor medido;
- iii) 7MI na presença de KI: $Y = \text{Concentração medida } (3,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}) \pm 1,1 \times 10^{-4} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 35 % do valor medido e;
- iv) 7MI na presença de TINO₃: $Y = \text{Concentração medida } (3,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}) \pm 8,2 \times 10^{-5} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 26 % do valor medido.

Uma vez identificada e calculada a incerteza de cada componente, é possível verificar quais componentes são mais relevantes para o processo. Os resultados mostraram que as fontes de repetitividade e reprodutibilidade são as que mais influenciaram na incerteza do método. Conforme já observado no item 6.5 deste capítulo, a reprodutibilidade ficou na mesma ordem de grandeza da repetitividade, devido à troca do substrato. Uma vez que a troca do substrato é considerada o fator mais relevante da precisão e conseqüentemente da incerteza da medição, a incerteza foi recalculada considerando a troca do analista o único fator da reprodutibilidade. A Tabela 22 e a Tabela 23 apresentam um resumo das incertezas calculadas. As planilhas detalhadas com os cálculos realizados se encontram nos anexos IX, X, XI e XII.

Tabela 22: Resumo das Incertezas estimadas para cada componente, Incertezas combinada e expandida estimadas por SS RTP para o 2MI

Fontes de incerteza	2MI com KI			2MI com TINO ₃ e SDS		
	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹
Preparo de soluções críticas	6,51x 10 ⁻⁷	3,14x10⁻⁴	6,29 x10⁻⁴	6,51x 10 ⁻⁰⁷	5,27 x10⁻⁴	1,05 x10⁻³
Repetitividade	2,99x10⁻⁴			4,13 x10⁻⁴		
Reprodutibilidade	8,11x10 ⁻⁵			3,26 x10 ⁻⁴		
Curva analítica	5,33x10 ⁻⁵			3,32x10 ⁻⁵		

Tabela 23: Resumo das Incertezas estimadas para cada componente, Incertezas combinada e expandida estimadas por SS RTP para o 7MI

Fontes de incerteza	7MI com KI			7MI com TINO ₃ e SDS		
	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹	Incertezas, mol L ⁻¹	Incerteza combinada, mol L ⁻¹	Incerteza expandida, mol L ⁻¹
Preparo de soluções críticas	6,51 x10 ⁻⁷	8,09 x10⁻⁵	1,62 x10⁻⁴	6,51x10 ⁻⁷	6,45 x10⁻⁵	1,29 x10⁻⁴
Repetitividade	7,09 x10⁻⁵			5,09 x10⁻⁵		
Reprodutibilidade	1,45 x10 ⁻⁵			1,56 x10 ⁻⁵		
Curva analítica	3,63 x10⁻⁵			3,63 x10⁻⁵		

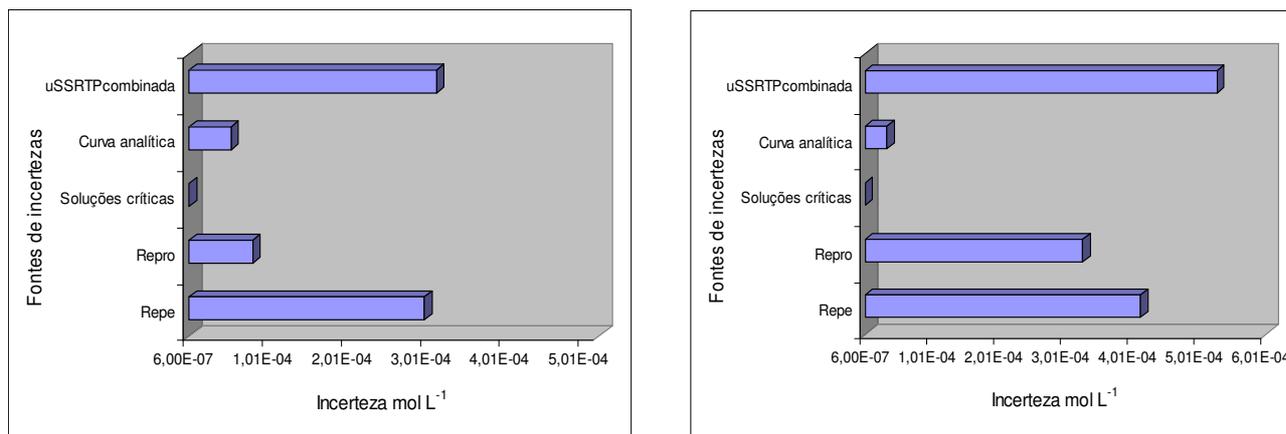


Figura 66: Contribuição de incerteza de cada componente, para o 2MI na presença de KI e TINO₃, respectivamente.

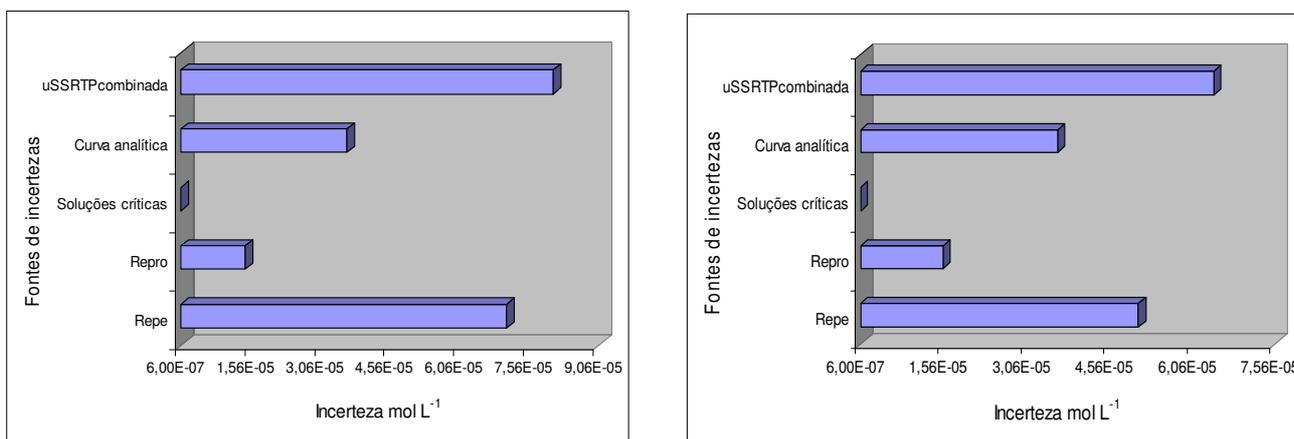


Figura 67: Contribuição de incerteza de cada componente, para o 7MI na presença de KI e TINO₃, respectivamente.

Os resultados mostraram que para todas as condições estudadas a repetitividade é a fonte de incerteza que mais influencia na incerteza do método. No caso do 2MI na presença de TINO₃, a incerteza do método ainda apresenta uma grande influencia da repetitividade. A provável causa desta influencia pode ser as adições sucessivas dos sais de TINO₃ e SDS. No caso do 7MI, tanto na presença do KI quanto na presença do TINO₃, a curva analítica também mostrou ser um fator importante para a incerteza do método.

A partir dos novos resultados obtidos para a estimativa da incerteza combinada podemos dizer que para:

- i) 2MI na presença de KI: $Y = \text{Concentração medida } (1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) \pm 3,1 \times 10^{-4} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 24 % do valor medido;
- ii) 2MI na presença de TINO_3 : $Y = \text{Concentração medida } (3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}) \pm 5,3 \times 10^{-4} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 18 % do valor medido;
- iii) 7MI na presença de KI: $Y = \text{Concentração medida } (3,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}) \pm 8,1 \times 10^{-5} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 26 % do valor medido e;
- iv) 7MI na presença de TINO_3 : $Y = \text{Concentração medida } (3,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}) \pm 6,4 \times 10^{-5} \text{ (mol L}^{-1})$ o que equivale a 21 % do valor medido.

Os resultados mostraram que houve uma redução no valor obtido para a incerteza do método, o que confirma o fato da troca de substrato ter sido considerada duas vezes: uma no cálculo da reprodutibilidade e a outra no cálculo da repetitividade.